

Галимов Ян Рудольфович

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИЗНАКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПОЛОВЫМ
РАЗМНОЖЕНИЕМ И ДИАПАУЗОЙ, У ПЛАНКТОННОГО
РАКООБРАЗНОГО *DAPHNIA MAGNA* STRAUS (CRUSTACEA:
CLADOCERA)**

03.02.10 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Институте Биологии Развития РАН им Н.К. Кольцова

Научный руководитель: КОТОВ Алексей Алексеевич доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ИПЭЭ РАН, Профессор РАН

Официальные оппоненты:

Задереев Егор Сергеевич кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ученый секретарь Институт Биофизики РАН

Алексеев Виктор Ростиславович доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий отделением систематики Лаборатории пресноводной и экспериментальной гидробиологии Зоологического Института РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Защита диссертации состоится 29 июня 2016 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета по защите кандидатских и докторских диссертаций Д 002.213.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук по адресу: 119071, Москва В-71, Ленинский проспект, д. 33, тел./факс: 8 (495) 952 73 24, e-mail: admin@sevin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук РАН по адресу: 119071, Москва В-71, Ленинский проспект, д. 33.

Диссертация, автореферат и объявление о защите размещены на сайте ВАК Минобрнауки РФ по адресу: www.vak2.ed.gov.ru и на сайте ФГБУН ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН по адресу: www.sevin.ru 29 апреля 2016 г.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Е.А. Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Исследование фенотипической и генетической изменчивости живых организмов представляет собой магистральное направление биологии. Благодаря бурному развитию молекулярной биологии, большинство современных исследований изменчивости гидробионтов в основном сконцентрировано на изучении изменчивости маркерных последовательностей ДНК, рассматриваемых как нейтральные признаки, эволюция которых связана со случайными событиями и историей популяции, но не с их селективным значением (Кимура, 1985; Грант, 1991). Тем не менее, изучение изменчивости экологически важных признаков гидробионтов не теряет своего значения. Данные по внутривидовой изменчивости гидробионтов представляют собой основу для понимания механизмов их адаптации к условиям среды, поскольку именно внутривидовые различия позволяют исследовать признак в сравнительно однородном экологическом, морфологическом и генетическом контексте. С появлением все более доступных методов молекулярно-генетического анализа – геномного секвенирования (Ребриков и др., 2014) и генетического картирования – задача исследования молекулярно-генетических основ экологически важных признаков из недостижимого идеала превращается в амбициозную, но реализуемую задачу.

Однако проведение такого исследования требует применения комплексного подхода, с использованием сведений, подходов и методик из различных областей биологии – от полевых гидробиологических исследований до современных молекулярных методик. Именно с этим связан выбор в качестве объекта исследования ракообразных рода *Daphnia* O.F. Mueller (Crustacea: Cladocera), изученных лучше большинства других гидробионтов как с точки зрения экологии природных популяций (Benzie, 2005; Lampert, 2011), так и с точки зрения разработанности молекулярных методов и доступности молекулярно-генетических данных (Colbourne et al., 2011; Ebert, 2011). Настоящая работа представляет собой попытку применения такого комплексного подхода к нескольким частным проблемам изучения диапаузы и гамогенеза *Daphnia*.

Цель работы – оценить изменчивость признаков, связанных с половым размножением и диапаузой у *Daphnia magna*, а именно временем перехода к диапаузе и выхода из нее, продолжительности диапаузы и соотношения полов в партеногенетическом потомстве, а также возможные пути формирования и поддержания такой изменчивости.

Для ее достижения были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Изучить распространенность не дающих самцов клонов в различных естественных популяциях и различных эволюционных линиях *Daphnia magna*.
- 2) Изучить характер наследования бессамцовости.
- 3) Сопоставить стратегии переживания зимнего периода у совместно обитающих видов *D. pulex* (часть самок переживает зиму в активном состоянии) и *D. magna* (с полным уходом популяции в диапаузу).
- 4) Исследовать эффективность искусственного отбора на ранее или позднее вылупление молоди *Daphnia* из эфипиумов и связь возобновления развития с продолжительностью периода покоя.
- 5) Построить модель, описывающую оптимальное вложение ресурсов организма в производство покоящихся стадий и оптимальную продолжительность периода покоя в условиях сезонных местообитаний.

Научная новизна. Впервые получены данные по полиморфизму определения пола у *D. magna*, и проведено его исследование в природных популяциях данного вида. Получены многолетние данные по динамике популяций двух прудовых видов *Daphnia* и изучено значение межгодовых климатических изменений и диапаузы в этом процессе. Впервые в исследовании диапаузы планктонных ракообразных применен метод искусственного отбора, позволивший показать наличие генетической изменчивости, определяющей время выхода популяции из диапаузы. Построенная модель является одним из первых исследований эволюционного аспекта влияния межгодовой изменчивости среды (продолжительности благоприятного сезона) на время начала и конца диапаузы, в жизненном цикле. Впервые подтверждено наличие аутомиксиса у Cladocera.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты закладывают, с одной стороны, основу для исследования генетических

основ диапаузы и определения пола у *Daphnia* как модельного объекта современной эволюционной биологии, а с другой – позволяют интерпретировать приспособительное значение изменчивости по этим признакам. Накопленные данные могут в дальнейшем найти практическое применение, в частности, благодаря выявлению преимуществ видов, лучше адаптированных к низким температурам. Обнаруженные бессамцовые клоны *Daphnia* наиболее удобны при работе с лабораторными культурами (например, при проведении токсикологических исследований) и исследования различных аспектов физиологии и генетики ракообразных. Собранная крупная коллекция донных осадков, содержащих покоящиеся стадии гидробионтов из различных водоемов России и других стран активно используется в научных разработках разного профиля в ряде лабораторий РАН.

Методология и методы исследования. В работе применен весьма трудоемкий, но наиболее эффективный комплексный методический подход, сочетающий многолетние полевые сборы в модельных природных популяциях, сбор планктонных проб и проб донных осадков в различных географически удаленных природных популяциях, поддержание лабораторных культур живых организмов (включая получения клональных культур из покоящихся стадий, гормональную стимуляцию производства самцов, скрещивание, эксперименты по искусственному отбору), работу с искусственными популяциями (мезокосмами), молекулярно-генетический анализ (секвенирование митохондриальных генов для филогенетической реконструкции, микросателлитный анализ, поиск однонуклеотидного поколения с помощью RAD-секвенирования) и математическое моделирование. Этим работа выгодно отличается от большинства исследований, проводимых в настоящее время узкими специалистами.

Положения, выносимые на защиту:

1) Изменчивость экологически важных признаков, связанных с диапаузой и половым размножением (гамогенезом), в природных популяциях *Daphnia* изучена недостаточно. Подробное исследование такой изменчивости показывает ее повышенный уровень по ряду ключевых признаков.

2) Не все клоны *D. magna* способны к производству самцов. Потеря такой способности связана с ядерным локусом и представляет собой раннюю стадию перехода к генетическому определению пола.

3) В популяциях *Daphnia*, населяющих замерзающие водоемы, для выхода молоди из эфиппийных яиц требуется достаточно продолжительное пребывание на холоде. Сроки выхода молоди определяются, в числе прочего, и генетическими факторами.

4) Постепенный переход к откладке диапаузирующих яиц и постепенный выход из диапаузы могут использоваться как альтернативные и взаимодополняющие стратегии адаптации к непредсказуемой внешней среде.

Степень достоверности и апробация результатов. В ходе работы были использованы различные методики и подходы, применение которых привело к непротиворечивым результатам. Все заключения количественного анализа проверялись статистически. Статьи, в которых опубликованы основные положения работы, прошли рецензирование ведущими специалистами. Результаты работы были представлены на ряде международных научных конференций: 2-ом Международном Симпозиуме по Диапаузе (Гент, Бельгия, 1997), Международной конференции памяти Г.Г Винберга (С.-Пб., 2000), Научной конференции, посвященной 80-летию А.А. Нейфаха (ИБР РАН, Москва, 2006), XIII Школе-конференции молодых ученых "Биология внутренних вод" (Борок, 2007), Российско-Швейцарском по генетике ветвистоусых ракообразных (Фрибург, Швейцария, 2010), Первом совместном Конгрессе по Эволюционной Биологии (Оттава, Канада, 2013), а также семинарах и межлабораторных коллоквиумах ИБР РАН, ИПЭЭ РАН, и Университетов Фрибурга и Базеля (Швейцария).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ, из которых 5 – это статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, шести глав, списка цитируемой литературы и списка иллюстративного материала. Работа изложена на 141 страницу, содержит 18 иллюстраций и 4 таблицы. В списке литературы содержится 199 названий, из них 181 на иностранных языках.

Участие автора. Выбор и обоснование научной тематики исследования, получение результатов, их анализ и интерпретация сделаны при решающем участии автора. Автором лично собрана большая часть используемого в работе материала из природных популяций, а также выполнена основная часть лабораторной работы с *Daphnia* (получение и поддержание клональных культур, опыты по вылуплению из эфиппидальных яиц, гормональная и средовая стимуляция производства самцов). Работы с культурами на открытом воздухе в Швейцарии проводилась при ограниченном участии автора. Молекулярный анализ, за исключением RAD-секвенирования, проводился либо персонально автором, либо при его участии. Текст диссертации написан автором по плану, согласованному с научным руководителем. Все опубликованные работы написаны лично автором или в соавторстве.

Благодарности. Настоящая работа посвящается памяти профессора МГУ А.М. Гилярова, под руководством которого она была начата. Автор благодарит А.А. Котова за помощь на разных этапах подготовки диссертационной работы, а также Л.Ю. Ямпольскому за советы по выбору направлений данного исследования. В подготовке и обсуждении работы неоценимую помощь оказали К.Р. Хааг, Н.Н. Смирнов, Н.М. Коровчинский, А.А. Минин, Д. Эберт, Н.С. Мюге, Е.И. Беккер, К. Хааг-Лиутард, И.Ю. Баклушинская, Карабанов Д.П. Незаменимую помощь в сборе, транспортировке, обработке материала оказали Е.И. Беккер, Ю.А. Байбикова, С.М. Глаголев и школьники гимназии 1543, М.В. Глуховский, А.А. Жаров, Л.С. Зиневич, Д.С. Лебедев, А.А. Минин, Н.С. Мюге, Т.В. Неретина, А.Н. Сельская, К. Соловьев, К.Р. Хааг, П.В. Иванов, А.С. Хижнякова и члены кружка ЮИП, В.К. Чугунов, А.В. Крылов, Д.М. Щепетов, С.Г. Озерова, Л.Ю. Ямпольский. Автор благодарит отдел орнитологии Московского зоопарка и лично Н.И. Скуратова за многолетнее содействие, а также своей семье за заботу и понимание в течение многих лет выполнения работы. Настоящее исследование поддержано грантами РФФИ №14-04-01149 и 16-04-01579.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ДИАПАУЗА, ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА У *DAPHNIA*

В данном разделе приведен обзор литературы, посвященной особенностям жизненного цикла и способам размножения дафний, а также наследованию признаков при партеногенезе и гамогенезе, банку покоящихся яиц как важной части природных популяций *Daphnia*, фенологии диапаузы и сезонной приуроченности перехода к диапаузе и выхода из диапаузы в различных типах природных популяций *Daphnia*, физиологическим механизмам и факторам среды, влияющим на переход к диапаузе (включая производство самцов) и выходу из нее, в том числе, роли фотопериода, температуры, пищевых условий для перехода к диапаузе, и необходимость периода покоя (инкубации) для возобновления развития диапаузирующего эмбриона.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор материала в природных популяциях. В «пеликаньем» пруду Московского Зоопарка в период с 1997 по 2014 год было собрано более 150 планктонных проб, при этом в 2001-2003 и в 2011-2012 годах сбор проводился регулярно в течение всего сезона. Помимо этого, от отдельных планктонных самок *D. magna* были получены клональные культуры. Для исследования географического распространения не дающих самцов (NMP) клонов нами были получены и проанализированы пробы планктона и донных осадков из 65 популяций *Daphnia magna* и двух популяций *D. pulex* из водоемов на территории Европейской и Азиатской России, Чехии, Украины. Дополнительные пробы из Монголии, Израиля и Германии получены от наших коллег.

2.2. Работа с культурами *Daphnia* в лаборатории. Получено более пяти тысяч клональных культур *D. magna* (от планктонных самок и самок, вылупившихся из эфиппидальных яиц), которые использованы в работах по исследованию половой

специализации клонов (Глава 3) и особенностей реактивации эфиппидальных яиц (Глава 4). Массовые культуры дафний содержали на открытом воздухе в пластиковых баках по 60 л.

Для получения самцов и выявления не дающих самцов клонов (NMP, от английского «non-male producers», в отличие от «нормальных» клонов, дающих самцов, обозначенных как MP клоны (от «male producers»)), использовали как средовую, так и гормональную стимуляцию. В качестве средового стимула при получении самцов использовали высокую плотность культуры. Клональные культуры высокой плотности получали по стандартной методике, однако увеличивали количество корма до $1,0 \times 10^6$ кл/мл/сут, рачков не пересаживали в свежую среду и не убирали лишнюю молодь. При этом плотность популяции быстро достигала значений более 0.5-1 особи/мл среды, что в большинстве клонов вызывало переход к производству самцов и эфиппидальных яиц. При гормональной стимуляции использовали гормон метилфарнезоат в концентрации 400 нМ/л (Olmstead, Leblanc, 2001). В опыте самки содержались в среде с гормоном в течение почти всего периода развития яичника, включая весь период чувствительности к гормону (Olmstead, Leblanc, 2002). Для выявления возможных случаев очень редкого появления самцов в NMP кломах использовали культуры на открытом воздухе. Наличие самцов в таких культурах проверяли просмотром больших (сотни и тысячи особей) выборок из каждой культуры, а также путем генотипирования (см. ниже) потомства, появляющегося из эфиппидальных яиц после зимовки.

Также исследовали природные кладки NMP и MP клонов. Для этого из планктонных проб в период, когда в популяции *D. magna* появляются самцы, из каждой пробы случайным образом отбирали 70-150 взрослых самок. Потомство таких самок подсчитывали после первой линьки и определяли его пол. В дальнейшем с помощью гормональной стимуляции у самих самок или их клонального потомства проверяли способность к производству самцов. Это позволяло сравнить первичное соотношение полов в природных кладках самок из NMP и MP клонов.

Для изучения наследования отсутствия самцов в потомстве при половом размножении было поставлено 18 скрещиваний между NMP и MP клонами и 19 контрольных скрещиваний между двумя MP клонами.

В опытах по отбору на ранее/позднее вылупление в качестве исходной выборки из пробы донных осадков были отобраны две партии эфиппиумов. Стимулируя выход молоди из эфиппиальных яиц, отбирали рано и поздно вылупляющуюся молодь. Стимуляция была начата через 2.5 месяца после взятия пробы (5°C, 14 часов света: 10 часам темноты). Из каждой партии было отобрано по 4 наиболее рано и по 4 наиболее поздно вылупившиеся самки. От них были получены клональные культуры, при скрещивании которых получили эфиппиальные яйца F₁ (380 эфиппиумов в группе отбора на ранее вылупление и 322 эфиппиума в группе отбора на позднее вылупление). Всего при вылуплении было получено 316 самок в группе отбора на позднее и 238 самок в группе отбора на раннее вылупление. Стимуляция продолжалась 50 дней, после чего эфиппиумы инкубировали в течение еще пятидесяти дней в темноте при +4°C, они были использованы для повторной стимуляции. Отобрано 6 наиболее поздно и 8 наиболее рано вылупившихся самок F₁, от которых получили эфиппиальные яйца F₂. После 50-дневного хранения на холоде в темноте, вылупление из эфиппиумов F₂ стимулировали так же, как в случае F₁, но при 10°C. После первого вылупления, эфиппиумы были оставлены для повторной инкубации и стимуляции вылупления (также при 10°C).

В группах отбора на ранее/позднее вылупление эфиппиумы F₁, не вылупившиеся при первой стимуляции, были оставлены для повторной инкубации в темноте и повторной стимуляции вылупления (см. выше), которая была начата после 50-дневной инкубации в темноте (100-ый день после начала первой стимуляции). Из вылупившихся при повторной стимуляции 61 самки в группе отбора на раннее и 77 самок в группе на позднее вылупление, были отобраны представительницы пар клонов с наибольшим отношением числа вылупившихся при повторной (II) стимуляции (N_{II}) к числу вылупившихся при I стимуляции (N_I), т.е. максимальным показателем $[N_{II}/(N_I + N_{II})]$. Всего было отобрано 6 самок из пар клонов, у которых соотношение $N_{II}/(N_I + N_{II})$ превышало 0.75. Одна из самок

погибла, от оставшихся пяти получили клоны, которые скрестили между собой так же, как и при отборе на раннее/позднее вылупление. Полученные эфиппиумы F₂ инкубировали и стимулировали вылупление так же, как это указано для групп отбора на раннее/позднее вылупление.

Исследование выхода молоди из эфиппиальных яиц проводили на материале, полученном от самок из планктонной пробы, эфиппиальные яйца различались по возрасту не более, чем на 6 суток. Всего было взято по 10 партий по 100 эфиппиумов в партии, для каждого из двух видов дафний, *D. magna* и *D. pulex*. Эфиппиумы инкубировали в холодильнике (0°C, темнота) в течение одной недели, 1 месяца, 2 месяцев или 3 месяцев. После инкубации 96 эфиппиумов из каждой пробирки держали при 10°C и фотопериоде 14 часов на свету: 10 часам в темноте, раз в сутки отсаживая вылупившуюся молодь.

2.3. Методы статистического анализа, анализа молекулярных данных, построение модели. Доверительные интервалы для долей оценивали с помощью он-лайн калькулятора GraphPad <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ConfIntervall.cfm>), по модифицированному методу Вальда (Agresti, Coull, 1998), различия в долях между группами оценивали с помощью точного теста Фишера или обобщенной линейной модели с биномиальным распределением ошибки с помощью программы JMP (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA). Двусторонние тесты применялись во всех случаях, за исключением случаев, когда наблюдаемые доли составляли ноль или единицу (в этом случае, реальные доли могут отличаться от измеренных только в одном направлении). При сравнении двух выборок применялся критерий Стьюдента и непараметрический тест Манна-Уитни (в программе Statistica) при исследовании эффектов родительского генотипа в генетических экспериментах применялась двухфакторный дисперсионный анализ с обобщенной линейной моделью (GLM ANOVA, Statistica).

2.4. Молекулярный анализ. При исследования клонов *D. magna* из различных популяций определяли последовательность 710-нуклеотидного фрагмента митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы (*COI*). Дополнительные последовательности *COI* европейской *D. magna* (De Gelas, De Meester, 2005) были получены из Genbank и, наряду с последовательностями,

полученными в настоящем исследовании, применялись для реконструкции филогении с помощью программы TCS (Clement et al., 2000). Полученные последовательности депонированы в Genbank (JF750768-JF750771).

ДНК для микросателлитного анализа выделяли из одной особи по протоколу HotSHOT (Montero-Pau *et al.*, 2008); каждую особь генотипировали по 11 микросателлитным локусам гетерозиготным у родителя. Фрагментный анализ проводился на ABI Prism 3130 Genetic Analyser, и длины фрагментов анализировали с помощью ПО GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) в качестве внутреннего стандарта использовали Gene Scan-500 LIZ.

Для того, чтобы понять, является ли потомство, вылупившееся из эфиппиумов в массовых культурах бессамцовых клонов, результатом внутриклонального скрещивания или аутомиксиса, было определено положение центромерных областей в хромосомах *Daphnia magna*, в этих областях были выявлены маркеры, различающиеся (гетерозиготные) в гомологичных хромосомах, и проанализирована картина сохранения этой гетерозиготности в полученном потомстве. В качестве маркеров был использован сайт однонуклеотидного полиморфизма (SNP). Было проанализировано потомство 8 особей, вылупившихся из эфиппиальных яиц в одной из культур бессамцовых клонов. Для определения положения центромерных областей использовали секвенирование ДНК участков, связанных с сайтами рестрикции (RAD-секвенирование, Baird et al., 2008) по ранее предлагавшемуся протоколу (Etter et al. 2011) с некоторыми модификациями. Предположительное положение центромер определяли по генетической карте (генетическая карта *D. magna* v4.0.1, Dryad, Dukić et al., неопубликованная рукопись) как большие области с отсутствием рекомбинации; в каждой группе сцепления была только одна такая область, за исключением группы сцепления 3, в которой таких областей было две.

2.5. Модель. В модели, направленной на поиск оптимальных стратегий перехода к диапаузе и реактивации покоящихся стадий (Глава 6), вычисляли значения долговременной приспособленности для каждого сочетания параметров перехода к диапаузе, и, там где это применимо, выхода из нее. В массивах полученных долговременной приспособленности значений находили локальные

максимумы. Данные получали для различной вариабельности длины сезона и скорости роста популяции, а также для различных моделей популяционного роста. Модель была написана на языке C++.

Глава 3. ПОЛОВАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ КЛОНОВ *Daphnia magna*: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И НАСЛЕДОВАНИЕ НЕСПОСОБНОСТИ К ПРОИЗВОДСТВУ САМЦОВ.

Ранее было обнаружено, что некоторые клоны *D. magna* не реагируют ни на средовые стимулы, вызывающие появление самцов, ни на гормональную стимуляцию и, соответственно, не производят мужского потомства. Вслед за Иннесом (Innes, 1993), мы обозначили такие клоны, соответственно, NMP, от английского «non-male producers», в отличие от «нормальных» клонов, дающих самцов, обозначенных как MP клоны (от «male producers»). NMP клоны дают нормальные гаплоидные эфиппидальные яйца и могут существовать только в популяциях, где они сосуществуют с MP клонами.

Не дающие самцов клоны были обнаружены нами в популяциях BN, MZ, SPb, Tam и Vol, но они не в популяциях Cav, Ism и Syz (Рис. 3.1). В пробах, взятых из банка диапаузирующих яиц, частота NMP клонов (если таковые имелись в популяции) составляла 5% -21%, со значимыми различиями между популяциями. Частоты NMP клонов в планктонных пробах были выше (в среднем, 32%) чем в пробах из банка покоящихся яиц (в среднем, 14%)

В опытах с массовыми культурами, в период полового размножения мы не обнаружили самцов среди 7840 самок, взятых из массовых культур пяти NMP клонов, происходящих из четырех популяций (в каждой популяции пол определяли у 487-3500 особей). Во всех культурах MP клонов имелись самцы (5-48% в зависимости от популяции, в среднем 24%). В нескольких массовых культурах NMP клонов после зимовки вне помещения было обнаружено небольшое число вылупившейся молодежи (гораздо меньше, чем в культурах MP клонов). У потомства (N=46) в целом имелись в точности те же аллели по 11 локусам, что и у родительского клона. Эти результаты указывали на то, что в

моноклональных культурах NMP клонов, либо происходит половое размножение и, следовательно, производятся редкие самцы, либо происходит аутомиксис.

Нами была проанализирована гетерозиготность по однонуклеотидным заменам вблизи центромерных областей в потомстве, вылупившемся из эфиппиальных яиц одноклональных культур NMP и MP клонов. В потомстве клонов, полученных из эфиппиальных яиц в культурах NMP-клонов, либо все 10 предположительных центромерных областей были гомозиготными (семь потомков) либо все центромерные области были гетерозиготными во всех десяти хромосомах (Рис. 3.2), что указывает на то, что потомство, вылупившееся из эфиппиальных яиц в культурах MP клонов – результат внутриклонального скрещивания, а молодь в потомстве NMP клонов – результат аутомиктического размножения, причем один из потомков был произведен в результате центрального слияния, а семь остальных – за счет терминального слияния. Таким образом, показано, что эфиппиальное потомство NMP клонов образуется не в результате появления редких самцов, а в результате аутомиктического (мейотического партеногенеза), что подтверждает полное отсутствие самцов в потомстве NMP клонов.



Рис. 3.1. Исследованные популяции *D. magna*, в которых обнаружены (белые звезды) и не обнаружены (черные квадраты) NMP-клоны.

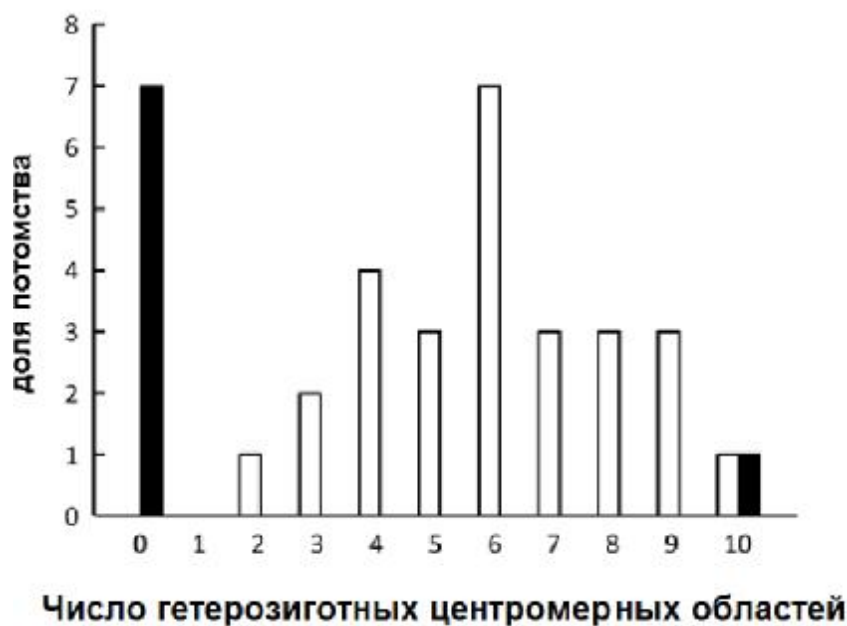


Рис. 3.2. Число потомков с различным числом пар хромосом, гетерозиготных по центромерным областям, у потомства, вылупленного из эфиппидальных яиц, полученных в культуре бессамцового (NMP) и самцового (MP) клона.

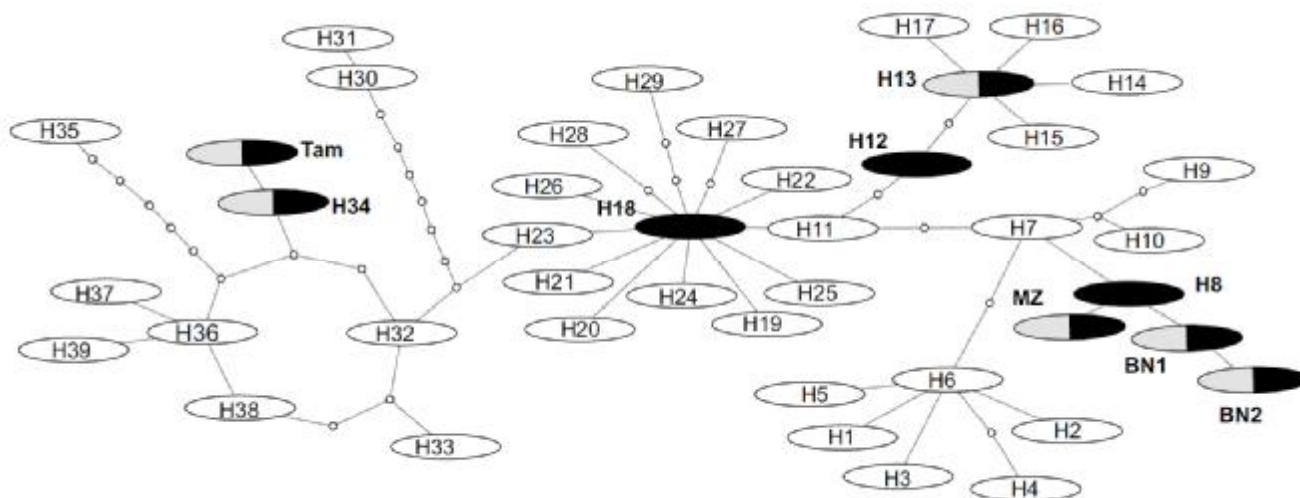


Рис. 3.3. Сеть гаплотипов фрагмента субъединицы I цитохромоксидазы *Daphnia magna*. Показаны гаплотипы MP клонов (черный) и NMP клонов (серая заливка), обнаруженные в настоящей работе. Остальные гаплотипы взяты из базы Genbank. Обозначение названий гаплотипов согласно De Gelas & De Meester (2005), за исключением ранее неизвестных гаплотипов (BN1, BN2, MZ и Tam).

Анализ гаплотипов *COI* (Рис. 3.3) показывает, что в каждой популяции, NMP клоны и MP клоны имели одни и те же или близкие гаплотипы *COI*, но NMP клоны (а также MP клоны) из различных популяций имели, в некоторых случаях,

весьма далекие гаплотипы. В нашей выборке, фенотип NMP обнаружен в трех различных частях сети, разделенных 8-11 мутационными событиями.

Обобщение данных всех лет наблюдения показывает, что хотя небольшое число самцов появляется уже в мае-июне, основное производство самцов приходится на период с середины августа по октябрь (см. Главу 4, Рис. 4.3А), и в течение сентября происходит резкий переход от партеногенетического производства самок в начале сезона к 100% половому размножению (продукцию покоящихся яиц) в конце сезона (Рис. 4.3 С).

В отложенных в конце сезона природных кладках NMP клонов ни разу не было обнаружено ни одного самца, в то время как средняя доля кладок, состоящих из самцов, в MP клонах составляла 89%. При этом эфиппильные кладки чаще встречались среди NMP клонов. Размеры партеногенетических кладок были очень близки и не отличались значимо у NMP и MP клонов.

В первой серии скрещиваний было получено всего 85 клонов F1 из 16 скрещиваний NMP x MP и 57 клонов F1 из контрольных скрещиваний 19 MP x MP. Ни один из потомков этих контрольных скрещиваний не был NMP (95% доверительные интервалы для доли NMP в потомстве скрещиваний MP x MP: 0-0.054). В отличие от этого, в F1 скрещиваниях NMP x MP, 41 из 85 клонов были NMP. Ни в одном из этих скрещиваний, эта доля не отличалась значимо от 0.5 (биномиальный тест, все $P > 0.25$).

При анализе второй серии скрещиваний также не была отклонена гипотеза о 50% наследовании признака NMP в скрещиваниях NMP x MP. В объединенной выборке NMP x MP наблюдаемая доля NMP составила 48.6% (N = 259).

Таким образом, нами показано существование у *D. magna* генотипов, не производящих самцов ни при гормональной стимуляции клонов, ни в природных кладках, ни в массовых культурах NMP клонов в то время, когда самцы составляли большую долю в контрольных культурах MP клонов. Результаты экспериментальных скрещиваний наилучшим образом соответствуют ситуации, когда отсутствие самцов в потомстве (NMP) определено доминантным аллелем единственного ядерного локуса (или нескольких тесно сцепленных локусов), что

также подтверждается результатами картирования, определяющего отсутствие самцов в потомстве (Reisser et al. рукопись готовится к печати).

Мы обнаружили NMP клоны в трех филогенетически удаленных кладах митохондриальных гаплотипов *D. magna*. Исходя из того, что NMP определяется доминантным аллелем единственного ядерного локуса, и NMP клоны никогда не дают самцов, NMP-аллель всегда наследуется совместно с митохондриальным гаплотипом. Поэтому существование NMP в трех кладах, разделенных 8-11 мутационными событиями, может объясняться одной из трех альтернатив: (1) NMP обусловлен предковой мутацией и встречался (или все еще встречается) также в промежуточных гаплотипах; (2) NMP клоны появлялись в истории вида многократно и независимо.

Частота NMP клонов снижается вдвое при каждом гамогенетическом размножении. Для сохранения в популяции NMP клонов они должны давать, по меньшей мере, в два раза больше эфиппидальных яиц, чем MP клоны (в расчете на одну особь, вылупляющуюся в начале сезона). В случае *Daphnia*, это может быть достигнуто либо за счет: (1) значительного преимущества NMP клонов при клональном размножении либо, (2) значительного преимущества NMP в производстве эфиппидальных яиц. Доля NMP клонов выше в планктонных пробах, чем среди клонов, полученных из эфиппидальных яиц, т.е. частота NMP клонов увеличивается во время или после вылупления из эфиппидальных яиц. Кроме того, отмечена тенденция к большей доле эфиппидальных кладок у NMP самок в сравнении с MP самками. Если NMP клоны обладают достаточным преимуществом для сохранения в популяции, можно ожидать сохранения стабильного полиморфизма, поскольку NMP не может зафиксироваться в силу давления частотно-зависимого отбора (такая фиксация, видимо, привела бы к вымиранию популяции).

Выявленный генетический полиморфизм системы размножения у *D. magna* аналогичен отмеченному ранее у филогенетически далекого вида *D. pulex* (Innes, Dunbrack, 1993). Это означает, что эволюция NMP клонов у циклических партеногенетиков может быть нередким явлением. Более того, наши данные указывают на частичную самцовую специализацию MP клонов, сосуществующих

с NMP клонами, что говорит о возможной эволюции не только генотипов с супрессией мужской функции, но и генотипов с супрессией женской функции. Однако полная потеря женской функции у дафний вряд ли возможна, поскольку самки необходимы для увеличения численности популяции даже у MP клонов.

Глава 4. РОЛЬ ДИАПАУЗИРУЮЩИХ ЯИЦ И АКТИВНЫХ СТАДИЙ В СЕЗОННОЙ ДИНАМИКЕ ДВУХ СОСУЩЕСТВУЮЩИХ ВИДОВ *DAPHNIA*

В пруду Московского зоопарка, молодь *D. magna* появлялась в планктоне вскоре после схода льда. Первые взрослые самки *D. magna*, несущие партеногенетические кладки появлялись в конце апреля – начале мая. После этого численность популяции быстро увеличивалась и через несколько недель достигала пика. Резкое увеличение численности популяции сопровождалось падением плодовитости, с последующим снижением численности популяции, в разной степени выраженным в разные годы. Гамогенез отмечен в популяции *D. magna* почти исключительно в конце сезона. В то же время некоторое количество самцов появлялось каждый год в июне. Осенний период гамогенеза начинался в конце августа или начале сентября, в середине сентября доля эфиппидальных кладок резко возрастала, быстро достигая 100%.

D. pulex в одни годы после схода льда представлена только молодью, в другие годы - взрослыми самками с большими кладками партеногенетических яиц. Динамика популяции *D. pulex* была сходна с таковой *D. magna*. Однако в отличие от нее, в конце сезона часть самок *D. pulex* продолжала размножаться партеногенетически, производя самок.

Некоторые особенности стратегии перехода исследованных видов к диапаузе, на первый взгляд, представляются плохо адаптированными к условиям конкретного сезона. Так, оба исследованных вида каждый год давали некоторое количество самцов в начале сезона, у *D. magna* крайне немногочисленные эфиппидальные самки появлялись в это время лишь однажды, а у *D. pulex* дважды, в отсутствие самцов. Таким образом, и раннее производство самцов обоими видами, и раннее производство эфиппидальных яиц *D. pulex*, видимо, представляют

собой в исследованных популяциях напрасную трату ресурсов. Еще одним примером неадаптивности является неполный переход к диапаузе в популяции *D. pulex* в годы, когда зимние условия не позволяли перезимовать активным особям. Такое неадаптивное поведение может объясняться распределением рисков (bet-hedging), при котором в непредсказуемых условиях жизненные стратегии, очевидно неадаптивные во многие годы, обеспечивают выживание или большое преимущество в редкие крайне неблагоприятные сезоны.

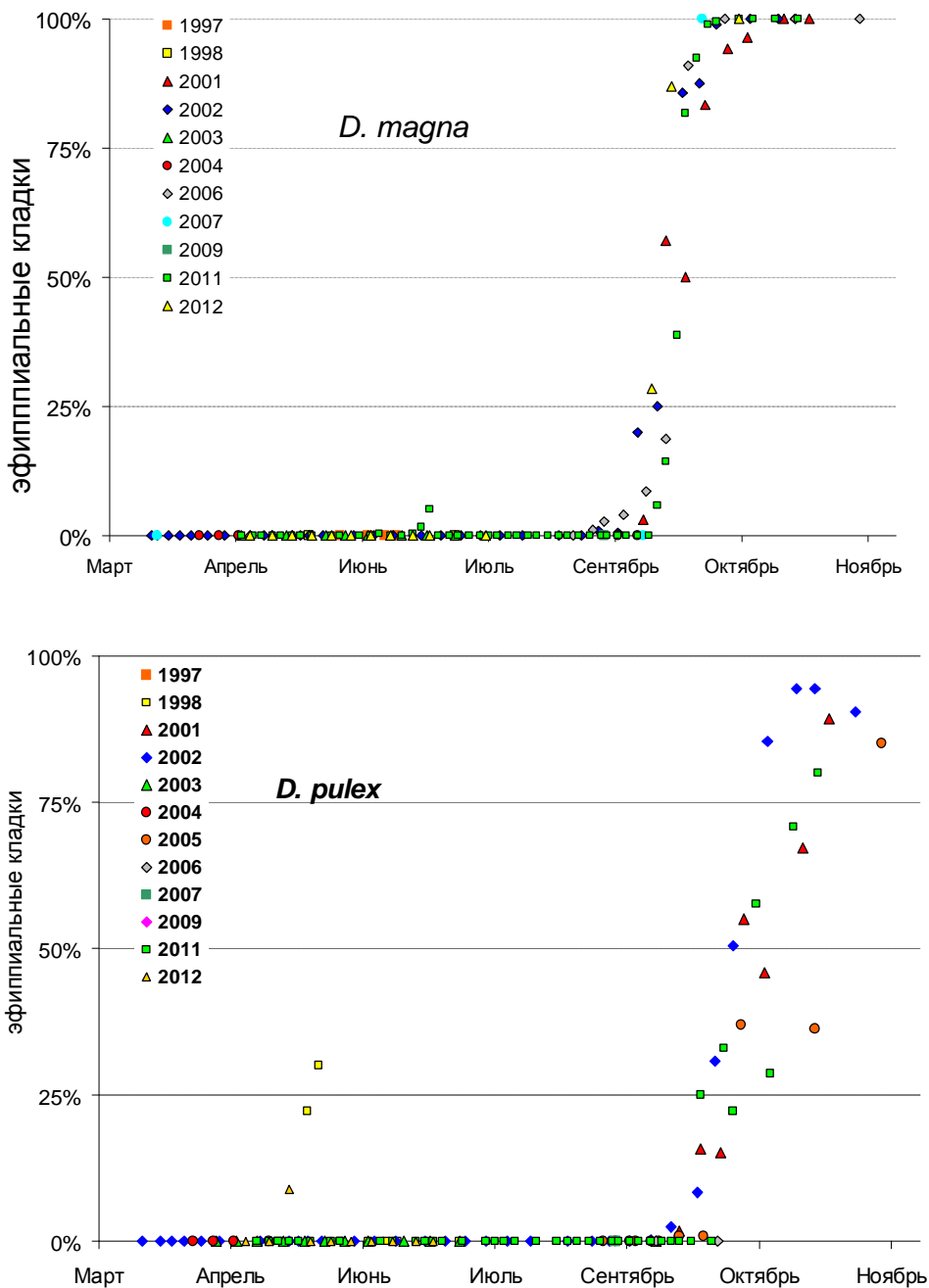


Рис. 4.1 Доля эфиппигальных кладок среди общего числа кладок *D. magna* и *D. pulex* в пруду Московского зоопарка (данные за несколько сезонов наблюдений).

Глава 5. РЕАКТИВАЦИЯ ПОКОЯЩИХСЯ ЯИЦ *DAPHNIA MAGNA*: ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Нами наблюдался ответ на отбор как на ранее/позднее- вылупление, так и на вылупление при повторной стимуляции. Уже в первом туре отбора на ранее/позднее вылупление отмечено достоверное различие между «ранней» и «поздней» группами (разница средних 1.6 сут, $p < 0.0001$, Таблица 5.1). Это различие сохранялось и при втором туре отбора, где отбор родителей и ответ на отбор проводился при разной температуре (разница 1.4 суток при температуре 10°C, $p < 0.0001$, Таблица 5.1).

Опыты по вылуплению эфиппиумов, отложенных в одно и то же время самками, взятыми из природной популяции и инкубированными при 0°C одну неделю или 1, 2 или 3 месяца, показал, что успех вылупления возрастает с увеличением времени инкубации, так что при 1-недельной инкубации вылупление полностью отсутствует, а при 3-месячной инкубации максимально (Рис. 5.3).

Таблица 5.1. Реакция на отбор на ранее и позднее вылупление при I стимуляции.

F	t° отбор	t° результат	группа отбора	среднее время вылупления	N	P (критерий Стьюдента)
F ₁	5°C	5°C	раннее	18,6	332	<0,0001
			позднее	21,2	240	
F ₂	5°C	10°C	раннее	8,9	116	<0,0001
			позднее	10,3	83	

Таблица 5.2. Реакция на отбор на вылупление при повторной стимуляции.

Режим отбора	N	Доля от общего числа вылуплений (объединенные выборки для каждой линии отбора)	
		при I стимуляции	при II стимуляции
На ранее вылупление при 1 ^{ой} стимуляции	153	76% (0.68-0.82)*	24% (0.18-0.32)*
На позднее вылупление при 1 ^{ой} стимуляции	83	80% (0.69-0.88)*	20% (0.12-0.31)*
На вылупление при 2ой стимуляции	43	19% (0.08-0.33)*	81% (0.67-0.92)*

* - 95% доверительные интервалы

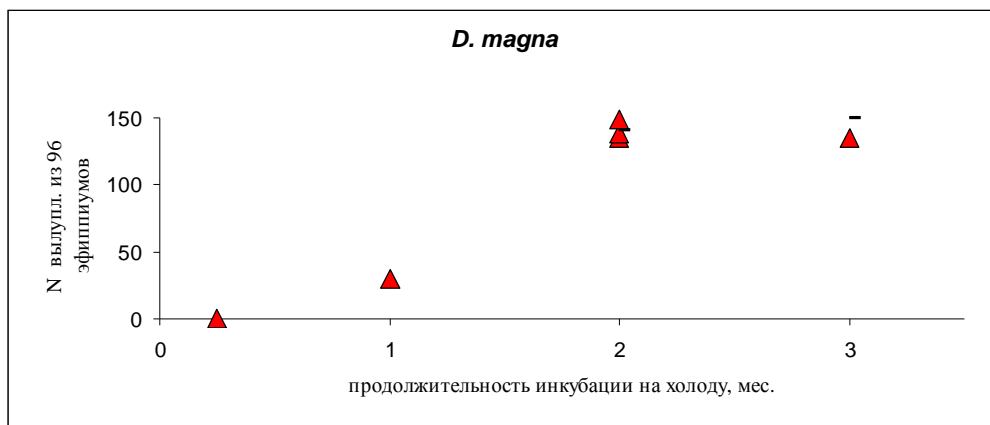


Рис. 5.3. Количество молоди, вылупившейся из 96 эфиппимумов, в зависимости от времени инкубации эфиппимумов, взятых из одновозрастной выборки природных эфиппиумов.

Полученные результаты наглядно показывают наличие генетической компоненты в реакции покоящихся эмбрионов на факторы, способствующие прекращению диапаузы, возобновлению развития и выходу молоди из эфиппиума. В то же время, полученные данные надо с большой осторожностью экстраполировать на природную ситуацию.

Глава 6. СТРАТЕГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПОКОЯЩИХСЯ ЯИЦ И ВЫЛУПЛЕНИЯ ИЗ НИХ В НЕПРЕДСКАЗУЕМЫХ СЕЗОННЫХ БИОТОПАХ

Оптимальные формы перехода к откладке диапазирующих яиц (ДЯ) были определены для нескольких значений максимальной скорости роста популяции $\exp(r)$ и стандартного отклонения продолжительности благоприятного сезона σ . На каждом графике рис. 6.1 представлены три кривые, соответствующие различной доле вылупления покоящихся яиц: $G=1$ (банк яиц отсутствует), $G = 0.5$ (небольшой банк яиц) и $G = 0.01$ (большой банк яиц). Видно, чем более изменчива длина сезона, тем в большей степени оптимальный переход к продукции ДЯ зависит от G . При низкой доле вылупления, G модель предсказывает полный и резкий переход (сплошные линии на Рис. 6.1). Чем выше скорость роста популяции и больше дисперсия длины сезона, тем более поздний и плавный оптимальный переход предсказывает модель. Очень большая скорость

популяционного роста при наибольшей изменчивости длины сезона благоприятствует «рискованным» стратегиям, при которых время перехода превышает среднюю длину сезона. Плотностная зависимость продукции ДЯ и смертность покоящихся стадий не меняют качественно предсказания модели.

При одновременной оптимизации стратегий производства покоящихся яиц и доли вылупления из эфиппиумов, результаты моделирования в большой степени зависят от скорости роста активной части популяции. При низких значениях r модель предсказывает низкую долю вылупления и резкий переход к диапаузе. По мере повышения значений r , оптимальная доля вылупления быстро достигает 1, практически независимо от изменчивости длины сезона (Рис 6.4).

Мы описали эволюцию ковариации между двумя механизмами, защищающими популяцию от непредсказуемости длины сезона. В природе, однако, доля вылупления может быть ограничена очень низкими или очень высокими значениями. Например, лишь очень немногие ДЯ *Daphnia* вылупляются, если покрыты 1–см слоем жидкого ила (Галимов, Ямпольский, неопубликованные данные). В прудах со скальным дном, в которых все эфиппиумы подвергаются воздействию солнечного света весной, популяции *Daphnia* могут быть ограничены полным отсутствием банка покоящихся яиц, в то время как в прудах и озерах с илистым дном многие эфиппиумы могут быть захоронены в илу и оставаться в состоянии диапаузы долгие годы (Hairston et al., 1995), пока случайное перемешивание донных осадков не вынесет их на поверхность.

Параметры перехода к диапаузе также могут быть ограничены в природных популяциях. Скорость перехода к производству покоящихся яиц q , может быть ограничена временем реакции.

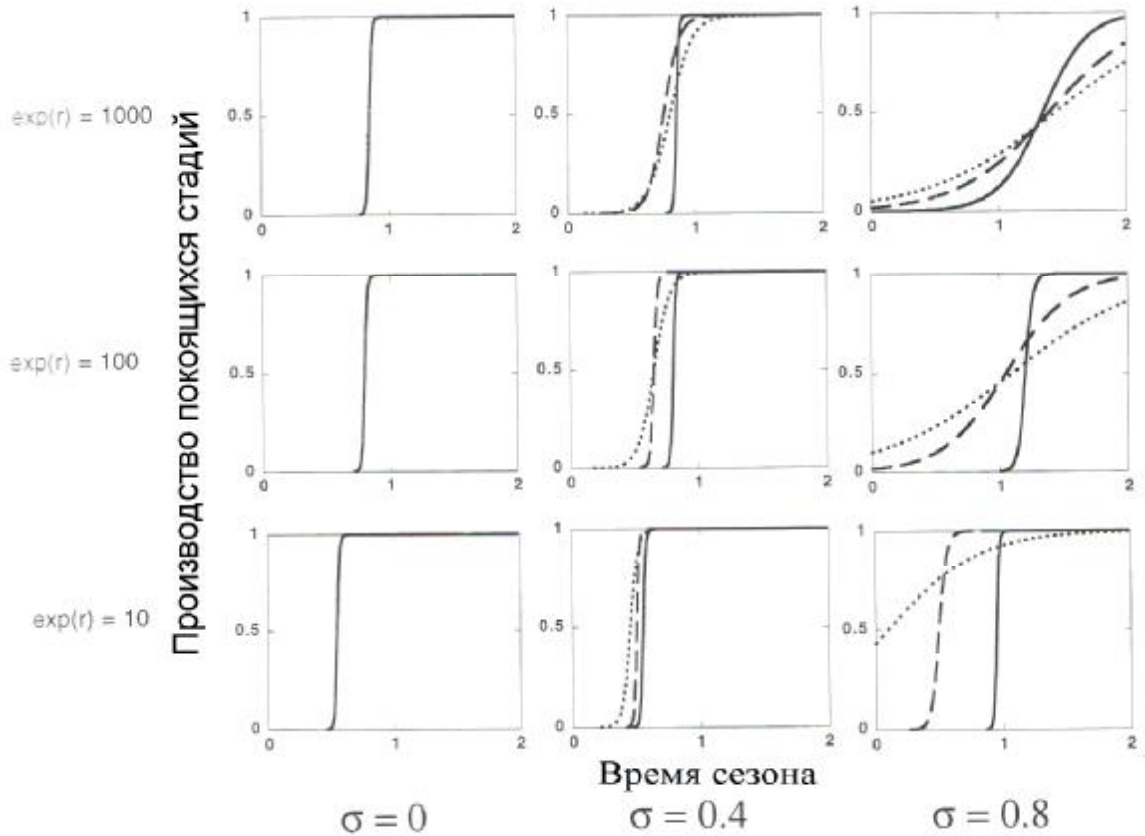


Рис. 6.1. Оптимальные стратегии производства ДЯ при экспоненциальном росте популяции. По оси ординат: доля ресурсов, вкладываемых в откладку покоящихся яиц.

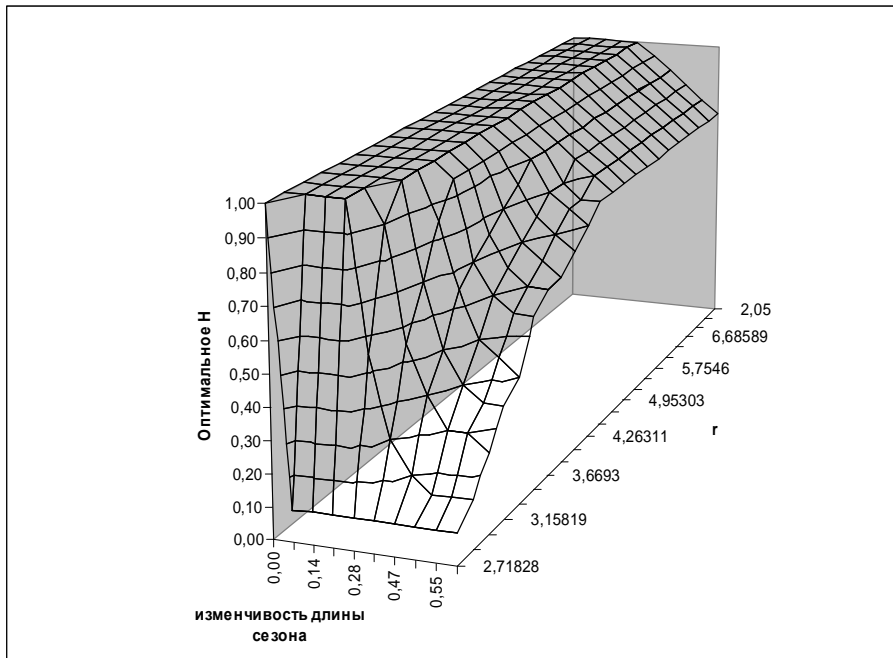


Рис. 6.4. Оптимальная ежегодная доля вылуплений из банка яиц в случае, когда оптимизируется одновременно доля вылупления и стратегия продукции покоящихся стадий. r – максимальная скорость прироста численности (в отличие от прироста на остальных рисунках); s – стандартное отклонение длины сезона.

ВЫВОДЫ

1. Многие популяции *Daphnia magna* состоят из двух типов клонов, первые из которых способны к производству самок, самцов и покоящихся яиц (самцовые клоны), а вторые дают только самок и покоящиеся яйца (бессамцовые клоны).

2. Неспособность давать самцов наследуется как доминантный моногенный признак, в том числе при межпопуляционных скрещиваниях.

3. В редких случаях, неспособные к производству самцов клоны способны давать аутомиктическое потомство, что изредка встречается и у клонов способных к производству самцов.

4. Холодостойкие виды, у которых часть партеногенетических самок способна переживать теплые зимы в активном состоянии, могут иметь преимущество перед полностью диапазирующими видами в случае теплых зим, а также в случае потепления климата.

5. Реакция покоящегося эмбриона на стимулы возобновления развития определяется генетически, при этом имеется значительная внутривидовая изменчивость по времени реакции.

6. Для возобновления развития покоящихся яиц *D. magna* и *D. pulex* требуется достаточно продолжительное хранение на холоде, продолжительность которого прямо влияет на долю активизирующихся яиц.

7. Разновременный переход к производству покоящихся яиц и разновременный выход из диапаузы представляют собой альтернативные, но, возможно, взаимозависимые стратегии адаптации к непредсказуемым условиям обитания.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах из списка ВАК

1. Крылов, П.И. Зоопланктон кислотного озера: стратегия выживания в условиях дефицита пищи / П.И. Крылов, Е.А. Полякова, **Я.Р. Галимов** // Труды Зоологического Института РАН. – 1997. – Т. 272. – С. 87–106.
2. **Galimov, Y.R.** Optimal strategies of investment in resting stage production and germination in unpredictable seasonal environments / Y.R. Galimov, L.Yu. Yampolsky // *Ergebnisse der Limnologie*. – 1998. – V. 52. – P. 313–326.
3. Yampolsky, L.I. Evolutionary genetics of aging in *Daphnia* / L.L. Yampolsky, **Ia.R. Galimov** // Журнал Общей Биологии. – 2004. – Т. 66. – № 5. – P. 416- 424.
4. **Galimov, Y.** Frequency and inheritance of non-male producing clones in *Daphnia magna*: evolution towards sex specialization in a cyclical parthenogen/ Y. Galimov, B. Walser, C.R. Haag // *Journal of Evolutionary Biology*. – 2011. – V. 24. – № 7. – P.1572–1583.
5. Svendsen, N. Genomic identification of hidden modes of reproduction: Self-fertilization vs. automictic parthenogenesis in *Daphnia* / N. Svendsen, S.M.O. Reisser, M. Dukić, V. Thuillier, A. Ségard, C. Liautard-Haag, D. Fasel, E. Hürlimann, T. Lenormand, **Y. Galimov**, C.R. Haag // *Genetics*. – 2015. – V. 201. – № 3. – P. 1143–1155.

Материалы конференций и тезисы

6. **Галимов, Я.Р.** Вылупление эфиппидальных яиц *Daphnia*: внутривидовая и межвидовая изменчивость времени / Я.Р. Галимов, К.Ю. Попадьян // Международная конференция "Проблемы гидроэкологии на рубеже веков". Санкт-Петербург: ЗИН РАН. – 2000. – С. 28.
7. **Галимов, Я.Р.** Гендерная специализация клонов *Daphnia* / Я.Р. Галимов // Cladocera: систематика и биология. Международная школа-конференция. ИБВВ РАН: Борок – 2007. – С. 19.
8. **Galimov, Y.R.** Genetic variation of diapause and sex in *Daphnia magna*: Raw material for genomic studies / Y.R. Galimov // Swiss-Russian Seminar Cladocerans (Crustacea) as model organisms for ecological and evolutionary research: approaching the age of genomics. Fribourg (Switzerland): University of Fribourg. – 2010. – P. 7.
9. Haag, C. Evolution of a partially genetic sex determining system in *Daphnia magna* / C. Haag, **Y.R. Galimov** // 1st Joint Congress on Evolutionary Biology. Ottawa (Canada): the Canadian Society for Ecology and Evolution (CSEE) etc. – 2012. – P. 91.