

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБР РАН)

На правах рукописи

ГАЛИМОВ Ян Рудольфович

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

Специальность – 03.02.10 – Гидробиология
(Биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2016 г.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ДИАПАУЗА, ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА У <i>DAPHNIA</i>	
1.1. Жизненный цикл ветвистоусых ракообразных рода <i>Daphnia</i> : общий очерк	12
1.2. Банк покоящихся яиц	17
1.3. Фенология диапаузы	18
1.4. Механизмы диапаузы	23
1.5. Заключение главы	30
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА	
2.1 Сбор материала в природных популяциях.....	31
2.1.1. Сбор и обработка планктонных проб.....	31
2.1.2. Сбор донных отложений	32
2.1.3. Получение одновозрастной выборки эфиппиумов.....	33
2.2. Работа с культурами <i>Daphnia</i> в лаборатории.....	34
2.2.1. Получение и поддержание клональных культур.....	34
2.2.2. Реактивация эфиппиальных яиц.....	35
2.2.3. Работа с массовыми культурами на открытом воздухе.....	36
2.2.4. Стимуляция производства самцов.....	37
2.2.5. Определение пола потомства в природных условиях.....	39
2.2.6. Скрещивание лабораторных клонов	40
2.2.7. Исследование реактивации покоящихся яиц	41
2.3. Статистическая обработка данных	45
2.4. Молекулярный анализ	46
2.4.1. Выделение, амплификация и определение последовательности ДНК	46

2.4.2. Определение происхождения эфиппидальных яиц в культурах бессамцовых клонов	47
2.5. Модель	51

Глава 3. ПОЛОВАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ КЛОНОВ *DAPHNIA MAGNA*: РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И НАСЛЕДОВАНИЕ НЕСПОСОБНОСТИ К ПРОИЗВОДСТВУ САМЦОВ.

3.1. Введение.....	52
3.2. Распространенность и частота NMP клонов в природных популяциях <i>Daphnia magna</i>	55
3.3. Исследование продукции самцов в культурах вне помещения.....	57
3.4. COI гаплотипы MP и NMP клонов.....	61
3.5. Популяционная динамика и половое размножение в популяции MZ.....	62
3.6. Соотношение полов в природных кладках MP и NMP клоны.....	62
3.7. Наследование NMP.....	63
3.8. Обсуждение результатов главы.....	64
3.9. Выводы главы.....	71

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

4.1. Введение.....	72
4.2. Динамика активной части популяции.....	74
4.3. Банк покоящихся яиц.....	82
4.4. Обсуждение результатов главы.....	83

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

5.1. Введение	89
5.2. Реакция на отбор сроков реактивации.....	91

5.3. Зависимость успеха вылупления от продолжительности инкубации.....	94
5.4. Обсуждение результатов главы	95

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

6.1. Введение.....	98
6.2. Построение модели.....	100
6.3. Результаты модельного эксперимента.....	104
6.4. Обсуждение результатов главы	111

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	119
------------------------	------------

ВЫВОДЫ	121
---------------------	------------

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	122
-----------------------------------------------	------------

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Исследование фенотипической и генотипической изменчивости живых организмов представляет собой магистральное направление биологии в целом. Благодаря бурному развитию молекулярной биологии, большинство современных исследований изменчивости гидробионтов 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. Более того, подобные исследования представляют собой важную самостоятельную задачу. Отметим, что изучение изменчивости считалось одной из основных задач синтетической теории эволюции (Майр 1974), и оно не потеряло актуальности к настоящему моменту. Изменчивость популяций отдельных видов по экологически важным признакам определяет их реакцию на изменения внешней среды, и, в конечном счете, обеспечивает само их существование. Ее необходимо учитывать не только на популяционном уровне, но и при исследовании сообществ различных гидробионтов.

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.

Современное исследование, проводимое для понимания связи признака и его изменчивости и условий среды должно включать:

1. Теоретическое обоснование связи признака и приспособленности организма в зависимости от условий среды путем формулирования гипотез, формализованных в виде вербальной или математической модели;
2. Сравнение предсказаний моделей с данными из природных популяций;
3. Проведение экспериментов в контролируемых условиях, позволяющих аккуратно получить дополнительные данные и фальсифицировать выдвинутые гипотезы.

В последнее время все большее число исследований по экологии и эволюционной биологии проводится на представителях рода *Daphnia* O.F. Mueller (Crustacea: Cladocera), являющихся практически идеальными объектами для подобных исследований (Lampert 2011; Smirnov 2014). Дафнии населяют пресноводные и солоноватые континентальные водоемы всех материков, включая Антарктиду (Benzie 2005). В роде *Daphnia* выделяют три подрода: *Daphnia* (*Australodaphnia*) с единственным видом - эндемиком Австралии, а также *Daphnia* s.str. и *Daphnia* (*Ctenodaphnia*), богатые видами и широко распространенные (Benzie 2005; Adamowicz et al. 2009). Судя по палеонтологическим данным и молекулярной филогении, эти подроды разделились уже как минимум к началу мелового периода (Colbourne, Hebert 1996; Kotov, Taylor 2011). По типу питания дафнии относятся к фитофагам-фильтраторам и питаются планктонными водорослями и бактериями, хотя в их рацион может входить мелкий зоопланктон, а также донные обрастания (Смирнов 1975; Fryer 1991). Размер взрослых дафний в зависимости от вида составляет от менее чем 1 до 5 мм (Benzie 2005).

Для этих ракообразных характерны: (1) Ярко выраженные границы популяций (как и в случае большинства других гидробионтов, в одном водоеме имеется одна популяция: границы популяции совпадают с границами водоема); (2) Удобство исследования состава природных популяций: различия между диапаузирующим и недиапаузирующим потомством, простота «считывания» признаков диапаузы и гамогенеза: четкий половой диморфизм, яркие

анатомические различия между яйцами с прямым развитием и диапаузирующими яйцами (Benzie 2005); (3) Возможность прямой оценки плодовитости самок в природе (поскольку они вынашивают яйца в выводковой камере) (Гиляров 1987); (4) Значительный объем полевых и лабораторных данных по биологии ряда видов, являющихся модельными объектами современной биологии (Benzie 2005; Lampert 2011); (5) Циклический партеногенез: возможность быстрого получения неограниченного числа генетически идентичных особей; (6) Возможность скрещивания особей из различных генетических линий в лаборатории; (7) Разработанные молекулярные методы, в том числе известные молекулярные маркеры и расшифрованная геномная последовательность (Colbourne et al. 2011; Ebert 2011).

Никоим образом не претендуя на полноту охвата проблем эволюционной экологии диапаузы и гамогенеза *Daphnia*, решение которой, безусловно, не укладывается в рамки диссертационной работы, и вообще, работы отдельного исследователя, автор попытался применить некоторые указные подходы при исследовании 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. Исследование динамики двух видов *Daphnia* в природном водоеме позволило впервые получить многолетние подробные данные по их динамике *Daphnia* и изучить роль межгодовых климатических изменений и диапаузы в динамике этих видов. 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 и значимость работы. Настоящая работа относится, безусловно, к области фундаментальных, а не прикладных исследований. Тем не менее, полученные результаты могут в дальнейшем найти практическое применение, в частности, для экологического хозяйствования может иметь значение сделанное в главе 3 наблюдение, согласно которому в менее суровые зимы могут получать преимущество виды, лучше адаптированные к низким температурам, а обнаруженные нами бессамцовые клоны *Daphnia* удобные при работе с лабораторными культурами (например, при проведении токсикологических исследований) и исследования различных аспектов

физиологии и генетики ракообразных. В ходе работы собрана достаточно крупная коллекция донных осадков, содержащих покоящиеся стадии гидробионтов из различных водоемов России и других стран. Эта коллекция может использоваться и уже активно используется, в том числе при выполнении работ, не связанных с темой настоящей диссертации, в нескольких лабораториях.

Полученные результаты закладывают, с одной стороны, основу для исследования генетических основ диапаузы и определения пола *Daphnia*, а с другой – позволяют интерпретировать приспособительное значение изменчивости по этим признакам. Значение таких данных велико, в том числе, потому, что *Daphnia* является одним из основных модельных организмов экологической генетики и геномики.

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.

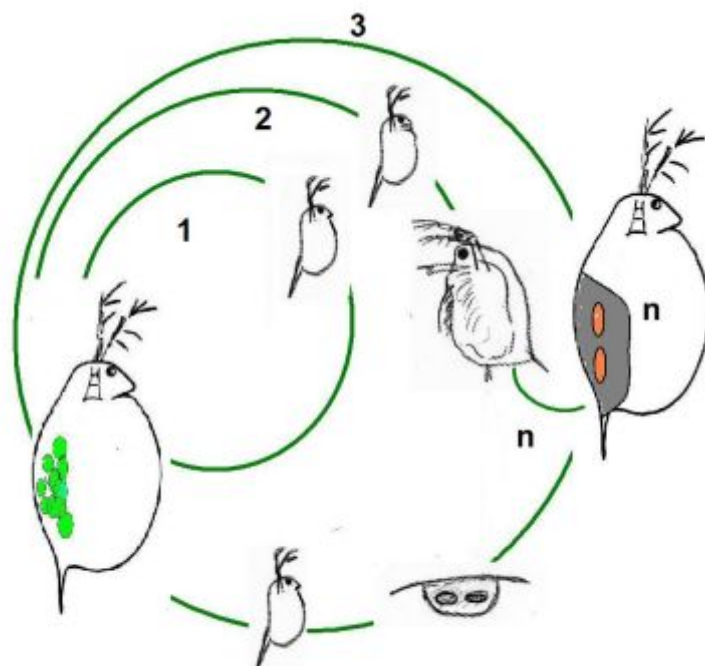
Благодарности. Настоящая работа посвящается памяти профессора МГУ А.М. Гилярова, под руководством которого она была начата. Автор благодарит А.А. Котова за помощь на разных этапах подготовки диссертационной работы, а также Л.Ю. Ямпольскому за советы по выбору направлений данного исследования. В подготовке 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, Е.С. Задереев, В.Р. Алексеев и 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. Настоящее исследование поддержано грантами РФФИ №14-04-01149 и 16-04-01579.

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

1.1. Жизненный цикл ветвистоусых ракообразных рода *Daphnia*: общий очерк

У представителей рода *Daphnia* (как и среди Cladocera в целом) известно два типа жизненных циклов: *облигатный партеногенез* и *циклический партеногенез* (Hebert 1981, 1987; Dumont, Negrea 2002; Benzie 2005).

При циклическом партеногенезе (Рисунок 1.1) – типичном жизненном цикле *Daphnia* – периоды партеногенетического размножения чередуются с периодами гамогенеза. У дафний, в отличие от некоторых других животных с циклическим партеногенезом (например, тлей, и даже других представителей ветвистоусых ракообразных (Данилевский 1961; Мордухай-Болтовской, Ривьер 1987)), не существует четкого разделения партеногенетического и полового поколения (Смирнов 1975). Каждая отдельная самка *Daphnia* способна производить три типа яиц: (1) партеногенетические, диплоидные, развивающиеся без задержки в самок, (2) партеногенетические, диплоидные, развивающиеся без задержки в самцов, и (3) половые, гаплоидные, образующиеся путем мейоза и требующие оплодотворения. Первые два типа яиц называют также субитанными, а покоящиеся яйца дафний и других представителей отряда Anomopoda часто называют эфиппидными (см. ниже про эфиппиум), хотя это и не совсем правильно, поскольку в некоторых популяциях самки способны откладывать в эфиппиум неоплодотворенные диплоидные яйца.



Жизненный цикл: циклический партеногенез

Рисунок 1.1. Жизненный цикл *Daphnia* при циклическом партеногенезе.

Во время партеногенетического размножения (Рисунок 1.1) в яичниках самки образуются диплоидные яйца, которые начинают развиваться сразу после выхода из вителлария яичника в специальную выводковую камеру, расположенную на спинной стороне тела под раковинкой (Zaffagnini 1987). Эмбрионы, которые могут быть как самками, так и самцами, в этом случае не прекращают своего развития и через непродолжительное время выходят из выводковой камеры матери. По выходу из последней (иногда с незначительной задержкой) они проходят последнюю эмбриональную линьку (Kotov, Voikova 2001), после которой начинают самостоятельно питаться. Самка после выхода молоди линяет и, при благоприятных условиях, через короткое время после линьки закладывает в выводковую камеру следующую порцию партеногенетических яиц.

При гамогенетическом размножении в яичниках самки образуются гаплоидные яйцеклетки, в семенниках самцов образуется гаплоидная сперма. Самец спаривается с самкой, оплодотворяя яйца, которые самка, как и при партеногенетическом размножении, закладывает в выводковую камеру (Benzie 2005). Яйца дафний, предназначенные для переживания неблагоприятных

условий в состоянии диапаузы, значительно отличаются от яиц, развивающихся без задержки (субитанных) как анатомически (Lubbock 1857; Макрушин 1970, 1985), так и по биохимическому составу (Abrusan et al. 2007, Pauwels et al. 2007). Помимо этого, у *Daphnia*, как и у всех прочих представителей отряда Anomopoda, перед откладкой покоящихся яиц кутикула раковинки, окружающей яйцевую камеру, уплотняется, меняет свою структуру, ее пигментация усиливается, в результате образуется особая защитная структура – эфиппиум (*ephippium*). Оплодотворенные яйца в течение некоторого времени развиваются, затем на стадии гастрюлы развитие прекращается, и эмбрионы впадают в диапаузу (Макрушин 1966; 1970). При линьке самки диапаузирующие эмбрионы остаются внутри эфиппиума, который отделяется вместе с личинной шкуркой, или экзувием (*exuvium*), и затем опускается на дно водоема или всплывает на поверхность (Котов 2013). Через некоторое время (обычно после смены сезона) развитие эмбрионов в эфиппиуме возобновляется. Молодь выходит из эфиппиума перед последней эмбриональной линькой. Вся вышедшая из покоящихся яиц молодь практически всегда является самками (возможным исключением является *Daphnia ephemeralis* (Schwartz, Hebert 1987b), но данное наблюдение должно быть специально проверено).

Уже ранние работы подтвердили отсутствие менделевского расщепления фенотипических признаков (размеров тела и отдельных органов, склонности к производству гинандроморфов) при партеногенезе и наличие такого расщепления при гамогенезе у *Daphnia* (Agar 1914a; Banta, Wood 1928a, b).

Цитогенетические исследования (Ojima 1954 а, б; Ojima 1958; Zaffagnini, Sabelli 1972; Hiruta et al. 2010, Hiruta, Tochinali 2012) показали, что при образовании покоящихся яиц *Daphnia* происходит нормальный мейоз с рекомбинацией и редукцией числа хромосом, в то время как при образовании партеногенетических (субитанных) яиц происходит не митоз, а своеобразный редуцированный мейоз, при котором первое деление останавливается на стадии ранней анафазы, II деление проходит нормально, с отделением направительного тельца. Таким образом, при откладке партеногенетических яиц сохраняется

диплоидный набор хромосом. При этом в оогенезе отмечено образование хромосомных тетрад, однако цитогенетические данные не позволяют подтвердить или опровергнуть прохождение рекомбинации между гомологичными хроматидами при партеногенетическом размножении *Daphnia*.

Подтверждение сохранения потомством генотипа матери при партеногенезе и нормального менделевского расщепления при гамогенезе было получено и при анализе наследования генетических маркеров: изоферментном анализе (например, Hebert, Ward 1972), микросателлитном анализе и RAD-секвенировании (например, Cristescu et al. 2006; Routtu et al. 2010).

Таким образом, в типичном жизненном цикле дафний чередуются партеногенетическое и гамогенетическое размножение. При этом при партеногенетическом размножении яйца образуются путем редуцированного мейоза, без генетической рекомбинации и с сохранением пloidности. Такое потомство генетически полностью идентично родителям. Образующиеся при партеногенезе яйца обычно относятся к «субитанному» типу, развивающемуся без задержки в выводковой камере матери.

При гамогенетическом размножении (гамогенезе) сперма у самцов и яйца у самок образуются в результате нормального мейоза, с рекомбинацией и с потерей пloidности. Гамогенетическое потомство обладает генотипом, отличающимся от генотипа родителей. Образующиеся при гамогенетическом размножении яйца *Daphnia* всегда относятся к «эфиппимальному» типу, т.е. защищены от воздействия внешних условий различными механизмами и развиваются с более или менее продолжительным периодом покоя, так что окончание развития проходит в эфиппиеуме.

Следует уточнить, что помимо циклического партеногенеза, у дафний встречается и облигатный партеногенез, который отличается тем, что при образовании диапаузирующих яиц ооциты не претерпевают редукционного деления (Hebert 1981; Dumont, Negrea 2001). Отложенные яйца сохраняют диплоидность (или более высокую пloidность в случае полипloidных популяций) и не требуют оплодотворения. В этих случаях исключение мейоза при

образовании диапаузирующих яиц, видимо, связано с межвидовой гибридизацией и произошло сравнительно недавно (Lynch et al. 2008, Tucker et al. 2013). Облигатный партеногенез широко распространен в группе видов *D. pulex* и приурочен преимущественно к периферии видовых ареалов, районам с экстремальным (арктическим или засушливым) климатом (Haag, Ebert 2004). Отметим, что у *Daphnia magna* облигатный партеногенез неизвестен.

Еще одно уточнение необходимо сделать в отношении неизменного наследования генотипа матери при партеногенетическом размножении. В нескольких работах показано наличие у *Daphnia* генетической конверсии, приводящей к потере гетерозиготности по отдельным локусам (McTaggart et al. 2007; Omillian et al. 2006). Такая рекомбинация хорошо известна при митотическом делении соматических клеток других организмов, в том числе в опухолевых клетках человека. При этом частота амейотической рекомбинации, видимо, зависит от генотипа линии и составляет менее 5×10^{-4} за партеногенетическое поколение, т.е. несравнима с частотами рекомбинации при гамогенетическом размножении. Вероятность обнаружения этого события в обычных генетических экспериментах крайне мала.

Третье, и последнее, уточнение относится к возможному наличию у *Daphnia*, или у *Cladocera* в целом, третьего способа размножения – аутомиктического партеногенеза. Такой способ размножения известен у родственных *Cladocera* групп (*Conchostraca*, *Notostraca* – Sassaman, 1995; Sassaman et al., 1997; Weeks et al. 2000). Предположение о доминировании такого способа размножения у *Holopedium* (*Stenopoda*, *Cladocera*) было высказано Полем Эбертом с соавторами (Ebert et al. 2007). Авторы показали с использованием нескольких молекулярных маркеров (аллозимов) практически полное отсутствие гетерозигот в природных популяциях *Holopedium*, что, наряду с крайне редкой встречаемостью самцов, указывает на аутомиксис как на наиболее вероятный способ размножения *Holopedium*. Однако в силу сложности культивирования этого вида, недостаточной информативности молекулярных маркеров, а также лишь эпизодического сбора проб, авторам не удалось убедительно доказать, что

наблюдаемая картина не связана, например, с эффектом основателя или самооплодотворением.

1.2. Банк покоящихся яиц

Жизненный цикл всех видов дафний включает эмбриональную диапаузу, т.е. производство эфиппальных яиц. Во многих временных и сезонных водоемах только производство эфиппальных яиц позволяет популяции пережить неблагоприятный период или сезон, во время которых погибает активная часть популяции (взрослые особи, молодь, партеногенетические эмбрионы). В некоторых случаях дафнии встречаются в активной фазе в планктоне круглый год, а эфиппальные яйца производятся лишь спорадически и в небольших количествах. Тем не менее, взяв пробу осадков из любого водоема, населенного дафниями в течение сколько-нибудь продолжительного времени, мы обнаружим в нем эфиппиумы с покоящимися эмбрионами дафний (Allen 2010; Vandekerkhove et al. 2005; Brendonck, De Meester 2003, Mergeay et al. 2004).

Можно сказать, что любая популяция дафний состоит из планктонной части и диапазирующей части. Планктонная часть представлена активными и сравнительно короткоживущими особями. Диапазирующая часть, или банк покоящихся яиц, представлена покоящимися эмбрионами, часто сохраняющими жизнеспособность в течение многих лет. По аналогии с почвенным банком семян растений, совокупность покоящихся стадий на дне водоемов называют «банком» покоящихся яиц (Hairston 1996). В природных популяциях *Daphnia* численность такого банка сравнима с численностью активной части популяции. Например, в озере Онейда плотность эфиппальных яиц *Daphnia* в донных осадках составляет до $8 \times 10^4/\text{м}^2$, в то время как численность планктонной популяции в течение года меняется от практически нулевой до $4 \times 10^5/\text{м}^2$ особей на квадратный метр (Caceres 1998). По данным Вульфа и Карвальо (Wolf, Carvalho 1989; Carvalho, Wolf 1989) численность банка покоящихся яиц *Daphnia* комплекса видов *hyalina*

x galeata *x cucullata* может даже превышать максимальную численность популяции в планктоне ($2 \times 10^4 \text{ м}^{-2}$ и менее 10^4 м^{-2} , соответственно).

1. 3. Фенология диапаузы

Населенные дафниями водоемы очень разнообразны по размеру и продолжительности периода заполнения водой (Benzie 2005). Наличие воды (и, следовательно, существование популяции *Daphnia*) в мелководных водоемах в жарком и сухом климате может быть ограничено несколькими днями или неделями, которые проходят от сильного дождя до пересыхания водоема. Мелководные водоемы в высоких широтах Арктики и Антарктики оттаивают на один-два месяца, однако из-за низкой температуры развитие *Daphnia* идет медленно, и до замерзания водоема успевает смениться только 1-2 поколения. В таких **короткоживущих популяциях**, откладка покоящихся яиц происходит в течение практически всего пригодного для жизни активных особей периода. Так некоторые виды группы *D. pulex* (например, *D. middendorffiana*) обитают в водоемах крайнего севера и высокогорных озерах, где за короткое холодное лето не хватает времени для смены поколений. В этом случае самки, вылупившиеся из покоящихся яиц, часто откладывают эфиппиумы уже при первом размножении (Edmondson 1955; Stross 1969a; Stross, Kangas 1969; Yurista, O'Brien 2001; Perez-Martinez et al. 2007). Короткоживущие популяции часто являются облигатно-партеногенетическими, самцы в них обычно не встречаются. Сходная картина перехода к диапаузе (за исключением отсутствия самцов) характерна и для некоторых видов в водоемах умеренной зоны, например для *D. ephemeralis*, у которой эфиппиальные самки появляются вскоре после выхода молоди из эфиппиумов (Schwartz, Hebert 1987; Caceres, Tessier 2004a).

Популяции *Daphnia*, населяющие **временные** водоемы в более мягком климате, могут до пересыхания или промерзания водоемов дать несколько партеногенетических поколений, прежде чем полностью перейти к производству эфиппиальных яиц. В частности, такой жизненный цикл описан для *D. atkinsoni*

в Израиле (Yaron 1964), *D. chevreuxi* в Италии (Crosetti, Margaritora 1987) и *D. cf. pulex* из временных водоемов умеренной зоны США (Caceres, Tessier 2004a). Часто во временных водоемах эфиппидальные самки появляются задолго до гибели популяции, но к концу сезона их доля постепенно возрастает до 100%. Например, в скальных ваннах на финских островах Балтийского моря активные особи *D. magna* обычно присутствуют с апреля по октябрь, и за это время сменяется 8-12 партеногенетических поколений. Самцы и эфиппидальные самки появляются в популяции в небольших количествах (2-20%) уже в начале сезона, в мае (Korpelainen, 1989), но лишь к концу сезона популяции полностью переходят к диапаузе (С. Наг, личное сообщение). Ранний и неполный переход к диапаузе, в этом случае, возможно, связан с риском ранней гибели популяции из-за высыхания луж при жаркой погоде или критического повышения солености при попадании морской воды в шторм (Pajunen, Pajunen 2003).

Продолжительность благоприятного сезона зависит не только от собственно наличия воды (времени от заполнения водой или таяния до пересыхания или промерзания), но и от особенностей биологии вида. Одни и те же условия могут быть благоприятными для одного вида *Daphnia* и экстремальными для другого вида, населяющего тот же водоем. Картина перехода к диапаузе всегда отражает эти особенности. Например упоминавшаяся *Daphnia ephemeralis* из временных водоемов Северной Америки переходит к диапаузе уже в начале апреля, вскоре после освобождения водоема ото льда (Schwartz, Hebert 1987; Caceres, Tessier 2004a). К середине мая *D. ephemeralis* исчезает из планктона. Населяющая те же водоемы *D. pulex* начинает откладывать эфиппиды лишь в мае, и ее популяции сохраняются в планктоне до пересыхания водоема в июне-июле. Такое различие связано с температурными предпочтениями двух видов: *D. ephemeralis* относится к stenotherмным холодолюбивым видам, и неспособна размножаться при температуре выше 15°C, в то время как *D. pulex* прекрасно себя чувствует при летних температурах.

Популяция *D. pulicaria* обычно переживает зиму на стадии активных особей в планктоне, причем это характерно не только для озер умеренного климата

(Caceres, Tessier 2004a), но даже и для горных озер, покрытых льдом большую часть года (Gliwicz 2001; Ventura, Catalan 2005). Летом численность этого вида снижается, а в нестратифицированных озерах, где крупные *D. pulicaria* не могут укрыться от хищников и голода в холодном гиполимнионе, активная часть популяции иногда полностью погибает (Caceres, Tessier 2003). При этом для *D. pulicaria* характерен переход к диапаузе в конце весны – начале лета. Пиковая доля эфиппидальных самок зависит от степени летнего падения численности популяции. Однако в это время переход к диапаузе никогда не бывает полным, и на пике производства эфиппидов в планктоне встречаются также самки с субитанными кладками. Даже в тех водоемах, где в некоторые годы была отмечена полная гибель активной популяции, лишь 80% самок переходили перед этим к диапаузе. Там же, где летние колебания численности планктонной популяции относительно невелики, к диапаузе переходит менее половины самок (5-40% в зависимости от популяции и года) (Caceres, Tessier 2003).

В отличие от *D. pulicaria*, *D. dentifera* (иногда ошибочно определяемая как *D. rosea*), сосуществующая с *D. pulicaria* в озерах южного Мичигана, представлена в планктоне лишь с мая по декабрь (Caceres, Tessier 2004a). Переход к диапаузе у этого вида происходит осенью, перед гибелью активной части популяции, и к диапаузе переходит 100% особей. Однако и в данном случае время перехода к диапаузе не является видофическим признаком. В популяции *D. dentifera*, обитающей в более мягкой климатической зоне, часть планктонной популяции переживает зиму, и осенью к диапаузе переходит лишь около 14% самок (Shei et al. 1988).

Различия в фенологии диапаузы, соответствующие различиям в сезонной динамике, отмечены также в группе *D. longispina*, где известны как постоянные популяции с зимующими самками (Jankowski, Straile 2004); так и популяции, где зиму переживают лишь эфиппидальные яйца (Wolf, Carvalho 1989). Помимо климатических условий, наличие зимующих особей может зависеть и от трофности водоема (Smyly 1979). Роль диапаузы и зимующих особей может меняться со временем. Так, в японском озере Бива численность зимующей части

популяции *D. galeata* значительно увеличилась в 80-90-ые годы XX века, и одновременного с этим снизилось производство эфиппийных яиц. Последний факт был установлен на основании исследования содержания яиц в донных отложениях (Tsugeki et al. 2009).

В постоянных водоемах умеренного климата у дафний, как и у других кладоцер (Верещагин 1912; Frey 1982) часто наблюдаются два периода гамогенеза: весной или в начале лета, и осенью. В начале сезона откладка покоящихся яиц и производство самцов происходят на пике численности популяции и предшествует периоду угнетения популяции в результате выедания фитопланктона (clear water phase в модели PEG, см. Sommer et al. 1986), второй переход к диапаузе происходит перед остыванием водоемов в зимний период. Как уже отмечалось, интенсивность перехода к диапаузе в каждый из этих периодов может отличаться как у разных видов из одного водоема, так и в разных популяциях одного вида (Caceres 1998).

Таким образом, популяции, ежегодно исчезающие из планктона, как правило, в конце благоприятного сезона полностью переходят к половому размножению, т.е. доля эфиппийных кладок достигает в них 100% (Caceres, Tessier 2004b; Chen, Felt 1996). В тех популяциях, где часть активных особей переживает неблагоприятный сезон (хотя бы в некоторые годы), переход самок к откладке эфиппийных яиц не достигает 100% (Caceres 1998a, Jankowski, Straile 2004), и может никогда не превышать нескольких процентов. В некоторых популяциях *Daphnia* гамогенеза не отмечено вовсе (Swar, Fernando 1979), однако, скорее всего это связано с недостаточно детальным исследованием водоема.

Выход из диапаузы в природных популяциях Cladocera исследован значительно хуже, чем переход к диапаузе. Это связано с тем, что оценить количество вылупляющейся из покоящихся яиц молоди в природных условиях значительно сложнее, чем подсчитать долю самцов и эфиппийных самок в планктонных пробах. В целом, для такой оценки используют три способа: прямой подсчет вылупившихся особей с помощью «ловушек на всплытие» (Herzig 1985; De Stasio 1989, 1990; Wolf, Carvalho 1989; Caceres 1998a, Hairston et al. 2000;

Caceres, Schwalbach 2001), инкубирование отобранных в природе покоящихся яиц в условиях, близких к естественным (в водоеме или лаборатории) (Moritz 1987; Mnatsakanova, Polishchuk 1996; Caceres 1998; Caceres, Schwalbach 2001), и выявление периодов "отрицательной смертности" (Polishchuk, Ghilarov 1981; Mnatsakanova, Polishchuk 1996), когда прирост численности популяции больше, чем пополнение за счет партеногенетических яиц.

Прямые данные по выходу *Daphnia* из покоящихся яиц имеются лишь для нескольких популяций *Daphnia*, обитающих в постоянных озерах умеренного климата (видов *D. pulicaria*, *D. galeata* и *D. cucullata*; Wolf, Carvalho 1989; Caceres, 1998, Hairston et al. 2000; Caceres, Schwalbach 2001). Полученные результаты говорят о том, что вылупляющаяся молодь может вносить значительный вклад в прирост численности популяции даже в тех случаях, когда *Daphnia* представлена в планктоне в течение всего года. Было продемонстрировано (Wolf, Carvalho 1989), что пик выхода молоди *Daphnia* из покоящихся яиц приходился на весеннее время и начинался вскоре после схода льда, однако не был вполне синхронным и занимал от нескольких недель (Wolf, Carvalho 1989) до двух месяцев (Caceres 1998, Hairston et al. 2000; Caceres, Schwalbach 2001). При этом незначительное количество молоди выходило из эфиппиумов и позднее, летом. Следует отметить, что характер вылупления других представителей Cladocera со сходным жизненным циклом достаточно разнообразен: вылупление может приходиться преимущественно на весенний период (*Bosmina longirostris*, см. Hairston et al. 2000), осенний период (*Sida cristallina*, см. Arnott, Yan 2002), иметь два пика в течение сезона, весной и осенью (*Ceriodaphnia reticulata*, см. DeStasio 1990) или же происходить эпизодически в течение всего сезона (*Bosmina longispina*, см. DeStasio 1990). Возможно, описанное в литературе преимущественно весеннее вылупление *Daphnia* относится лишь к конкретным популяциям и водоемам, в которых проводились соответствующие исследования.

Кацерес и Тессье (Caceres, Tessier 2003) инкубировали эфиппиумы *Daphnia pulicaria* как в лабораторных условиях, так и в размещенных на дне природных водоемов контейнерах. Активация покоящихся яиц, отложенных непосредственно

перед началом опыта (на пике численности популяций в мае-июне), в природных условиях происходила лишь через несколько месяцев. Однако в лабораторных условиях значительная часть яиц начинала свое развитие без задержки, и при низких температурах большая часть молодежи выходила из эфиппиумов уже через несколько недель после начала опытов. Авторы показали также, что хотя в лабораторных условиях все покоящиеся яйца активировались или погибали менее чем за год, в природных условиях лишь часть (5–60%) яиц вылуплялась в течение года, однако почти все невылупившиеся яйца сохраняли жизнеспособность и в лабораторных условиях их них может быть получена молодежь.

Таким образом, соотношение активной и покоящейся частей популяции, фенология и выраженность перехода к откладке эфиппиальных яиц и выхода из диапаузы различаются от вида к виду и от популяции к популяции.

1.4. Механизмы диапаузы

Массовое производство диапаузирующих яиц и массовое производство самцов происходят в природных популяциях *Daphnia* примерно в одно и то же время. Такая синхронизация, несомненно, поддерживается отбором: производство самцов в отсутствие требующих оплодотворения яиц представляет собой напрасную трату ресурсов.

Однако физиологически производство самцов, видимо, никак не связано с производством покоящихся яиц и два этих процесса регулируются независимо. В пользу этого говорит, в числе прочего независимая потеря каждой из этих функций у различных видов *Daphnia*. У облигатно-партеногенетических клонов *Daphnia pulex*, дающих амейотические покоящиеся яйца, часто сохраняется способность давать самцов, которые, в свою очередь, дают нормальную мейотическую сперму (Innes, Hebert 1988; Lynch et al. 2008). Известны также клоны *Daphnia*, неспособные давать самцов, но дающие нормальные гаплоидные диапаузирующие яйца (Innes, Dunbrack 1993). Экспериментальные данные, полученные на нормальных клонах, дающих и мейотические яйца, и самцов,

также говорят в пользу того, что образование диапаузирующих яиц и самцов определяются различными физиологическими механизмами (DeMeester, Vanoverbeke 1999).

Чередование половых и бесполок поколений и откладка покоящихся яиц *Daphnia*, как яркий пример адаптации жизненного цикла к сезонным изменениям среды, привлекало внимание биологов уже в XIX веке. Август Вейсман считал, что чередование поколений у Cladocera определяется «внутренними ритмами», т.е. половые особи появляются через несколько партеногенетических поколений после выхода самки-основательницы клона из покоящегося яйца (Weissmann 1879, цит. по Agar 1914b). Однако эта гипотеза была отвергнута в начале XX века Агаром (Agar 1914b) и Бантой (Banta, Brown 1929; Banta 1937), показавшими, что в лабораторных культурах кладоцеры могут размножаться партеногенетически, не откладывая покоящихся яиц, в течение десятков поколений, и затем переходить к гамогенезу при изменении условий существования. Позднее Берг (Berg 1934) выдвинул гипотезу, согласно которой производство эфиппидальных яиц связано с угнетенным состоянием самки, которое, в свою очередь, может вызываться различными внешними факторами – от голодания до воздействия токсикантов. С начала XX века стало известно значительное число средовых факторов, влияющих на переход кладоцер к половому размножению и/или производству самцов (см. раздел, посвященный средовым стимулам диапаузы), однако физиологические механизмы этих переходов по-прежнему малоизученны.

Ольмстедом и Лебланом (Olmstead, Leblanc 2001, 2002) была показана прямая и однозначная зависимость доли самцов в партеногенетических кладках *D. magna* от концентрации в воде ювенильного гормона метилфарнезоата (найденного у многих ракообразных). Концентрация метилфарнезоата, равная 50 нМ вызывает появление самцов в потомстве, а при 500нМ дафнии дают только мужское потомство. Эффект гормона проявляется только в 12-часовой период восприимчивости самки (при 20° С), во время которого и определяется пол потомства. Этот период приходится на конец цикла развития яичника перед откладкой яиц в выводковую камеру, что хорошо согласуется с данными для

других кладоцер, например *Moina* (Banta, Wood 1929), согласно которым зависимость пола потомства от внешних условий сохранялась до четырех часов перед откладкой яиц.

Позднее было показано, что эндогенный синтез метилфарнезоата действительно необходим и в случае стимуляции производства самцов средовыми стимулами, а именно короткой длиной дня. Тойота и соавторы (Toyota et al. 2015) показали, что у клона *D. pulex*, который дает самцов в ответ на короткий фотопериод, эта реакция может подавляться или усиливаться за счет подавления или стимуляции синтеза метилфарнезоата соответствующим ферментом. Метилфарнезоат, видимо, связывается с транскрипционным фактором (Miyakawa et al. 2013) – димером белков Met и Src, регулируя транскрипцию ряда генов, в том в созревающем ооците (LeBlanc, Medlock 2015).

Таким образом, пол потомства предположительно определяется нейро-эндокринным сигнальным путем, при котором чувствительные нейроны воспринимают соответствующий средовой стимул, передают сигнал секреторным нейронам, выделяющим нейропептиды (возможно, сходные с аллатостатином и аллатотропином наскомых), которые регулируют синтез метилфарнезоата из фарнезоевой кислоты ферментом O-метил трансферазой фарнезоевой кислоты (FAMeT). В свою очередь, метилфарнезоат, связываясь с транскрипционными факторами Met и SRC, регулирует транскрипцию множества генов, в том числе, определяющих пол разивающейся особи.

Для синхронизации времени диапаузы с изменениями внешней среды дафнии, как и другие диапаузирующие организмы, используют ряд средовых стимулов. Однако непосредственные факторы, которые вызывают переход к диапаузе и выход из нее, очень разнообразны и часто отличаются от популяции к популяции и от клона к клону. По мере исследования экологии *Daphnia*, специалисты обнаруживают все новые факторы среды, влияющие на переход дафний к диапаузе и выход молоди из эфиппидальных яиц. Ниже мы кратко перечислим данные о связи диапаузы с условиями среды. Эти данные получены преимущественно в лабораторных экспериментах.

Переход к продукции самцов и покоящихся яиц у *Daphnia* может быть обусловлен различными факторами: недостатком пищи (*Daphnia longispina*, см. Wood, Banta 1933; *D. magna*, см. Carvalho, Hughes 1983), коротким световым днем (*Daphnia* cf. *pulex*, см. Stross, Hill 1965, 1968; Stross 1969, Stross, Kangas 1969, Ferrari, Hebert 1982; Hobaek, Larsson 1990; Korpelainen 1986). Интересно, что при удлинении светового дня переход кладацер к производству покоящихся яиц удается получить только при низкой концентрации пищи (*Scapholeberis armata*, см. Berner et al. 1991; *D. pulicaria*, см. Alekseev, Lampert 2001). Вероятно, более слабая реакция кладацер умеренного климата на длинный, чем на короткий световой день связана с тем, что весенний переход к диапаузе обычно представляет собой адаптацию не к сезонному изменению абиотических условий (в отличие от осеннего перехода перед замерзанием водоема), а к летнему снижению концентрации фитопланктона, связанного с пиком численности зоопланктона (clear-water phase). Поэтому длина светового дня не является безусловным сигналом ухудшения условий, а действует лишь в сочетании с увеличением плотности популяции или снижением концентрации пищи.

В то же время, можно ожидать безусловную длиннодневную фотопериодическую реакцию в водоемах, где абиотические условия не позволяют кладацерам переживать летний период – например, в тех случаях, когда водоемы пересыхают или летняя температура воды превышает максимально приемлемую для данного вида. Шан и Фрай (Shan, Frey 1974) показали, что максимальная продукция покоящихся яиц у клонов *Pleuroxus denticulatus* (Chydoridae) из северных популяций наблюдается при коротком дне, а у клонов из южных популяций – при длинном дне. Следует, однако, отметить, что при длинном световом дне переход к диапаузе не был полным.

Описание ФПР как длиннодневной или короткодневной не всегда точно отражает норму реакции дафний на фотопериод. Иногда максимальная продукция самцов и/или покоящихся яиц наблюдается при промежуточных значениях фотопериода (Korpelainen 1986; Shan, Frey 1974).

Для северных популяций характерно усиление фотопериодической реакции при низких температурах. На самом деле, при “летних” температурах фотопериодическая реакция может вовсе отсутствовать.

Наряду с сезонными изменениями температуры, промерзанием и пересыханием водоемов, для активных особей дафний большое значение имеет плотность популяции и связанная с ней доступность пищи. В природных популяциях увеличение плотности вызывает изменения сразу нескольких факторов, каждый из которых может реакцию дафний. При увеличении численности одновременно снижается количество доступной пищи, учащаются контакты между особями. На практике в лабораторных экспериментах также часто не удается разделить эффекты количества пищи, концентрации метаболитов в среде, частоте встреч между животными и т.д.

Химические сигналы, частота контактов и пр. Карвальо и Хьюджес (Carvalho, Hughes 1983) не наблюдали зависимости типа размножения *D. magna* от концентрации метаболитов в среде. Увеличение частоты контактов между самками, напротив, вызывало переход к гамогенезу. В то же время, в работе Хобека и Ларссона (Нобаек, Larsson 1990) было показано, что эффект плотности на продукцию самцов и откладку эфиппидальных яиц обусловлен именно метаболитами. Откладка эфиппидальных яиц у *D. magna* может быть вызвана присутствием и отсутствием в воде других, помимо метаболитов, химических соединений, например, кайромонов, выделяемых рыбами (Slusarczyk 1995; Pijanowska 1996), причем эта реакция зависит от концентрации пищи (Slusarczyk 2001). Следует, однако, отметить, что соединения, вызывающие изменения жизненного цикла Cladocera, до настоящего момента не определены, хотя информация об их свойствах постепенно накапливается (Lopatina, Zadereev 2013)

У представителей гибридного комплекса *D. galeata* x *cucullata* x *hyalina* отмечена обратная реакция: прекращение производства эфиппидальных яиц (Spraak, Voersma 2001) в присутствии рыб.

Развитие эфиппидальных яиц останавливается вскоре после их откладки в яйцевую камеру матери. В состоянии покоя, яйца находятся на стадии ранней

гастролы или стадии закладки мезодермы (Storch 1925). Считается, что для возобновления развития требуется два этапа: инкубация (фаза по классификации Данилевского 1961), и стимуляция. Другими словами, для возобновления развития эмбриона требуется сочетание определенных средовых факторов, обычно соответствующее благоприятному сезону (стимуляция). Однако сразу после откладки яйца диапаузирующий эмбрион не реагирует на такие стимулы, чувствительность к стимулам возникает с течением времени. В литературе, посвященной диапаузе других групп планктонных организмов (веслоногих раков и коловраток), период “нечувствительности” эмбриона к средовым стимулам называют рефрактерным периодом. Хотя в работах по ветвистоусым ракообразным этот термин используется реже, мы считаем его удачным и будем использовать в настоящей работе (Рисунок 1.2).

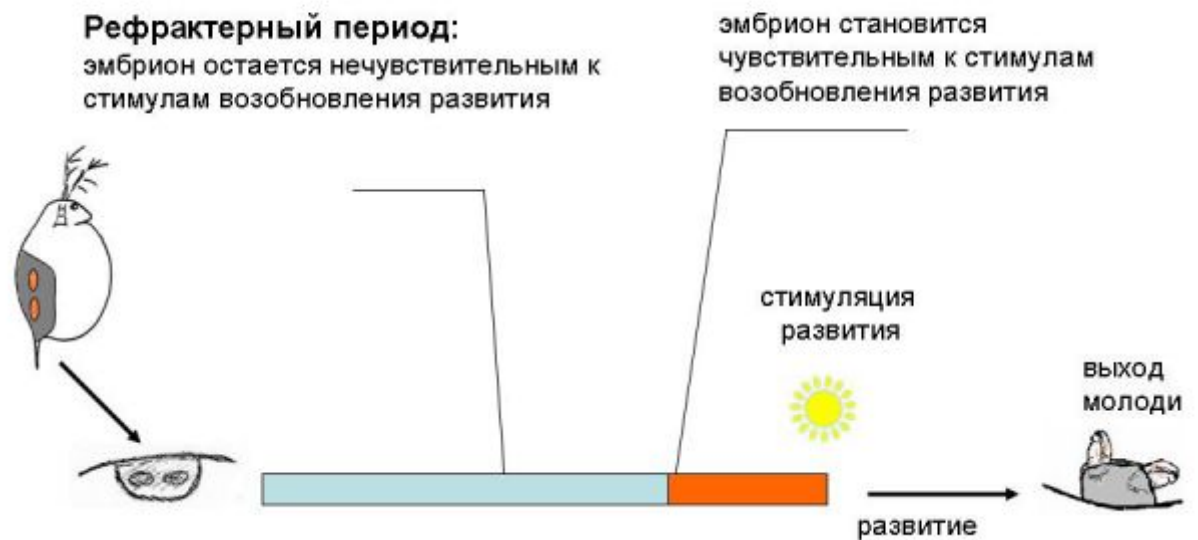


Рисунок 1.2. Стадии развития покоящегося эмбриона *Daphnia*: в большинстве случаев, эмбрион не может продолжать развитие сразу после откладки эфиппиума.

Необходимость стимуляции и инкубации у кладоцер показана в многочисленных работах, выполненных на различных видах *Daphnia* (Banta 1926; Stross 1969; DeMeester, DeJager 1993a, b). Однако у других представителей Cladocera известны исключения. Так, Вуд (Wood 1932) показала, что в большинстве своем покоящиеся яйца *Moina macroscopa* способны продолжать развитие менее чем через 48 часов после откладки, без собственно периода покоя, заканчивая развитие лишь ненамного позже субитанных яиц.

Различные виды, популяции и даже клоны, происходящие из одной популяции, могут различаться в своих требованиях к условиям на обеих стадиях диапаузы (Schwartz, Hebert 1987a). На процент выхода молоди может влиять и продолжительность инкубации, причем оптимальные сроки также различаются в популяциях одного вида. Существуют указания на то, что в ряде случаев эфиппиумам *Daphnia*, полученным при высоких температурах, требуется для возобновления развития лишь очень короткий (например, 1-недельный) период покоя (Wood 1933; Moreira dos Santos 1998). В других случаях, требуется более длительная инкубация на холоду (Moreira dos Santos 1998). Влияние более продолжительных сроков инкубации на вылупление покоящихся яиц дафний сильно зависит от происхождения эфиппиумов. Морейра Дос Сантос не наблюдала существенного снижения успеха выклева молоди из эфиппиумов *D. magna* при инкубации в течение трех лет. При изоляции *D. magna* из природных прудовых осадков автору настоящей удавалось получать потомство из 14-летних эфиппиумов. Для озерных популяций *Daphnia* известны случаи получения молоди из яиц, сохранявшихся в иле в течение нескольких десятков или даже сотен лет (Frisch et al. 2014).

В некоторых случаях для продолжения развития эфиппиальным яйцам требуется пройти два или несколько циклов инкубации и стимуляции (Pfrender, Deng 1998). Ниже мы рассматриваем некоторые факторы, инициирующие реактивацию покоящихся яиц.

Вуд и Банта (Wood, Banta 1933) добивались активации эфиппидальных яиц *D. longispina* их высушиванием и последующим замачиванием. Позднее, теми же авторами было показано, что для стимуляции эфиппидумов, полученных от некоторых клонов *D. longispina*, *D. pulex* и *Moina macropora*, высушивание не требуется (Wood, Banta 1937).

Панцелла и Стросс (Pancella, Stross 1963; Stross 1966) показали зависимость вылупления покоящихся яиц *D. pulex* от освещенности во время стимуляции и продолжительности инкубации в темноте. Авторы отметили различия в оптимальных условиях вылупления между эфиппидумами, полученными в лабораторной культуре, и эфиппидумами, собранными осенью в природной популяции *D. pulex*. Успех вылупления может зависеть также от температуры и фотопериода (Pfrender, Deng 1998). Реакция на каждый из этих факторов специфична для каждой популяции: оптимальные значения соответствуют времени наступления в природном биотопе условий, благоприятных для данного вида (Vandekerkhove et al. 2005, Vanoverbeke, DeMeester 2009).

1.5. Заключение главы

К настоящему времени накоплено немало информации в отношении жизненного цикла, диапаузы и гамогенеза различных представителей рода *Daphnia* и некоторых других Cladocera, и их связи с внешними условиями. Для дальнейшего исследования механизмов (прежде всего, генетической основы) и эволюции признаков, связанных с диапаузой и половым размножением, необходимо сочетание различных подходов – от традиционных методов полевой гидробиологии до современных геномных методов. В данной работе сделана попытка получения с помощью сравнительно простых методов, сведений, необходимых для дальнейшего исследования экологической генетики модельных видов – представителей Cladocera, в первую очередь, *Daphnia magna*.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Сбор материала в природных популяциях

2.1.1. Сбор и обработка планктонных проб. Сбор проб использовался в настоящей работе для решения нескольких задач. Во-первых, для определения роли диапаузы и гамогенеза в модельных популяциях двух видов *Daphnia* проводился регулярный сбор проб в «пеликаньем» пруду Московского Зоопарка (Глава 4), представляющем собой небольшой (1300 м²) и мелкий (~1 м глубиной) водоем – вольтер пеликанов. Зимой пруд покрыт льдом (приблизительно с ноября по март), в это время *D. magna* в планктоне отсутствует, каждую весну планктонная популяция восстанавливается из эфиппиумов. В этом пруду в период с 1997 по 2014 год было собрано более 150 планктонных проб, при этом в 2001–2003 и в 2011–2012 годах сбор проб проводился регулярно в течение всего периода, когда водоем не был покрыт льдом. В 2001–2003 г.г и в некоторые даты 2011 г. для оценки пространственной неоднородности пробы отбирали отдельно в 2–4х точках пруда, и взятые пробы анализировали по отдельности. В другие даты пробы из разных точек пруда объединяли в интегральную пробу.

Планктонные пробы собирали планктонной сетью или сачком из газа с ячейкой 120 мкм. После сбора, пробы перевозили в лабораторию в течение 2 часов после взятия и просматривали живыми или фиксировали на месте 96% этиловым спиртом (см. Главы 3, 4). В большинстве случаев размер выборки для каждого вида дафний в каждую дату превышал 100 особей, однако в некоторых пробах, взятых в периоды очень низкой численности популяции (начало весны во все годы, а также в летний период падения численности *D. pulex* в 2011 году), выборка составляла только 15-30 особей.

Животных в пробах просматривали под микроскопом МБС-10 или МСПЭ-1 в камере Богорова, подсчитывая возрастные/половые классы каждого вида *Daphnia*. Дополнительно, мы отмечали число взрослых самок без кладок и размер партеногенетических кладок. В случаях, когда необходимо было оценить

количество редко встречающихся самцов, или самок с редкими в эту дату эфиппиальными или партеногенетическими кладками, их подсчитывали во всей пробе, просматривая, в целом, несколько тысяч особей, в то время как остальные фенотипы подсчитывали лишь в части пробы. Половозрелость самок (Главы 3, 4) определяли по размеру тела: самок с длиной тела, равной или превышающей размер самой маленькой самки (длину тела животных с помощью окуляр-микрометра) с кладкой в этой пробе, половозрелых самцов отличали по развитыми вентральными щетинками (Глава 3). Для оценки интенсивности гамогенеза (см. Главы 3, 4), разделяли взрослых самок с партеногенетическими и эфиппиальными кладками. У *D. magna* неизвестен облигатный партеногенез (т.е. откладываемые в эфиппиум яйца всегда нуждаются в оплодотворении), соотношение самок, несущих эфиппиальные кладки, к общему числу партеногенетических и эфиппиальных кладок, представляет собой показатель интенсивности гамогенеза.

Одновременно со взятием проб измеряли температуру воды у поверхности пруда. В зимнее время температуру регистрировали эпизодически, пробивая лунки во льду. Пробы планктона в зимнее время не брали.

Ряд планктонных проб был собран для дальнейшего получения клональных культур от отдельных самок *D. magna*. В пруду Московского Зоопарка такие пробы отбирали несколько раз для определения пола потомства в природных кладках и получения одновозрастной выборки эфиппиумов.

Помимо этого, для исследования географического распространения клонов, специализирующихся на производстве самок (Глава 3), нами были получены и проанализированы пробы планктона и пробы донных осадков из более чем 30 популяций *Daphnia magna* и *D. pulex* из водоемов на территории России, Украины, Монголии, Израиля и Германии.

2.1.2. Сбор донных отложений. Помимо планктонных проб, для получения из эфиппиумов клонов с целью изучения их половой специализации (Глава 3) и генетики выхода из диапаузы (Глава 5) в пруду Московского Зоопарка было

отобрано десять образцов верхнего слоя осадков (содержащего эфиппиумы *Daphnia*) и одна колонка донных осадков для реконструкции истории сосуществования в этом водоеме двух видов *Daphnia* (Глава 3).

Для исследования географического распространения бессамцовых клонов, сбор верхнего слоя осадков проводился также в отдаленных водоемах в России и за рубежом.

Для отбора эфиппиальных (диапаузирующих) яиц из природных популяций (см. Главы 3, 4, 5), собирали верхний 5-см слой донных осадков с помощью специальной ручной драги. Собранные пробы осадков либо помещали в холодильник при температуре приблизительно 4°C, в темной посуде до стимуляции вылупления либо в течение 1–2 недель после сбора фильтровали через серию сит, получая серию фракций с различным размером частиц; фракцию частиц размером 0,25–3 мм, содержащую эфиппиумы *D. magna*, хранили в тех же условиях до стимуляции вылупления.

Для отбора колонок донных осадков использовали плексигласовую трубу внутренним диаметром 52 мм. После транспортировки, колонки хранили в лаборатории при 4°C и затем разделяли на слои по 1 или 2 сантиметра толщиной. Так как наружный слой колонки грунта при этом методе отбора проб может перемешиваться, из каждой секции для дальнейшего анализа использовали только среднюю часть 46 мм диаметром. Каждый слой промывали на ситах, эфиппиумы каждого вида дафний подсчитывали и измеряли. Некоторые эфиппиумы вскрывали при помощи препаровальных игл, определяя число и состояние яиц.

2.1.3. Получение одновозрастной выборки эфиппиумов. В 2014 году нами была получена одновозрастная выборка эфиппиумов *D. magna* и *D. pulex*, отложенных самками в планктонной пробе. Эти эфиппиумы использовались для исследования зависимости успеха выхода молоди от продолжительности инкубации эфиппиальных яиц (Глава 5).

Для получения одновозрастной выборки эфиппиумов *D. magna* и *D. pulex*, в опыте, направленном на определение зависимости успеха вылупления от

продолжительности инкубации (Глава 5), из того же пруда Московского Зоопарка, были отобраны планктонные самки. Для этого, 13 октября 2014 г., в период полного перехода *D. magna* к откладке эфиппидальных яиц, в пруду была взята планктонная проба из объема 1.1 м³, которую в течение 1 часа в термоконтейнере с 10 л прудовой воды перенесли в 100-л бак с 90л среды AdaM, где и хранили в течение 6 суток, Ежедневно добавляя культуру *Scenedesmus obliquus* до итоговой концентрации 5x10⁴ кл/мл. Бак находился на открытом воздухе, так что температура в нем приблизительно соответствовала температуре в пруду, откуда была взята проба. За шесть суток опыта температура упала с 13 до 2° С. Через шесть суток после отбора пробы бак слили и собрали сброшенные самками эфиппидумы с поверхности воды и со дна бака. Поскольку при этих температурах межлиночный интервал обоих видов *Daphnia* превышает пять суток, т.е. собранные таким образом эфиппидальные яйца были заложены еще в природной популяции. Непосредственно после откладки эфиппидумы поместили в 50-мл пробирки, по 100 эфиппидумов в каждой. Пробирки хранили в темноте при температуре 0-1°С до окончания периода инкубации.

2.2. Работа с культурами *Daphnia* в лаборатории

2.2.1. Получение и поддержание клональных культур. Клональные культуры дафний применялись для исследования половой специализации клонов (Глава 3) и реактивации эфиппидальных яиц (Глава 4). Культуры получали как от планктонных самок, так и от самок, вылупившихся из эфиппидальных яиц. В случае получения клональной культуры от планктонных самок, взрослых самок отбирали из планктонной пробы, помещали по одной в пробирку с 25 мл искусственной прудовой воды ADaM (Kluttgen et al. 1994), с высокой концентрацией корма (10⁵ клеток *Scenedesmus obliquus* на 1 мл среды) и давали отложить партеногенетическую кладку. В случае, если в первой кладке все потомство было мужского пола, или кладка была эфиппидальной, самок держали в тех же условиях до получения женского потомства, после этого самок вместе с

потомством пересаживали в стакан с 70–100 мл искусственной среды для содержания *Daphnia*. Полученные таким образом линии затем поддерживали в пластиковых или стеклянных стаканчиках с ADaM при комнатной температуре и длинном световом дне (17–20 часов света). Рачков в культуре кормили 1 раз в два дня, добавляя $0.5\text{--}1.0 \times 10^5$ клеток *Scenedsemus* sp. на 1 мл среды; рачков пересаживали в свежую среду 1–2 раза в неделю. При получении клональной культуры из покоящихся эфиппиальных яиц, яйца реактивировали так, как это указано в разделе 2.2. Вылупившуюся из эфиппиумов молодь переносили в индивидуальные пробирки с 25 мл среды для *Daphnia*, в которые ежедневно добавляли $0.5\text{--}1.0 \times 10^5$ клеток *Scenedsemus* sp. Приблизительно через неделю после вылупления из эфиппиума, вылупившиеся самки давали первые партеногенетические кладки. После этого, их переносили в 70-мл пластиковые стаканчики и содержали так, как описано для клональных линий, полученных из планктонных проб.

2.2.2 Реактивация эфиппиальных яиц. Получение потомства из эфиппиальных яиц использовали для исследования половой специализации клонов (Глава 3) и закономерностей выхода из диапаузы (Глава 5). Для решения этих задач активировали как эфиппиальные яйца, полученные из природной популяции (из донных осадков или от планктонных самок, см. выше разделы 2.1.2 и 2.1.3), так и яйца, полученные в лабораторных скрещиваниях (см. ниже раздел 2.2.6).

Во всех случаях взятые из проб или полученные в скрещиваниях эфиппиумы помещали на некоторое время на холод (0–4 °C) в темноту. В некоторых случаях, для активации эмбрионов, эфиппиумы подвергали также кратковременному промораживанию (-5–10°C, 1–2 суток). После этого, возобновление развития стимулировали переносом в условия высокой освещенности с суточным циклом, при этом температура и фотопериод были различными в различных опытах.

Для активации эфиппиумов, взятых из донных отложений, пробы отложений промывали через серию бентосных сит либо сразу после взятия проб (перед

инкубацией) либо непосредственно перед стимуляцией возобновления развития (после инкубации). В дальнейшем работали лишь с фракцией осадков, содержащей эфиппиумы (0.2–4 мм).

В тех случаях, когда требовалось лишь получение выборки клонов из банка покоящихся яиц (для исследования половой специализации клонов, Глава 3), содержащую эфиппиумы фракцию осадков помещали для стимуляции в 5 или 12 литровые аквариумы с искусственной прудовой водой ADaM.

При исследовании реактивации, взятые после инкубации в темноте на холоду, эфиппиумы выбирали на льду из соответствующей фракции осадков, и помещали в пластиковые чашки со средой ADaM.

Эфиппиумы, полученные в лабораторных скрещиваниях, а также полученные от планктонных самок (одновозрастная выборка), помещали по одному в ячейки 96-луночного иммунологического планшета с 0.2 мл среды ADaM в каждой лунке.

Во всех случаях, во время стимуляции ежедневно проверяли вылупление и подменяли часть среду (в случае аквариумов и чашек) или всю среду (в случае иммунологических планшетов).

2.2.3. Работа с массовыми культурами на открытом воздухе. Для получения массовых культур с численностью, которую невозможно получить в условиях лаборатории, культуры клонов держали в баках на открытом воздухе. Культуры содержали в пластиковых баках с 60 л среды для *Daphnia* в каждом баке. Баки были размещены в ботаническом саду г. Фрибург (Швейцария). Вода в баках была эвтрофицирована добавлением приблизительно 100 г лошадиного навоза, в качестве затравочной культуры кормовых организмов добавляли 0.5 л воды из природного, не населенного дафниями водоема, которую пропускали через 50 мкм фильтр. В дальнейшем, культуры выращивали без добавления дополнительного корма, ведра покрывали тонкой сеткой, препятствующей попаданию крупных частиц, но пропускающей мелкие частицы и солнечный свет.

Численность популяции в такой культуре менялась, но часто превышала 10 тысяч особей.

2.2.4. Стимуляция производства самцов.

Средовая стимуляция. В качестве средового стимула при получении самцов, необходимых для скрещиваний (Главы 5, 6), и выявления NMP клонов (Глава 6), использовали высокую плотность культуру. Плотные клональные культуры получали так, как описано выше для получения клональных культур, 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 на в мл среды, что в большинстве клонов вызывало переход к половому размножению, т.е. производству самцов и эфиппидальных яиц.

Гормональная стимуляция. При гормональной стимуляции использовали гормон метилфарнезоат (Olmstead, Leblanc 2001). Взрослых самок брали из клональной культуры и помещали по одной в стеклянные пробирки с 27 мл среды для *Daphnia* и держали при 20°C и фотопериоде приблизительно 20 L: 4D, добавляя в качестве корма $0.5\text{--}1 \times 10^6$ клеток *Scenedsemus* sp./ мл x сут. Самок ежедневно переносили в пробирки со свежей средой, при этом отмечали появление новых кладок, личинок шкурки и новорожденной молодежи. Если в пробирке обнаруживали личинку шкурки (первая линька в эксперименте), самок пересаживали в среду, содержащую 400 нМ метилфарнезоата, при этом все остальные условия (температура, фотопериод и корм) сохраняли прежними. Самок держали в этой среде с гормоном до следующей линьки, ежедневно перенося в свежую среду. После второй линьки, самок пересаживали в среду без гормона. У самок *Daphnia* развитие ооцитов начинается после каждой линьки, самка откладывает яйца в выводковую камеру после следующей линьки, а молодь выходит из выводковой камеры матери при третьей линьке. Таким образом, самки содержались в среде с гормоном в течение почти всего периода развития яичника, включая весь период чувствительности к гормону (Olmstead, Leblanc 2002).

Количество и пол молоди, развившейся из яиц, отложенных сразу после второй линьки, определяли под микроскопом после того, как молодь высвобождалась при третьей линьке. Применявшиеся в нашей работе концентрации гормона обеспечивают переключение МР клонов *D. magna* на производство чисто самцовых кладок (Olmstead, Leblanc 2002; собственные неопубликованные данные). Поэтому самок, которые не давали самцов при таком гормональном воздействии, считали принадлежащими к NMP клонам.

Производство самцов и половое размножение в массовых культурах на открытом воздухе. Для того, чтобы исключить возможность редкого производства самцов, наличие самцов и полового потомства анализировали в десяти культурах пяти различных NMP клонов (две повторности в каждом клоне) из популяций BN, MZ (два клона), Vol и Ast (описание популяций см. в Главе 3, таблица 3.1). Последняя популяция населяет пруд в Астраханской области 45°54'13"N, 47°39'23"E и исследована только в этом опыте. Соотношение полов оценивали также в 11 культурах десяти различных МР клонов из популяций BN (один клон), Ism (три клона), MZ (три клона), Vol (один клон) и Ast (два клона).

Частоту появления самцов оценивали в культурах в конце сезона (когда наиболее велики шансы на появление самцов). Долю самцов подсчитывали осенью в клональных культурах, содержащихся в 60-л ведрах (см. ниже). Пол животных определяли под стереоскопическим микроскопом.

Дополнительно, для выявления возможного редкого появления самцов в культурах NMP клонов, такие культуры сохраняли на открытом воздухе в течение двух сезонов и исследовали появление молоди вылупившихся их покоящихся яиц, после зимовки вне помещения. Такое вылупление можно считать указанием на половое размножение (и, соответственно, присутствие самцов) в предыдущем году.

Возможное присутствие самцов оценивали также по производству в таких массовых культурах способных к активации покоящихся яиц. Поскольку предполагалось, что бессамцовые клоны при закладке эфиппидальных кладок производят нормальные мейотические яйца, требующие оплодотворения

самцами, то наличие жизнеспособного эфиппидального потомства указывало бы на наличие в массовой культуре редких самцов, которые могли быть пропущены при просмотре культуры.

Опыты с культурами вне помещений были начаты в 2008 году. В ноябре, объем уменьшили до приблизительно 10 л. и культуры были оставлены на зиму вне помещения в темноте до марта 2009 года. За это время, содержимое баков полностью промерзло, что гарантировало гибель активных стадий дафнии. В марте 2009 года, баки были вновь заполнены до 60 л.; появление вылупившихся особей проверяли дважды в неделю, тщательно и многократно проводя сачком через всю массу воды в контейнере и убирая пойманных дафний. Этот опыт был проведен с NMP клонами (один их Ast и два их MZ) и 16 MP клонами (два из Ast, четыре из MZ, и десять из Ism), с двумя (клоны из Ism) или тремя (все остальные клоны) повторностями в отдельных ведрах для каждого клона. В тех повторностях, где было обнаружено более пяти вылупившихся особей, их половое происхождение проверяли, оценивая расщепление микросателлитных локусов, гетерозиготных у родительского клона.

2.2.5. Определение пола потомства в природных условиях. Для определения того, потомство какого пола дают самки в природе, отбирали самок с партеногенетическими кладками из планктонных проб взятых в пруду Московского Зоопарка так, как указано выше (раздел 2.1). Взрослых самок *D. magna* брали из пяти проб, взятых в пруду MZ 24 августа 2006, 27 сентября 2006, 11 сентября 2007, 2 октября 2007 и 28 августа 2009 года, то есть в период, когда в этой популяции в природных условиях появляются самцы (см. Главы 3,4). Из каждой пробы случайным образом отбирали 70–150 взрослых самок с партеногенетическими или половыми яйцами в яйцевой сумке. В течение одного часа после взятия пробы из нее отбирали самок с партеногенетическими кладками, которых по одной помещали в пробирки с 30 мл среды для *Daphnia* с концентрацией корма 3×10^6 клеток *Scenedesmus* sp. Пробирки ежедневного просматривали на предмет появления свободноплавающего потомства и/или личинной шкурки самки. Потомство, вышедшее из выводковой камеры после

первой линьки, подсчитывали и определяли его пол по строению антенн I. Такое потомство считали «природным» поскольку закладка в выводковую камеру партеногенетических яиц, из которых оно развивалось, происходило в природных условиях, а размер кладки и пол каждого яйца определяется после выхода в выводковую сумку (Ebert, Yampolsky 1992; Olmstead, Leblanc 2002). После откладки такой «природной» кладки, от матерей получали клональные культуры. В дальнейшем с помощью гормональной стимуляции у самих самок или их клонального потомства проверяли способность к производству самцов (раздел 2.3). Это позволяло нам сравнить первичное соотношение полов в природных кладках самок-представительниц NMP и MP клонов.

2.2.6. Скрещивание лабораторных клонов. Для того чтобы получить половое потомство от различных клонов *D. magna*, по десять взрослых самок одного клона и пять самцов другого клона помещали вместе в 30 мл среды для *Daphnia*. Самцов получали либо из плотных клональных культур, либо с помощью гормональной индукции производства самцов как указано выше (см. раздел «Стимуляция и исследование производства самцов»). Пробирки с самками и самцами помещали в климатическую камеру, где поддерживали условия короткого светового дня (10L: 14D), что, в сочетании с высокой плотностью популяции (15 особей в 30 мл среды для *Daphnia*), как было показано ранее, стимулирует половое размножение (De Meester, De Jager 1993). Температура в камере поддерживалась на уровне 12–15° С. Действительно, в этих условиях самки давали преимущественно эфиппидальные кладки. В случае появления партеногенетического потомства, его убирали из пробирки со скрещиванием не позднее, чем через три дня; через 14 дней после ссаживания отложенные эфиппиды убирали из пробирки, инкубировали и стимулировали их вылупление и получали от вылупившихся самок клональное потомство так, как это описано выше для природных эфиппидов.

Наследование NMP. С тем, чтобы исследовать наследование признака NMP мы скрестили самок из NMP клонов с самцами из MP клонов и оценивали частоту NMP среди полового потомства таких клонов. Были выполнены две серии

скрещиваний. Во-первых, было поставлено 16 скрещиваний между семью NMP клонами и восьмью MP клонами, полученными из эфиппиумов, взятых из популяции Московского Зоопарка (MZ). Клоны скрещивали так, как это указано в главе «методы». В точности такая же методика использовалась в 19 контрольных скрещиваниях, где оба родителя были взяты из MP клонов.

Поскольку в первом скрещивании от каждой пары клонов было получено лишь небольшое число потомства F_1 , были выполнены еще два скрещивания с большим количеством самцов и самок из каждого клона. В первом из указанных скрещиваний также использовали NMP и MP клон из популяции MZ, в то время как во втором скрещивании NMP клон из популяции MZ скрещивали MP клоном из популяции Там. Методика эксперимента была той же, что и в первой серии скрещиваний, за исключением того, что каждое скрещивание было выполнено в четырех повторностях, каждая из которых включала 50 самок и 25 самцов в 100 мл среды для *Daphnia*, и эфиппиумы отбирали для инкубации через 4 недели после ссаживания самцов и самок.

2.2.7. Исследование реактивации эфиппиальных яиц.

Опыты по отбору на ранее/позднее вылупление и вылупление при повторной стимуляции: В качестве исходной популяционной выборки, в этих опытах были использованы эфиппиумы *Daphnia magna*, которые были получены 17 ноября 2004 из верхнего слоя осадков популяции MZ года так, как это указано в разделе 2.1.2. Их промыли в тот же день при температуре 4°C на сите с ячейкой 0.3 мм. Фракцию осадков, включающую эфиппиумы *Daphnia*, во влажном состоянии поместили в пластиковые контейнеры и хранили в темноте при 1–4°C до начала стимуляции.

Отбор на ранее и позднее вылупление: Для стимуляции взяли две партии эфиппиумов по 50 шт в каждой. Эфиппиумы отбирали из фракции осадков при ярком свете на льду (0°C), непосредственно перед началом опыта. Каждую партию поместили в чашку с 100 мл культуральной среды. Стимуляция выхода

молоди из природных эфиппиумов была (в различных партиях осадков) начата 28.01 или 2.02 2005 г., т.е. через 2.5 месяца после взятия пробы в популяции MZ.

Выход молодежи из эфиппимумов, взятых из природной популяции стимулировали при постоянной температуре 5°C и фотопериоде в 14 часов света: 10 часам темноты. В течение опыта, мы не меняли среду, и не добавляли свежую. Благодаря высокой влажности в климатических камерах, испарение из чашек было незначительным.

Чашки проверяли ежедневно и появившуюся молодежь отсаживали. Всего в чашках вылупилось 55 и 40 дафний, соответственно, вылупление происходило с 14 по 29 день стимуляции, стимуляцию продолжали до 40 дня, после чего стимуляция была прекращена и природные эфиппиумы в дальнейшем не использовались. Из каждой чашки было отобрано по 4 наиболее рано и по 4 наиболее поздно вылупившихся самки, от которых были получены клональные культуры.

Клональные культуры были использованы для получения полового потомства (покоящихся эмбрионов) F₁. Половое потомство было получено так, как это указано в главе «Методы», путем скрещивания самцов из одной клональной культуры с самками из другой. Внутриклональные скрещивания не проводились, с тем чтобы избежать эффекта инбредной депрессии. Кроме того, мы не могли быть уверены в том, что любые две самки, отобранные из одной и той же чашки, не вылупились из одного и того же эфиппиума, т.е. что они (и их клональное потомство) не являются сибсами. С тем, чтобы избежать инбредной депрессии, мы не проводили скрещиваний между клонами из одной чашки, а брали отцов и матерей из клональных культур, полученных из разных чашек. Кроме того, часть клонов, полученных от самок, отобранных на «ранее» вылупление, оказалась неспособна к производству самцов (NMP клоны, см. Главу 3). Эти клоны были использованы в скрещиваниях только в качестве материнских. В результате было получено эфиппиумы от 20 «семей» (пар материнский клон x отцовский клон) в группе отбора на ранее вылупление и от 32 семей в группе отбора на позднее вылупление. Полученные в скрещиваниях

эфиппиумы (содержащие поместили в 96-луночные планшеты, заполненные искусственной прудовой водой ADaM по одному эфиппиуму в лунку. Планшеты поместили на 50 дней в темноту при температуре 2-4°C. Всего было получено 380 эфиппиумов в группе отбора на раннее вылупление и 322 эфиппиума в группе отбора на позднее вылупление.

Стимуляцию вылупления молодежи первого отобранного поколения (F_1) проводили в течение 50 дней в тех же условиях, что и в случае природных эфиппиумов, за тем исключением, что эфиппиумы были индивидуально размещены в лунках 96-луночного планшета. Среду в лунках планшета заменяли на свежую перед началом стимуляции и затем дважды в неделю. Планшеты просматривали ежедневно и появившуюся молодежь отсаживали. Всего в группе отбора на раннее вылупление в 14-42 дни после начала стимуляции вылупилось 316 самок из 20 семей, в группе отбора на позднее вылупление в 14-45 день после начала стимуляции вылупилось 238 самок из 26 семей. В 6 парах материнский клон/отцовский клон не было получено ни одного потомка F_1 . Из числа 75 самок F_1 , вылупившихся на 14 день в группе отбора на раннее вылупление (наиболее ранние самки), было отобрано 16, в группе отбора на позднее вылупление было отобрано 16 из 19 самок, вылупившихся наиболее поздно (28 – 45 день с начала вылупления). Через 50 дней после начала стимуляции эфиппиумы были оставлены а планшетах на 50 дней в темноте при +2-4°C для повторной стимуляции вылупления (см. раздел Отбор на вылупление при повторной стимуляции).

Клональные культуры получали так же, как и в случае F_1 . От 3 из 16 клонов группы позднего вылупления клональные культуры получить не удалось, еще 7 клонов были потеряны в результате ошибки. Оставшиеся шесть клонов скрещивали между собой (22 семьи). В группе отбора на раннее вылупление было случайным образом составлено 32 семей. Полученные эфиппиумы хранили так же, как это указано для потомства F_1 , в течение 50 дней. Вылупление из эфиппиумов потомства F_2 (полученного при скрещивании отобранных клонов F_1) проводили так же, как в случае F_1 и в тех же условиях, но при более высокой

температуре (10°C). После первого вылупления, эфиппиумы были оставлены для повторной инкубации и стимуляции вылупления (также при 10°C). Схема отбора на ранее/позднее вылупление и диаграммы вылупления представлены на Рисунок 5.1

Отбор на вылупление при повторной стимуляции: В группах отбора на ранее/позднее вылупление эфиппиумы F_1 , не вылупившиеся при первой стимуляции, были оставлены для повторной инкубации в темноте и повторной стимуляции вылупления (см. выше). Повторная стимуляция была начата после 50-дневной инкубации в темноте (100-ый день после начала первой стимуляции). В группе отбора на раннее вылупление при повторной стимуляции вылупилась 61 самка (в дни 14–17 с начала повторной стимуляции), в группе отбора на позднее вылупление – 77 самок (дни 14–18 с начала повторной стимуляции). Из объединенной группы самок, отобранных на раннее и позднее вылупление, были отобраны представительницы семей с наибольшим отношением числа вылупившихся при повторной (II) стимуляции к числу вылупившихся при I стимуляции [$N_{II}/(N_I + N_{II})$]. Таким образом, в данном случае отбор представлял собой сочетание семейного и индивидуального отбора. Всего было отобрано 6 самок из семей, у которых соотношение $N_{II}/(N_I + N_{II})$ превышало 0.75. Одна из отобранных таким образом самок погибла, от оставшихся пяти самок получили клоны, которые скрестили между собой так же, как и при отборе на ранее/позднее вылупление. Полученные в результате скрещиваний эфиппиумы (половое потомство F_2) инкубировали и стимулировали вылупление так же, как это указано для групп отбора на ранее/позднее вылупление и совместно с этими группами (две повторные стимуляции при температуре 10°C с 50-дневной инкубацией в темноте между стимуляциями). Схема и результаты отбора на ранее/позднее вылупление проиллюстрирована на Рисунок 5.2.

Исследование успеха вылупления молоди из эфиппиальных яиц от продолжительности инкубации: Выход молоди из эфиппиальных яиц исследовали на материале, полученном из планктонной пробы, взятой в пруду Московского Зоопарке 13 октября 2014 г. (см. раздел 2.1.3). Полученные таким

образом эфиппиумы различались по возрасту (срок откладки) не более, чем на 6 суток.

Всего было взято 10 партий по 100 эфиппиумов в партии, для каждого из двух видов дафний, *D. magna* и *D. pulex*. Эфиппиумы инкубировали в закрытых 50-мл пробирках с 50 мл среды ADaM в холодильнике (0°C, темнота). Инкубация продолжалась одну неделю (одна повторность каждого вида), один месяц (одна повторность каждого вида), два месяца (три повторности каждого вида) или три месяца (три повторности каждого вида). После инкубации 96 эфиппиумов из каждой пробирки раскладывали по одному в лунки 96-луночного иммунологического планшета с 200 мкл среды ADaM в каждой лунке. Планшеты держали при 10°C и фотопериоде 14 часов на свету: 10 часам в темноте. Среду в лунках меняли на свежую 1 раз в сутки, в это же время планшеты проверяли под микроскопом, отсаживая вылупившуюся молодь.

2.3. Статистическая обработка данных

Доверительные интервалы для долей оценивали с помощью он-лайн калькулятора GraphPad [http://www.graphpad.com/quickcalcs /ConfIntervall1.cfm](http://www.graphpad.com/quickcalcs/ConfIntervall1.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

2.4.1. Выделение, амплификация и определение последовательности ДНК.

Митохондриальные гаплотипы NMP клонов: Для исследования филогенетических отношений NMP клонов из различных популяций определяли последовательность фрагмента митохондриального гена субъединицы I цитохромоксидазы *COI*. Геномную ДНК экстрагировали из целых самок *Daphnia* с помощью наборов Diatom DNA Prep (Isogen, Moscow, Russia) в соответствии с инструкциями производителя. Амплифицировали 710-нуклеотидный фрагмент гена *COI*, используя стандартные праймеры LCOI490 и HCO2918 (Folmer et al. 1994). ПЦР-реакцию проводили с помощью набора для ПЦР производства Isogen по стандартному протоколу. Амплифицированные фрагменты очищали, затем секвенировали на приборе PRISM 3100 с использованием BigDye v.1.1. Анализ и выравнивание последовательностей выполняли с помощью ПО LASERGENE 6.0 (Burland, 2000). 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). Оценка филогенетических связей в этой программе основана на абсолютных расстояниях и парсимонии, и хорошо подходит для данных по внутривидовой изменчивости с небольшим расхождением (Clement et al. 2000). Реконструкция основана на итоговом выравнивании фрагмента длиной 609 пар нуклеотидов. Новые последовательности, полученные в настоящем исследовании, депонированы в Genbank (JF750768–JF750771).

Микросателлитный анализ: ДНК для микросателлитного анализа выделяли из одной особи по протоколу HotSHOT (Montero-Pau et al. 2008); каждую особь генотипировали по 11 микросателлитным локусам (B. Jansen, S. Geldof, L. De Meester, L. Orsini, неопубликованные данные), гетерозиготным у родителя. Реакции были поставлены в объеме 10 мкл с 2x Type-it Multiplex PCR master mix (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Условия ПЦР-реакции соответствовали

рекомендациям производителя. 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.

2.4.2. Определение происхождения эфиопиальных яиц в культурах бессамцовых клонов. Из эфиопиумов, отложенных в массовых культурах бессамцовых (NMP) клонов (раздел 2.2.4) было получено потомство (Глава 3). При проведении микросателлитного анализа (см. выше в настоящем разделе) генотипов этого потомства была обнаружена сегрегация родительских аллелей (Глава 3). Эти результаты можно было объяснить либо оплодотворением нормальных мейотических яиц самцами из того же клона, либо способностью самок к откладке покоящихся яиц с рекомбинацией, но без участия самцов (автомиктический партеногенез). Поскольку нам не удалось обнаружить самцов в моноклональных культурах NMP клонов, для выбора одной из гипотез был выполнен молекулярный анализ.

Согласно теоретическим представлениям (Rizet, Engelmann 1949; Barratt et al. 1954; Suomalainen et al. 1987; Pearcy et al. 2006; Engelstädter et al. 2011; Pearcy et al. 2011) потомство, полученное в результате скрещивания двух особей из одного клона (эквивалентное самооплодотворению) и в результате аутомиксиса, должно различаться степенью гетерозиготности центромерных областей.

Хотя и при внутриклональном скрещивании, и при аутомиксисе, сливаются продукты мейоза одного и того же набора хромосом, их происхождение различается. При внутриклональном скрещивании сливаются продукты различных мейозов, т.е. разделение хромосом при сперматогенезе и оогенезе происходит независимо. При аутомиксисе, сливаются продукты одного и того же мейоза, при этом при терминальном слиянии сливаются продукты второго деления (при котором разделяются идентичные сестринские хроматиды), а при центральном – продукты двух делений, т.е., в двойном наборе хроматиды не являются сестринскими. В большей части хромосомы различия в результатах

внутриклонального скрещивания, центрального и терминального деления замаскированы рекомбинацией. Однако в центромерных областях рекомбинация не проходит, и поэтому результаты будут различаться. В случае внутриклонального скрещивания, каждая пара хромосом представляет собой случайную выборку из родительских пар, независимую от других пар. В общем наборе хромосом, количество пар сестринских (другими словами, гомозиготных по центромерным областям) и несестринских хромосом (другими словами, гетерозиготных по центромерным областям) при этом следует биномиальному распределению со средним $n/2$ (Рисунок 2.1). В случае аутомиксиса, все хроматиды в сливающихся продуктах мейоза являются либо сестринскими (в случае терминального слияния) либо несестринскими (центральное слияние), т.е. родительская гетерозиготность будет либо полностью сохранена, либо полностью утеряна (Рисунок 2.1).

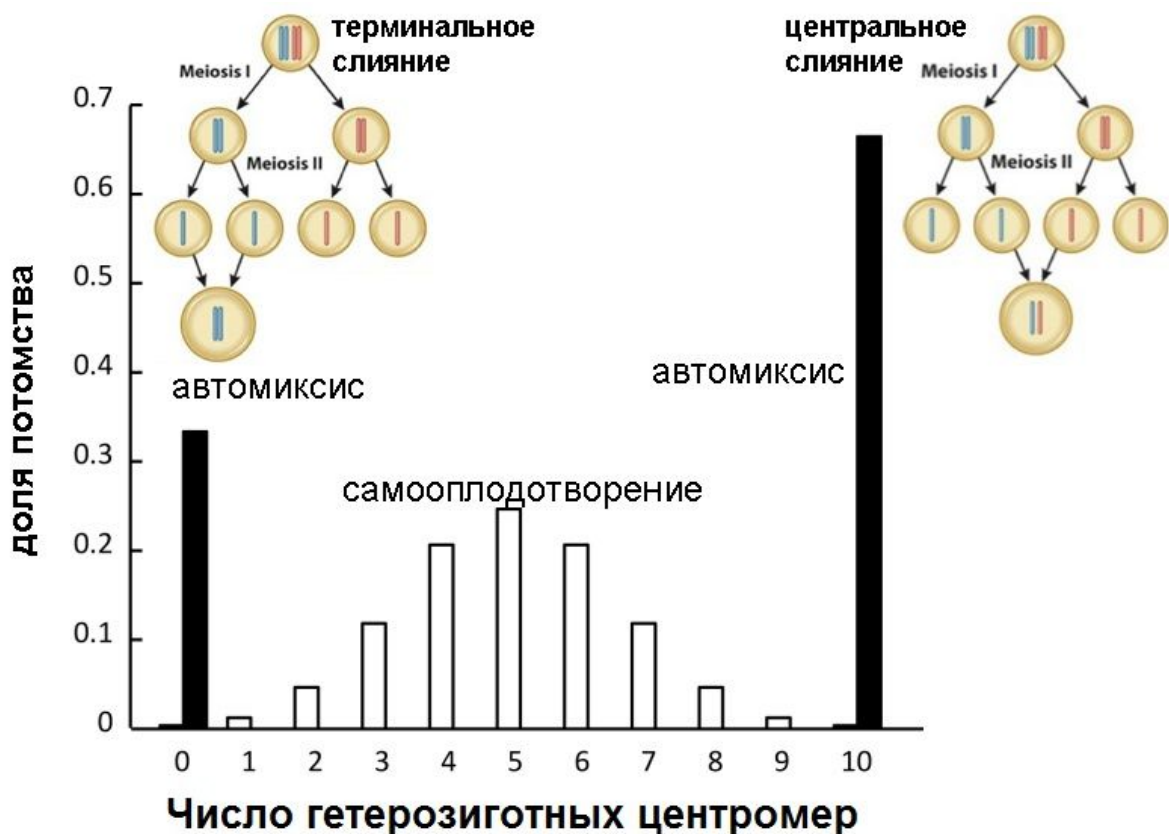


Рисунок 2.1. Распределение числа гетерозиготных центромер при внутриклональном скрещивании (белые столбцы) и аутомиксисе (черные столбцы).

Для того, чтобы понять, является ли потомство, вылупившееся из эфиппиумов в массовых культурах бессамцовых клонов, результатом внутриклонального скрещивания или же аутомиксиса, было необходимо во-первых, определить положение центромерных областей в хромосомах *Daphnia magna*, во-вторых, выявить в этих областях маркеры, различающиеся (гетерозиготные) в гомологичных хромосомах, и в-третьих, проанализировать картину сохранения этой гетерозиготности в полученном потомстве. В качестве маркеров был использован сайты однонуклеотидного полиморфизма (SNP) и микросателлитные локусы. В качестве контроля использовали внутриклональное потомство клонов, дающих самцов (MP клоны), образованное в результате внутриклонального скрещивания.

Для определения положения центромерных областей и поиска гетерозиготный маркеров, мы использовали секвенирование ДНК участков, связанных с сайтами рестрикции (RAD-секвенирование, Baird et al. 2008) для анализа восьми особей, вылупившихся из покоящихся яиц, произведенных единственной одноклональной культуры NMP-клона (клон AST-01-04, бак V04), а также 27 особей, вылупившихся из покоящихся яиц, произведенных единственной одноклональной культуры MP-клона (клон RM1-18 MP, бак 19). Были использованы лишь восемь вылупившихся особей из культуры NMP клона, поскольку это было максимальным числом потомков из одноклональной культуры NMP, от которых удалось получить клональные культуры для выделения ДНК (несколько других вылупившихся потомков погибло до начала размножения или оказались стерильными). Мы использовали протокол RAD-секвенирования согласно публикации Etter et al. (2011) с несколькими перечисленными ниже модификациями. Было приготовлены две библиотеки: одна из ДНК потомства моноклональной культуры NMP и вторая из ДНК потомства моноклональной культуры MP, причем была отмечена принадлежность ДНК конкретной особи. В каждую библиотеку были также включены и соответствующим образом помечены две независимые повторности родительского клона. Для более подробного описания протокола RAD-

секвенирования и процедуры анализа, включая контроль качества, выравнивание, распознавание SNP и генотипов просим обращаться к соответствующей публикации (Svendsen et al. 2015, Supporting File S3).

Предположительное положение центромер определяли по генетической карте (генетическая карта *D. magna* v4.0.1, размещение Dryad 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.

Центромерные области определялись как все скаффолды (или части скаффолдов), расположенные в этих областях согласно генетической карте. Среднюю гетерозиготность как функцию расстояния от предполагаемой центромеры рассчитывали отдельно для каждого плеча хромосомы методом скользящей средней, используя маркеры на расстоянии не более 5 сМ с каждой стороны от анализируемого маркера (но во всех случаях исключая маркеры, расположенные на нулевом (0 сМ) расстоянии от центромерных областей. После этого, для этих оценочных значений вычисляли средние значения и стандартную ошибку вдоль плеч хромосомы; доверительные интервалы рассчитывали как 1.96 SE.

Для определения расстояния от центромеры для каждого микросателлитного локуса, мы во-первых, картировали каждую пару праймеров на имевшейся на тот момент геномной сборке (*D. magna* assembly v2.4). Впоследствии, мы определяли положение ближайшего маркера на том же скаффолде на генетической карте версии 4.0.1. Таким образом, нам удалось определить приблизительные положения для шести микросателлитных локусов.

2.5. Модель

В модели, направленной на поиск оптимальных стратегий перехода к диапаузе и реактивации покоящихся стадий (Глава 6), вычисляли значения долговременной приспособленности (см. Главу 6) 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.

3.1. Введение

У многих видов растений известна гинодиэция – полиморфизм соотношения полов в потомстве, при котором у некоторых особей имеются только женские половые органы, а другие особи представляют собой гермафродитов. У растений, гинодиэцию считают важной переходной стадией от гермафродитизма к двудомности (раздельнополости) (Ross 1970; Charlesworth, Charlesworth 1978; Charlesworth 2006). Гинодиэция может контролироваться либо только ядерными генами, либо взаимодействием цитоплазматических (обычно митохондриальных) супрессоров и ядерных восстановителей мужской фертильности. Большинство исследований гинодиэции направлено на ядерно-цитоплазматические взаимодействия (см., например, Delph et al. 2007) поскольку такой тип наследования, видимо, наиболее распространен у растений. При ядерно-цитоплазматическом взаимодействии, первоначальное распространение супрессора мужской фертильности может быть связано с «эгоистичным» действием цитоплазматических элементов, наследуемых только по материнской линии. Ядерные мутанты не могут распространяться в результате отбора «эгоистичных» элементов, поэтому при полностью ядерном контроле мужской стерильности необходимо преимущество собственной приспособленности самок по крайней мере при их низкой частоте в популяции. При большей частоте таких самок с мужской стерильностью, указанное преимущество может уравниваться отрицательным частотнозависимым отбором по соотношению полов в потомстве; обращаясь к крайнему случаю, в популяциях, полностью состоящих из самок, половое размножение невозможно. Таким образом, случаи

гинодиэции с ядерным контролем особенно интересны с точки зрения эволюционных преимуществ и недостатков гинодиэции.

В отличие от растений, у животных гинодиэция редка и ее генетическая основа неизвестна (Scharer 2009). Полиморфизм соотношения полов в потомстве, который можно считать формой гинодиэции, известен у *Daphnia pulex*, циклического партеногенетика со средовым определением пола. Дафнии размножаются клонально в течение большей части года. Тем не менее, перед наступлением неблагоприятных условий, например засухи или мороза, они обычно дают самцов и затем переходят к половому размножению, при котором самки производят покоящиеся стадии (так называемые эфиппидальные яйца), способные переживать неблагоприятные периоды. Самцы и их клональные «сестры», генетически идентичны друг другу и своим материям, т.е. клональное потомство может развиваться в самцов или самок, в зависимости от средовых сигналов, действующих на мать; мать передает сигнал развивающимся ооцитам с помощью гормональной регуляции. У *Daphnia*, самцы могут быть получены экспериментально при добавлении среду, где содержатся матери, полового гормона. (Olmstead, Leblanc 2002). Некоторые клоны *D. pulex* не реагируют на средовые стимулы, вызывающие появление самцов, и, соответственно, не производят мужского потомства (Innes, Dunbrack 1993; Innes 1997; Tessier, Saceres 2004). Это можно считать формой гинодиэции, поскольку «гермафродитные» клоны, способные давать как самцов, так и самок (при этом сосуществуют с клонами, которые производят только самок. Вслед за Иннесом (Innes 1993), мы обозначили такие клоны, соответственно, как MP и NMP, от английского «male producers» и «non-male producers». Следует отметить, что, в отличие от типичных случаев гинодиэции у растений, у дафний каждая особь при этом представляет собой либо самца, либо самку, т.е. термин «гинодиэция» у *Daphnia* относится ко всем особям клона в целом, а не к отдельным индивидуумам. Тем не менее, как и при обычной гинодиэции, NMP клоны могут существовать только в популяциях, где они сосуществуют с MP клонами, по крайней мере, в случае временных популяций, которые ежегодно возобновляются из диапаузирующих стадий.

Популяции, состоящие только из NMP клонов, в такой ситуации вымерли бы, поскольку не смогли бы отложить покоящиеся стадии, для образования которых требуется оплодотворения самцами их MP клонов.

Сосуществование MP и NMP клонов в популяции напоминает гинодиэцию еще и потому, что такие клоны могли появиться в результате супрессорной мутации. Известны предварительные данные, свидетельствующие о том, что у *D. pulex* отсутствие самцов в потомстве (NMP) контролируется ядерными генами (Innes, Dunbrack 1993). Таким образом, NMP клоны у *D. pulex* могут представлять собой переходную стадию от средового к генетическому определению пола, так же как гинодиэция у растений представляет собой переходную стадию от гермафродитизма к двудомности.

Крайняя специализации клонов в отношении производства самцов и самок отмечена также у тли *Rhopalosiphum padi*, тоже размножающейся циклическим партеногенезом (Rispe et al. 1999).

Значительные межклональные различия по соотношению полов в потомстве известны также у другого вида *Daphnia*, *D. magna*, размножающегося циклическим партеногенезом (Yampolsky 1992), хотя до настоящего времени не было ясно, связано ли это с количественной изменчивостью или с существованием MP и NMP клонов. Выявление NMP клонов *D. magna* представляет интерес, поскольку виды *D. magna* и *D. pulex* дивергировали очень давно (> 100 млн. лет, Colbourne & Hebert 1996; Kotovm Taylor, 2011), и можно предположить, что гинодиэция в этих двух таксонах развилась независимо. В совокупности с данными по NMP клонам у тлей, это может означать, что эволюция гинодиэции может часто встречаться у циклических партеногенетиков.

В настоящей работе мы исследовали NMP клонов у *D. magna*, используя пробы из восьми природных популяций с помощью гормона метиларнезоата, высокоэффективным кандидатным гормоном определения пола *Daphnia* для того, чтобы выявить клоны, которые не производят самцов даже при повышенной концентрации гормона. В сравнении с использованными предыдущими авторами средовыми стимулами, такая методика позволяет более эффективно и аккуратно

разделить МР и NMP клоны, поскольку при достаточно высоких уровнях гормона, МР клоны при партеногенезе производят только полностью мужские кладки (Olmstead, Leblanc\ 2002). С помощью митохондриальных маркеров мы исследовали филогенетические отношения NMP клонов, а также наследование NMP при различных вариантах скрещивания. Кроме того, мы исследовали связь между сезонной динамикой гамогенеза и частотой NMP клонов в одной из популяций, что позволяет предположить, каким образом в популяции сохраняются NMP клоны. Наконец, мы предложили эксперимент по выявлению присутствия редких самцов в массовой культуре NMP клонов. Это важно, поскольку присутствие таких самцов может в большой степени влиять на долговременную эволюцию NMP. Полученные данные обсуждаются в контексте происхождения и эволюционных механизмов сохранения NMP клонов у *Daphnia*.

3.2. Распространенность и частота NMP клонов в природных популяциях *Daphnia magna*

Клоны *Daphnia magna* из природных популяций качественно отличались по половому составу партеногенетических кладок после гормональной стимуляции. Большинство клонов давали только самцов (эти клоны обозначали как МР клоны), но значительная часть клонов давали только самок. Эти результаты 100% воспроизводились в различных кладках одной самки и у различных самок из одного клона (48 повторностей у одних и тех же самок, 42 повторности у разных самок одного и того же клона, см. Материалы и методы).

Не дающие самцов клоны обнаружены в популяциях BN, MZ, SPb, Tam и Vol, но не в популяциях Cav, Ism и Syz (Рисунок 3.1, Таблица 3.1). Мы не можем исключить, что NMP клоны встречаются также и в трех последних популяциях, но можем утверждать, что частота NMP клонов в последних трех популяциях была значимо ниже, чем в популяциях, где NMP клоны были обнаружены (точный критерий Фишера для объединенных выборок, $P < 0,0001$, см. также доверительные интервалы в Таблице 1). В пробах, взятых из банка эфиппидальных

(диапаузирующих) яиц, частота NMP клонов (если таковые имелись в популяции) составляла от 5% до 21%, со значимыми различиями между популяциями (обобщенная линейная модель (GLM), $P = 0,030$).



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

Частоты NMP клонов (если таковые присутствовали в популяции) были выше в планктонных пробах (средневзвешенное по размеру выборки = 34%, среднее = 32%) чем в пробах из банка покоящихся яиц (средневзвешенное = 13%, среднее = 14%). Это различие имело высокий уровень значимости при сравнении объединенных выборок планктонных и эфиппидных проб (точный критерий Фишер, $P < 0,001$), а также в популяции MZ (36% vs. 21%, точный критерий Фишера, объединенные планктонные пробы в MZ, $P = 0,016$), но не в популяции Tam (38% vs. 19%, точный критерий Фишера, $P = 0,36$). Следует обратить внимание, что в планктонных пробах частота NMP может быть оценена только

среди планктонных самок (но не в популяции в целом), поскольку исследование самцов и молоди не проводилось. В пробах эфиппиумов частоты NMP оценивали для популяции в целом, поскольку из эфиппиумов вылупляются только самки.

3.3. Исследование продукции самцов в культурах вне помещения

Соотношения полов в конце сезона: В опытах с массовыми культурами, мы не обнаружили самцов среди 7840 особей, взятых из содержащихся вне помещения массовых культур пяти NMP клонов, происходящих из четырех различных популяций (в каждой популяции пол определяли у 487-3500 особей). 95% доверительный интервал доли самцов в объединенной выборке NMP клонов составил 0-0,00056. В отличие от этого, во всех культурах MP клонов имелись самцы, с оцененной частотой 5% - 48% в зависимости от популяции. Среди 11 MP культур (10 клонов из популяций), мы обнаружили 251 самца и 653 самки, т.е. общее соотношение полов составило 28% самцов (95% доверительные интервалы 25% и 30%). В случае принятия равного веса каждой популяции, среднее соотношение полов в культуре MP клонов составило 24%.

Исследование вылупившейся молоди: Несмотря на то, что в пробах, взятых в конце сезона, не было обнаружено самцов, в нескольких массовых культурах NMP клонов после зимовки вне помещения было обнаружено небольшое число вылупившейся молоди: в одной из культур было обнаружено 46 вылупившихся самок, в остальных было обнаружено по две (в одной культуре) или по одной (три культуры) самки; в четырех культурах вылуплений обнаружено не было. В культурах каждого из трех клонов было обнаружено по меньшей мере по одной вылупившейся из эфиппиальных яиц самке, но также в каждом клоне имелась по меньшей мере одна культура, в которой самок обнаружено не было. В отличие от этого, в каждой из 37 культур 16 MP клонов было обнаружено по меньшей мере 200 вылупившихся самок.

Таблица 3.1. Количество MP и NMP самок в пробах из различных популяций и различных частей популяции (эфипп – клоны, вылупленные из эфиппидальных яиц, планкт – клоны, полученные от планктонных самок) и гаплотипы субъединицы I цитохромоксидазы с (COI) MP и NMP клонов (обозначение ранее известных гаплотипов по: De Gelas, De Meester, 2005). Доля NMP обозначает процентную долю NMP среди всех исследованных в отношении этого признака самок. В скобках приведен 95% доверительный интервал (CI).

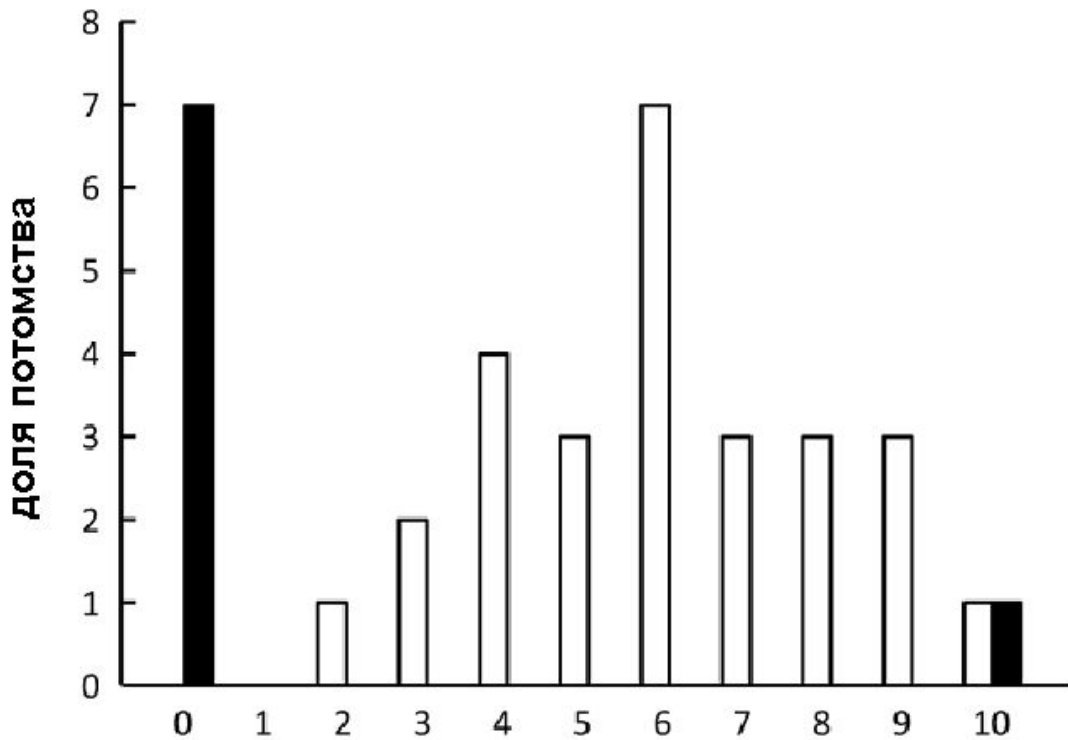
Популяция	Тип пробы	Дата сбора	N самок		Доля NMP (CI)	Гаплотипы COI (см. также Рисунок 3.2)	
			MP	NMP		MP	NMP
MZ	Эфипп	7-11-06	54	14	0,206 (0,13 - 0,32)	MZ	MZ
	Планкт	24-8-06	38	23	0,377 (0,27 - 0,5)		
	Планкт	27-9-06	48	17	0,262 (0,17 - 0,38)		
	Планкт	11-9-07	44	25	0,362 (0,26 - 0,48)		
	Планкт	2-10-07	46	29	0,387 (0,28 - 0,5)		
	Планкт	28-8-09	42	28	0,4 (0,29 - 0,52)		
Tam	Эфипп	16-7-06	58	14	0,194 (0,12 - 0,3)	H34, Tam	H34, Tam
	Планкт	16-7-06	5	3	0,375 (0,13 - 0,7)		
Ism	Эфипп	1999	61	0	0 (0 - 0,071)	H34, H8, H12	
SPb	Планкт	12-9-08	21	1	0,045 (<0,001 - 0,24)	H13	H13
BN	Эфипп	12-6-08	106	11	0,094 (0,052 - 0,16)	BN1, BN2	BN1, BN2
Syz	Эфипп	30-4-08	77	0	0 (0 - 0,057)	H8, MZ	
	Планкт	30-4-08	50	0	0 (0 - 0,09)		
Vol	Эфипп	16-6-08	80	7	0,08 (0,037 - 0,16)	H34	H34
Cav	Планкт	20-11-08	80	0	0 (0 - 0,055)	H34, H18	

В большинстве повторностей (31 из 37) число вылупившихся составляло более 500 (мы останавливали отсчет на 500 особях, но оценочное число самок в некоторых культурах превышало несколько тысяч). Хотя это показывает, что число вылупившейся молодежи в NMP культурах значительно ниже, чем в MP культурах, эти результаты также указывают на то, что в моноклональных культурах NMP клонов, возможно, происходит половое размножение и, следовательно, производятся самцы. Микросателлитные генотипы 46 потомков из NMP культуры с наибольшим числом вылупившейся молодежи подтверждают

расщепление аллелей, полностью соответствующее нормальному половому размножению: у потомства в целом имелись в точности те же аллели по 11 локусам, что и у родительского клона. Поскольку ни у одного клона из исследованных культур микросателлитный генотип не соответствовал в точности родительскому клону, можно исключить заражение культуры как возможное объяснение этих результатов. Кроме того, у потомства были обнаружены как гетерозиготы, так и обе гомозиготы по каждому локусу, при этом соотношения генотипов достаточно точно соответствовали ожидаемому менделеевскому расщеплению (25% каждой из двух гомозигот и 50% гетерозигот). Нормальное половое размножение было подтверждено также в 27 культурах МР клонов, при этом не было обнаружено ни одного случая заражения другой культурой.

Генетическое исследование потомства из моноклональных культур бессамцовых клонов: потеря гетерозиготности в различных хромосомах: Для выполнения анализа была необходима информация о положении центромерных областей. Мы приняли в качестве предположительных центромерных областей крупные нерекombинирующие участки хромосом, выявленных для каждой группы сцепления на генетической карте *D. magna*, включающей большинство скаффолдов полученной на момент публикации работы «сборки» генома *D. magna* (M. Dukic et al., неопубликованное исследование).

В потомстве клонов, полученных из эфиппидальных 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 (Рисунок 3.2). Таким образом, картина гетерозиготности центромерных областей различных хромосом указывает на то, что один из потомков был произведен в результате центрального слияния, а семь остальных – за счет терминального слияния.



Число гетерозиготных центромерных областей

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

В отличие от этого, в потомстве, вылупившемся из эфиппиальных яиц, отложенных в культуре MP клона, не была отмечена гетерозиготность или гомозиготность всех центромерных областей, за исключением одного клона, в котором все 10 центромерных областей были гетерозиготными (Рис 3. 2). Таким образом, наш анализ показывает, что эфиппиальное потомство NMP клонов образуется не в результате появления редких самцов, а в результате автомиктического партеногенеза, что подтверждает полное отсутствие самцов в потомстве исследованных клонов, не реагирующих в этом отношении на гормональную стимуляцию (NMP клоны).

3.4. *COI* гаплотипы МР и NMP клонов

В восьми исследованных популяции, мы обнаружили в целом девять различных гаплотипов фрагмента *COI* длиной 609-нп (Таблица 3.1, Рис 3.3). Анализ сети гаплотипов (Рисунок 3.3) показывает, что в каждой популяции, NMP клоны и МР клоны имели одни и те же или близкие гаплотипы *COI* но NMP клоны (а также МР 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.

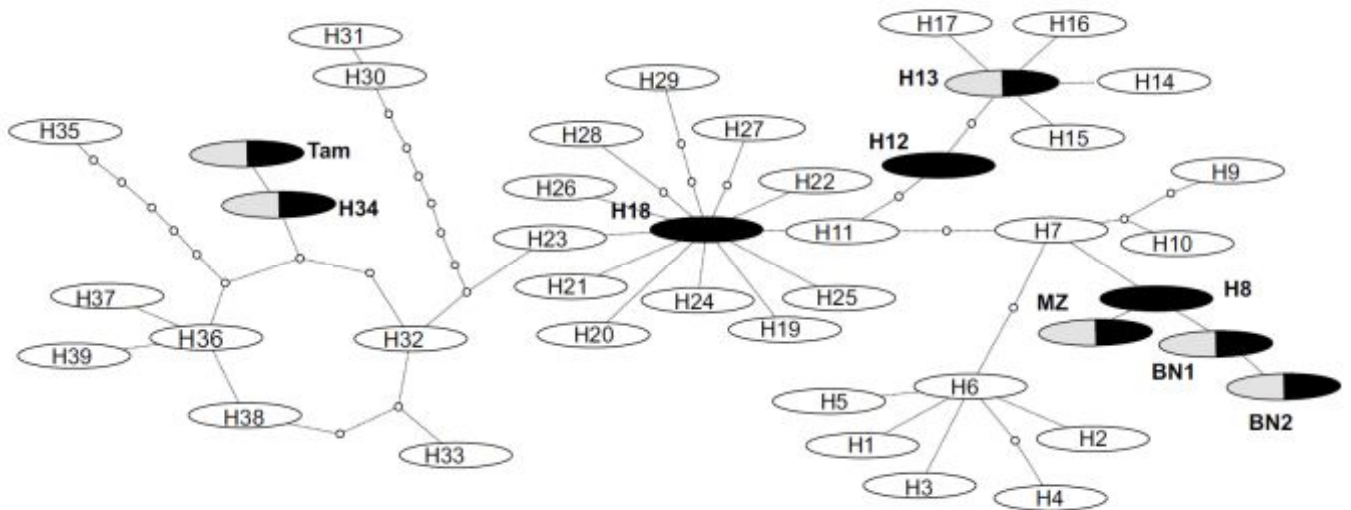


Рисунок 3.3. Сеть гаплотипов фрагмента субъединицы I цитохромоксидазы *Daphnia magna*. Показаны гаплотипы МР клонов (черный) и NMP клонов (серая заливка), обнаруженные в настоящей работе. Остальные гаплотипы взяты из базы Genbank. Обозначение названий гаплотипов согласно De Gelas & De Meester (2005),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

3.5. Популяционная динамика и половое размножение в популяции MZ

Плотность популяции MZ в 2002 году (см. Главу 4, Рисунок 4.2 А) имеет два пика: первый поздней весной и второй в середине лета. Оценки общей численности популяции в указанном пруду затруднена пространственной неоднородностью популяции. Однако имеющиеся данные (Рисунок 4.2 А)

указывают на численность вылупляющейся молодежи 100–200 особей на кубический метр $1.5\text{--}3 \times 10^5$ в целом в пруду.

Поскольку каждая вылупившаяся особь представляет собой результат гамогенеза, эта оценка относится также к количеству генетически уникальных клонов в популяции. После вылупления, эти клоны размножаются партеногенетически в течение сезона, общая численность популяции достигает порядка 10^8 на пике в начале июля, при этом численность во время июльского спада все еще порядка 10^6 особей. Комбинация данных для 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, Рисунок 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 (Рисунок 4.3 С).

3.6. Соотношение полов в природных кладках МР и NMP клоны

При исследовании особей, позднее определенных (при гормональной стимуляции) как представители МР или NMP клонов (Таблица 2), не было выявлено различий между NMP клонами и МР клонами в отношении доли особей без кладок (точный критерий Фишера для каждой отдельной пробы, в $P > 0.05$).

В кладках NMP клонов ни разу не было обнаружено ни одного самца, в то время как средняя доля кладок, состоящих из самцов, в МР клонах составляла 89%. Это различие было высоко значимым во всех трех пробах, где оно могло быть проверено (точный критерий Фишера, все $P < 0.007$). Обратите внимание, что все эти пробы были взяты в периоды, когда в популяции MZ отмечено производство самцов (Рисунок 4.3А). Дополнительно, в двух пробах, где были самки как с эфиппидальными, так и с партеногенетическими кладками, эфиппидальные кладки несколько чаще встречались среди NMP клонов (доля эфиппидальных кладок среди всех непустых кладок, точный критерий Фишера, $P =$

0.078 и $P = 0.083$ для проб 24 августа 2006 г. и 27 сентября 2006 г., соответственно). Размеры партеногентических кладок были очень близки и не отличались значимо у NMP и MP клонов (критерий Стьюдента в каждой прообе, все $P > 0.05$, Таблица 2).

3.7. Наследование NMP

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 (таблица S1). 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 NMP, 41 из 85 клонов были NMP. Различие между двумя типами скрещиваний было высокосignificantным (точный критерий Фишера для объединенной выборки NMP x MP и объединенной выборки MP x MP скрещиваний, $P < 0.001$), и доля NMP среди потомства NMP x MP скрещиваний не отличалась значимо от 0.5 (среднее = 0.48, биномиальный тест для объединенной выборки скрещиваний NMP x MP, $P = 0.83$, 95% доверительные интервалы = 0.379–0.587). Ни в одном из NMP x MP скрещиваний, эта доля не отличалась значимо от 0.5 (биномиальный тест, все $P > 0.25$), хотя размеры выборок (и, соответственно, статистическая сила) были невелики.

Задача второй серии скрещиваний состояла в проверке гипотезы о 50% наследовании признака NMP в скрещиваниях NMP x MP (поэтому контрольные MP x MP скрещивания не ставились). Результаты показывают близкое соответствие этой гипотезе (Таблица S2): Во-первых, 58 (точно 50%) из 116 клонов – потомков F₁ в скрещивании MZ (NMP) x Tam (MP) были NMP клонами (95% доверительные интервалы = 0.410–0.590). Во-вторых, 27 (47%) из 58 потомков F₁ в скрещивании NMP и MP клонов из MZ были NMP клонами (биномиальный тест различия с 50%, $P = 0.69$, 95% = 0.343–0.592). В объединенной выборке NMP x MP скрещиваний для обеих серий скрещиваний

наблюдаемая доля NMP клонов среди потомства F1 составила 48.6% (N = 259), с 95% доверительным интервалом для этой доли 42.6–54.7%.

Таблица 3.2. Природные кладки дающих (MP) и не дающих (NMP) самцов клонов (популяция MZ). Смешанных кладок отмечено не было.

Дата сбора	Реакция на гормон	Природные кладки				SR*	BS† (SD)
		♀	♂	Эф ип.	Без кладки		
24 Августа 2006	NMP	7	0	3	15	0	1,4 (0,23)
	MP	2	10	0	26	0,83	1,7 (0,23)
27 Сентября 2006	NMP	0	0	14	3	NA	NA
	MP	1	6	25	16	0,86	2,0 (0,2)
11 Сентября 2007	NMP	21	0	0	4	0	2,0 (0,2)
	MP	2	33	0	9	0,94	2,3 (0,9)
28 Августа 2009	NMP	12	0	0	16	0	2,3 (1,5)
	MP	4	24	0	14	0,86	2,5 (0,8)

*SR Соотношение полов (доля самцов от общего числа потомков) в «природных» партеногенетических кладках *etic broods*. †BS Средний размер партеногенетических кладок (пустые кладки исключены) и стандартное отклонение (SD). NA не оценивалось.

3.8. Обсуждение результатов главы

Распространение NMP клонов у Daphnia magna. В нашей работе ясно показано существование не производящих самцов генотипов у *D. magna*. Ни в экспериментах по гормональной стимуляции NMP клонов, ни в природных кладках таких клонов не было обнаружено ни одного самца, хотя исследование природных кладок проводилось в период массового появления самцов в популяции. Кроме того, самцы не были обнаружены и в поддерживаемых вне помещения культурах NMP клонов в то время, когда самцы составляли большую долю в контрольных культурах MP клонов. Несмотря на это, наши результаты указывают на то, что отсутствие самцов в потомстве NMP фенотипов может быть

не 100%. NMP клоны могут все же иногда давать самцов, хотя мы и не можем исключить альтернативного объяснения, а именно редких случаев производства эфиппидальных яиц путем аутомиктического партеногенеза. Редкие самцы известны также у бесполок видов, а также у облигатно партеногенетических линий *D. pulex* (Innes, Hebert 1988; Innes et al. 2000). Если такие самцы действительно встречаются в NMP клонах, их сохранение в процессе эволюции находится под вопросом, поскольку при очень редком производстве самцов, вредные мутации в генах, экспрессирующихся только у самцов, становятся практически нейтральными, и могут накапливаться, что должно приводить к полной потере производства самцов. Возможное объяснение заключается в том, что NMP генотипы *D. magna* могут быть сравнительно молодыми в эволюционном масштабе времени. Вне зависимости от того, как сохраняется такая способность к производству редких самцов, вопрос об их наличии или отсутствии важен с точки зрения эволюционной динамики NMP клонов. Ниже мы обсуждаем это наряду с возможным происхождением NMP клонов.

Наследование NMP у Daphnia magna. Доля NMP клонов в потомстве F1 NMP x MP скрещиваний была близка значимо не отличалась от 0.5, в то время как в потомстве MP x MP скрещиваний не было отмечено NMP потомства. Сходные данные были ранее получены для *D. pulex* (Innes, Dunbrack 1993) хотя в этом случае результаты были менее определенными, возможно в связи с неправильным определением некоторых MP клонов как NMP, поскольку в указанной работе продукцию самцов исследовали с применением средовых стимулов, а не гормональной стимуляции (Olmstead, Leblanc 2002). Результаты экспериментальных скрещиваний наилучшим образом соответствуют ситуации, когда отсутствие самцов в потомстве (NMP) определено доминантным аллелем единственного ядерного локуса (или нескольких тесно сцепленных локусов) поскольку это объясняет и наблюдаемое расщепление 1 : 1 во всех скрещиваниях NMP x MP, и наблюдаемое отсутствие NMP потомства в скрещиваниях MP x MP. Поскольку скрещивания NMP x NMP невозможны (по крайней мере, в случае полного отсутствия самцов в потомстве NMP фенотипа), эта модель предполагает,

что все NMP клоны гетерозиготны *Mm* по локусу, определяющему NMP, в то время как MP клоны гомозиготны по рецессивным аллелям (*mm*). В случае если бы аллель NMP был рецессивным, во всех скрещиваниях NMP x MP мы получали бы 50% NMP потомства только в том случае, если бы все MP клоны были гетерозиготными, однако в этом случае в скрещиваниях MP x MP мы получали бы 25% NMP потомства, что противоречит полученным экспериментальным данным.

В качестве альтернативы, полученные нами результаты можно объяснить действием наследуемых по материнской линии эгоистичных элементов, например паразитических бактерий (*Wolbachia* sp.), эгоистичных генетических элементов в наследуемых по материнской линии органеллах или половых хромосомах (Mercot et al. 1995). Поскольку такие эгоистичные элементы могут сочетаться с супрессорными мутациями, при этом могут наблюдаться различные варианты расщепления, в том числе соотношение 1 : 1 (Van Damme et al. 2004; Bailey, McCauley 2005). Считается, что у *Daphnia* нет генетических различий между полами, поэтому маловероятно существование эгоистичных генетических элементов, расположенных в половых хромосомах. Также у дафний не обнаружены *Wolbachia* или другие паразиты, вызывающие сильное смещение соотношения полов потомства в сторону самок (Fitzsimmons, Innes 2005; D. Ebert, личное сообщение). Кроме того, мы обработали 10 NMP самок из популяций MZ и Vol тетрациклином; такая обработка не привела к восстановлению у этих самок способности к производству самцов (данные не приведены). Наши результаты, однако, могут быть объяснены взаимодействием между эгоистичным митохондриальным геном, определяющим NMP и ядерным геном, восстанавливающим способность к производству самцов, с рецессивным восстанавливающим аллелем (Barr 2004). В таком случае, вызывающие NMP митохондриальные генотипы зафиксированы в популяции (в случае, если он не зафиксирован, в некоторых MP x MP было бы получено NMP потомство), однако имеется полиморфизм по локусу восстановления способности к производству самцов, так что все MP клоны гомозиготны, а NMP клоны гетерозиготны по восстанавливающему алелю, (гомозиготы NMP по невосстанавливающему

аллелю не встречаются, поскольку для этого потребовалось бы скрещивание двух NMP клонов). Однако изучение таких систем у растений показало, что межпопуляционные скрещивания часто приводят к нарушению восстановления мужской фертильности (и, соответственно, к высокой пропорции потомства с мужской стерильностью), поскольку в каждой популяции NMP аллелям соответствуют восстанавливающие аллели, специфичные для каждой популяции (Barr, 2004). В выполненном нами межпопуляционном скрещивании между клонами из популяций Tam и MZ (удаленных географически и имеющих дивергентные митохондриальные гаплотипы Рисунок 3.1, 3.2), наблюдалось расщепление 1 : 1. Этот результат может объясняться взаимодействием цитоплазматических эгоистичных элементов и ядерных восстановителей только в том случае, если действие этих восстановителей распространяется на филогенетически удаленные митохондриальные гаплотипы. Таким образом, хотя наиболее вероятным объяснением наших результатов является простой ядерный контроль с доминантой аллелем, вызывающей NMP, мы не можем исключить наличие более сложного генетического механизма. Интересно, что в другом известном случае полиморфизма системы размножения у *Daphnia*, облигатном партеногенез у некоторых линий *D. pulex*, первоначальные данные также указывали на простой ядерный контроль с единственным доминантным аллелем, вызывающей облигатный партеногенез (Innes, Hebert, 1988). Однако позднее были получены данные, указывающие на участие нескольких локусов (Lynch et al. 2008).

Происхождение NMP клонов. Мы обнаружили NMP клоны в трех удаленных филогенетических кладах митохондриальных гаплотипов *D. magna*. Если предположить, что NMP действительно определяется доминантным аллелем единственного ядерного локуса, такая NMP-аллель всегда наследуется совместно с митохондриальным гаплотипом. Поэтому существование NMP в трех кладах сети гаплотипов, разделенных 8-11 мутационными событиями, может объясняться одной из трех альтернатив: (i) NMP обусловлен предковой мутацией и встречался (или все еще встречается) также в промежуточных гаплотипах (т.е. связанные с

NMP митохондриальные гаплотипы дивергировали за счет мутаций); (ii) NMP передается из одного митохондриального окружения в другое через редких самцов; (iii) NMP появлялась многократно и независимо. Для разделения этих альтернатив требуется проведение дальнейших исследований.

Сохранение NMP клонов в процессе эволюции. В случае, если NMP действительно определяется доминантным аллелем единственного ядерного локуса, частота NMP снижается вдвое при каждом гамогенетическом размножении, поскольку лишь половина потомства NMP x MP скрещиваний представляет собой NMP, при этом все потомство скрещиваний MP x MP представляет собой MP клоны (а скрещивания NMP x NMP не происходят вовсе или очень редки). Таким образом, для сохранения в популяции NMP клонов они должны давать в по меньшей мере в два раза больше эфиппидальных яиц, чем MP клоны (в расчете на одну особь, вылупляющуюся в начале сезона) (Lloyd 1975; Charles-Worth, Charlesworth 1978). В случае *Daphnia*, это может быть достигнуто либо за счет значительного преимущества NMP клонов при клональном размножении либо при производстве эфиппидальных яиц (гамогенетическом размножении самок), например потому, что у таких клонов отсутствуют затраты на производство самцов. У коловраток было показано, что отбор способствует снижению затрат на половое размножение в течение партеногенетической фазы (Carmona et al. 2009). Действительно, в планктонных пробах мы отметили, что доля NMP клонов выше в планктонных пробах, чем среди клонов, полученных из эфиппидальных яиц, что указывает на то, что 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. Однако, пока неясно, достаточны ли эти эффекты для компенсации двукратного проигрыша NMP клонов при гамогенетическом размножении и, следовательно, стабильного сохранения NMP в этих популяциях.

В случае, если NMP обладают достаточным преимуществом для сохранения в популяции, можно ожидать сохранения стабильного полиморфизма, поскольку маловероятно, чтобы NMP зафиксировалась в популяции в силу дополнительного

давления частотно-зависимого отбора, благоприятствующего МР в случае, если NMP распространяется в популяции (в отсутствие редки NMP самцов, популяции, полностью состоящие из NMP клонов, неизбежно вымерли бы из-за неспособности к половому размножению и, следовательно, продукции покоящихся яиц).

Хотя наши данные указывают на преимущества NMP при клональном размножении и, возможно, при гамогенетическом размножении самок, причины таких преимуществ неясны. Сосуществование гермафродитов и самок (гинодиэзии) у растений в случаях, когда такой полиморфизм не связан с эгоистичными генетическими элементами, чаще всего является инбредная депрессия. Самки, в отличие от гермафродитов, неспособны к самооплодотворению, и поэтому в случаях, когда самооплодотворение встречается достаточно часто и оказывает значительное влияние на приспособленность, это может объяснять существование генетических самок. Сходные аргументы были использованы для объяснения сосуществования NMP/MP в североамериканских *D. pulex* (Innes, Dunbrack 1993). В этом исследовании предполагается, что равновесная частота у P^* NMP клонов определяется формулой:

$$P^* = (1 - 2XF)/(2 - 2XF) \quad (1)$$

где F обозначает долю самок среди всех размножающихся половым путем особей MP клонов, а X обозначает выживаемость потомства MP x MP скрещиваний в сравнении с потомством NMP x MP скрещиваний (Innes, Dunbrack 1993). При этом предполагается, что $F < 1$, в силу инбредной депрессии. Инбредная депрессия хорошо известна у *Daphnia* (Innes 1989; De Meester, Vanoverbeke 1999; Naag et al., 2002), однако частота инбридинга (внутриклональные скрещивания, генетически эквивалентные самооплодотворению) в крупных популяциях *Daphnia*, видимо, довольно низка из-за большого числа клонов и отсутствия ассортативного скрещивания (Mitchell et al. 1995; De Meester, Vanoverbeke 1999). Наша консервативная оценка числа уникальных клонов, ежегодно вылупляющихся каждую весну в популяции MZ оставляет 1.5×10^5 . Даже при

условии сильного клонального отбора в течение сезона, вероятность внутриклонального скрещивания в популяции MZ едва ли превышает 10^{-4} . Кроме того, было показано, что популяция MZ отличается высоким генетическим разнообразием (Yampolsky, Kalabushkin 1992; Yampolsky, Galimov 2005; Walser, Naag 2012). На основании этих оценок, X должно быть менее 0.9995.

Исходя из предположения, что доля NMP генотипов в банке эфиппидальных яиц (20.6%) соответствует равновесному значению для популяции of MZ, и предполагая, что инбридинг происходит редко (X близко к 1), ожидаемая доля самок среди размножающихся половым путем особей (самцов и половых самок) MP клонов $F = 0.37$. Это указывает на то, что MP клоны могут в определенной степени специализироваться на мужской функции (т.е. могут производить больше самцов, чем они производили бы в отсутствие NMP клонов), как предсказано в модели Innes, Dunbrack (1993). Однако, значение F в популяции, полностью состоящей из MP клонов, остается неизвестным, и параметр F в целом достаточно сложно оценить в популяции *Daphnia*, поскольку многие самки могут никогда не размножаться половым путем. Партеногенетическая самка, дающая потомство женского пола, вкладывает ресурсы как в будущее половое размножение, так и в будущее партеногенетическое размножение, в то время как производство потомства мужского пола вносит вклад только в половое размножение. Поэтому можно предположить, что соотношение полов среди половых особей в популяциях, состоящих из MP клонов, соотношение полов если и можно ожидать смещения соотношение полов в сторону избытка самок (т.е. $F > 0.5$). Низкое ожидаемое значение F в популяции MZ, наряду со склонностью MP клонов к производству самцов при партеногенетическом размножении (Таблица 2) может указывать на определенную степень мужской специализации MP клонов в популяции MZ.

3.9 Выводы главы

Наше исследование указывает на полиморфизм системы размножения у *D. magna*, аналогичный полиморфизму, отмеченному у далекого вида *D. pulex*, а также у тлей (Innes, Dunbrack 1993; Rispe et al. 1999); это означает, что эволюция NMP клонов у цилических партеногенетиков может быть нередким явлением. Более того, наши данные указывают на частичную мужскую 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. В случае организмов с чисто половым размножением, можно было бы предсказать разделение на генотипы, дающие только самцов, и генотипы, дающие только самок (Innes, Dunbrack 1993). Одной из возможных причин, по которой такое разделение не происходит у дафний, состоит в том, что самки необходимы для партеногенетического размножения даже MP клонов (Innes, Dunbrack 1993).

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

"Daphnia magna имеет очень ограниченное распространение, я находил ее только в прудах Зоологического Сада, где огромное большинство попадает без шипов. D. magna замечательна тем, что встречается даже и зимой в большом количестве". (Корчагин 1887)

4.1. Введение

Диapaуза представляет собой адаптацию к регулярному чередованию благоприятных и неблагоприятных периодов и служит для переживания последних. При этом диapaуза – это не вынужденная реакция на наступление неблагоприятного периода, а серия физиологических процессов, инициируемых сигнальными факторами среды, которые сами по себе могут быть как неблагоприятными для активных стадий, так и вполне нейтральными (Алексеев 1990). Время перехода к диapaузе и время выхода из нее очень важны для выживания и успешного размножения активных стадий организма и, как принято считать, находятся под действием сильного отбора. Поэтому можно ожидать, что картина диapaузы в каждой природной популяции отражает локальную адаптацию к конкретным условиям, в которых эта популяция обитает (Данилевский 1961; Hairston, Olds 1984; Алексеев 1990; Voersma et al. 1999, Roulin et al. 2013).

Диapaузирующие эмбрионы, или эфиппидальные яйца дафний, хорошо защищены от неблагоприятных воздействий и могут оставаться в состоянии диapaузы на протяжении многих лет, образуя банки покоящихся стадий, часто намного превышающие по численности активную часть популяции.

Сезонная картина диapaузы *Daphnia* крайне разнообразна и отражает разнообразие биотопов, населенных разными представителями этого рода ветвистоусых ракообразных. В промерзающих зимой или пересыхающих летом

временных водоемах период существования популяций активных стадий *Daphnia* просто ограничивается наличием жидкой воды (Edmondson 1955; Stross 1969a; Stross, Kangas 1969; Yurista, O'Brien 2001; Perez-Martinez et al. 2007; Schwartz, Hebert 1987; Caceres, Tessier 2004a).

В постоянных водоемах большее влияние на существование активных особей *Daphnia* оказывают факторы, не вызывающие их быструю и безусловную гибель: температура воды, количество пищи, наличие хищников и т.п. (Ferrari, Hebert 1982; Pijanowska, Stolpe 1996). При этом одни и те же сочетания этих факторов могут быть благоприятными для одного вида *Daphnia* и экстремальными для другого вида, населяющего тот же водоем, что отражено и в картине диапаузы каждого из сосуществующих видов (и, наоборот, различия в картине диапаузы могут отражать и различия в экологии видов, важные для их успешного сосуществования в одном водоеме). Различия в картине диапаузы у сосуществующих видов *Daphnia* хорошо известны из литературы. Так, во временных водоемах в бассейне Великих Озер Северной Америки, холодолюбивая *Daphnia ephemeralis* переходит к диапаузе уже в начале апреля, вскоре после освобождения водоема ото льда и к середине мая исчезает из планктона, а населяющая те же водоемы *D. pulex* начинает откладывать эфиппиумы лишь в мае, и ее популяции сохраняются в планктоне до пересыхания водоема в июне-июле (Schwartz, Hebert 1987; Caceres, Tessier 2004a). Для *D. pulicaria* в озерах штата Мичиган характерен частичный переход к диапаузе в конце весны – начале лета (Caceres, Tessier 2003), перед падением численности популяции, связанным с прессом хищников, при этом *D. pulicaria* присутствует в планктоне озер в течение всего года. Живущая в тех же озерах *D. dentifera* представлена в планктоне лишь с мая по декабрь (Caceres, Tessier 2004a), при этом осенью, перед гибелью активной части популяции, у *D. dentifera* к диапаузе переходит 100% особей этого вида.

Эти работы показывают значительные различия в сезонности диапаузы, когда сосуществующие и конкурирующие виды доминируют в различное время года. При этом остаются мало исследованными различия в диапаузе видов со

сходной сезонной динамикой. В настоящей работе мы приводим данные по сезонной динамике и двух сосуществующих видов *Daphnia*, доминирующих в планктоне в теплое время года, и обсуждаем роль и особенности диапаузы в жизни каждой из этих популяций.

4.2. Динамика активной части популяции

Температура воды: На Рисунок 4.1 проиллюстрирован общий характер изменения температуры воды в исследованном пруду в 2001–2002 и 2011 годах. В целом в зимнее время, когда водоем покрыт льдом (обычно с декабря по апрель), температура стабильна, около $+2^{\circ}\text{C}$; после таяния льда, которое происходит в марте-апреле, температура повышается, достигая в мае 20°C , однако в мае и начале июня температура может колебаться в диапазоне $12\text{--}22^{\circ}\text{C}$, с конца июля по начало августа температура стабильно выше 20°C , достигая в разные годы $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$; а с середины августа монотонно падает до конца октября; в октябре-ноябре температура может колебаться от 2 до 8°C , и становится стабильной после ледостава в декабре.

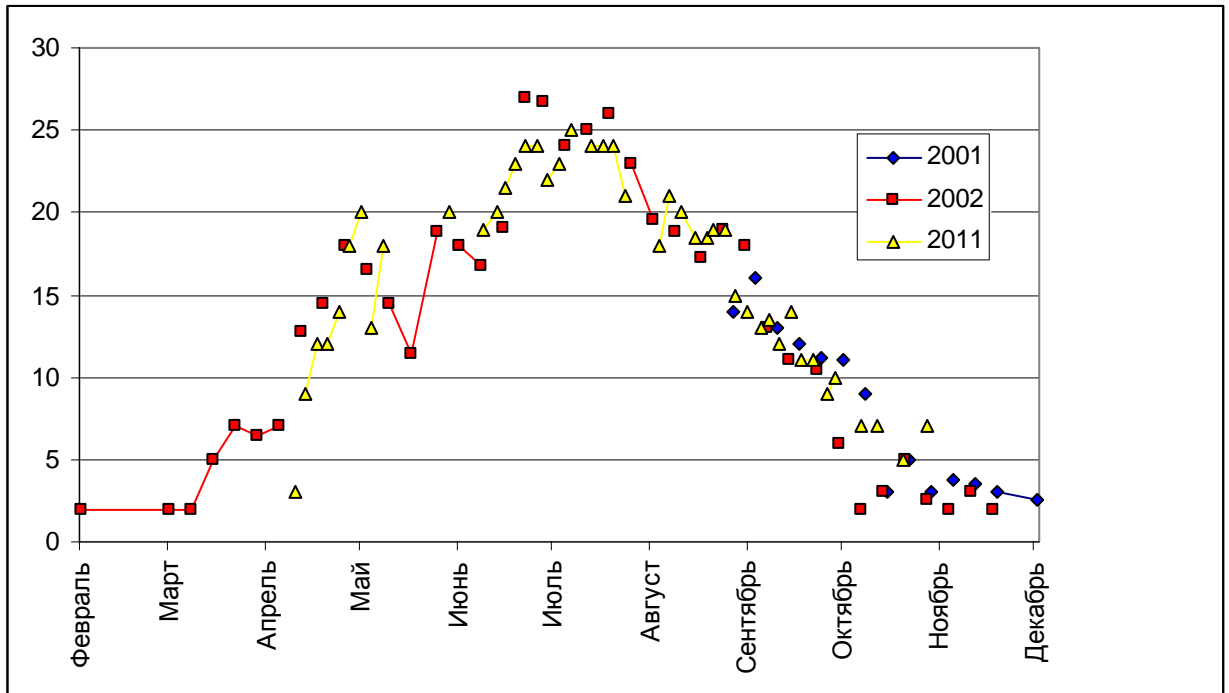


Рисунок 4.1. Температура поверхности воды в пруду Московского Зоопарка в 2001-2002 и 2011 гг.

D. magna: Во все годы наблюдений, молодь *D. magna* появлялась в планктоне вскоре после схода льда. Календарные сроки появления молодежи менялись от года к году. Например, в 2002 году первые *D. magna* были обнаружены в планктоне уже 20 марта, а в 2011 – лишь 21 апреля. При этом в первое время после появления, численность *D. magna* в планктоне была очень низка (единичные особи в кубическом метре воды). Первые взрослые самки *D. magna*, несущие партеногенетические кладки, попадались в планктоне лишь после прогрева воды в конце апреля – начале мая, даже в те годы, когда первая молодь появлялась в планктоне уже в марте. В различные годы численность популяции перед началом партеногенетического размножения составляла от 40 до 300 особей на м² площади пруда; в пересчете на весь объем пруда, численность популяции *D. magna* в это время составляла 0.6 – 4.5 x 10⁵ особей.

После начала партеногенетического размножения, численность популяции быстро увеличивалась благодаря высокой плодовитости (средний размер кладки на пике плодовитости составил около 12 яиц и около 30 яиц, максимум 70 яиц в 2002 и 2011 гг., соответственно) и высокой (15–25°C) температуре воды. Через несколько недель численность популяции достигала пика, составляя в это время порядка 10⁸ в пруду в целом (30–100 особей в литре воды). Резкое увеличение численности популяции сопровождалось падением плодовитости. К концу мая – началу июня средний размер партеногенетических кладок снижался до приблизительно 2 яиц, при этом у значительной части или даже большинства взрослых самок выводковые камеры пустовали (эти кладки не учтены при расчете плодовитости на Рис 3.2, В) В это же время увеличивалась пространственная неоднородность популяции. Дафнии собирались в «рои» с плотностью в сотни и даже тысячи особей на литр воды, при этом за пределами роя встречались лишь единичные особи (см. данные для 2002 года, Рис 4.2 А) Это сильно затрудняло оценку численности популяции. Тем не менее, можно уверенно говорить о том, что после снижения плодовитости происходило и снижение численности популяции, в разной степени выраженное в разные годы. Так, если в 2002 году (а

также почти во все остальные годы наблюдений, данные не показаны), после некоторого падения в июне, плотность популяции стабилизировалась в июле на фоне очень низкой плодовитости, то в 2011 году падение численности продолжилось в июле-начале августа, достигнув значений, характерных для начала весны (Рисунок 4.1). После такого резкого спада в августе 2002 года плодовитость самок резко возросла и популяция достигла второго пика численности в конце августа - начале сентября.

Половое размножение происходит в популяции *D. magna* почти исключительно в конце сезона. За всего время наблюдений лишь в 2011 году наблюдений эфиппидальные самки *D. magna* появились в планктоне в июне, причем в очень небольшом количестве (0.3–5% кладок взрослых самок были эфиппидальными, Рисунок 4.3 А, С). Осенний период гамогенеза начинается в конце августа или начале сентября, и в его начале лишь незначительная часть самок несет эфиппидумы. Затем доля эфиппидальных кладок резко возрастает, быстро достигая 100%. Момент, когда доля эфиппидальных самок в популяции достигло 50%, приходилось в различные годы на 14–22 сентября. К середине октября самки полностью переходили к половому размножению, партеногенетические кладки в конце сезона у *D. magna* не встречаются.

Хотя нуждающиеся в оплодотворении эфиппидальные самки *D. magna* регулярно и в большом количестве появлялись лишь осенью, и лишь в 2011 году единичные эфиппидальные самки появились в начале сезона, самцы *D. magna* во все годы появлялись в популяции дважды: в сравнительно небольшом количестве (от долей процента до 7%) в мае-июле, и в значительном количестве (до половины численности популяции и более) к августу-сентябрю. Варьирование доли самцов от года к году было более выражено, чем варьирование доли эфиппидальных кладок (Рис 4.3 А, С).

D. pulex: В отличие от *D. magna*, которая в начале весны во все годы была представлена только новорожденной молодежью, возрастная структура популяции *D. pulex* в начале сезона различалась от года к году. В 2003, 2011 и 2012 годах *D.*

pulex, как и *D. magna*, была представлена в первых планктонных пробах только молодью первой и второй ювенильных стадий, но в 2002 и 2004 гг. сразу после схода льда в планктоне встречались взрослые самки с большими кладками партеногенетических яиц. При этом даже в те годы, когда в первых после схода льда планктонных пробах встречалась только молодь этого вида, партеногенетические самки появлялись в популяции *D. pulex* раньше, чем у *D. magna*. Так, в 2002 году массовое созревание самок *D. pulex* отмечено к 15 апреля (первые партеногенетические самки *D. magna* отмечены 29 апреля), в 2011 году первые партеногенетические самки *D. pulex* появились 28 апреля (а *D. magna* - 5 мая).

В целом, динамика популяции *D. pulex*, сходна с таковой *D. magna*. В начале сезона происходит увеличение численности самок, обусловленное вылуплением молоди из покоящихся яиц или партеногенетическим размножением немногочисленных взрослых самок. После того, как молодь массово достигает половозрелости, происходит быстрый рост популяции благодаря высокой плодовитости (кладки более двадцати, максимум до 98 партеногенетических яиц, Рисунок 4.2 В, D). По мере увеличения численности популяции снижается плодовитость, численность популяции после весеннего пика (когда она достигает 1000 особей в литре воды) также снижается (обычно до 10-20 особей в литре), после чего плодовитость несколько повышается в начале августа. В отличие от *D. magna*, в конце сезона во все годы часть самок *D. pulex* продолжала размножаться партеногенетически, причем партеногенетическое потомство состояло преимущественно из самок.

Картина гамогенеза *D. pulex* похожа на таковую у *D. magna*. Эфиппиальные самки ежегодно появляются в конце сезона и лишь в некоторые годы (1998 и 2012) эфиппиальные самки встречались в мае-июне, при этом они составляли 8–30% от всех самок с кладками. *D. pulex* переходит к гамогенезу позже, чем *D. magna*, и сроки перехода в большей степени варьируют от года к году (за время наблюдений, момент перехода 50% к гамогенезу приходился на 7 октября – 10 ноября), причем в некоторые годы доля эфиппиальных кладок снижалась к

ноябрю (Рисунок 4.3 В, D). При этом такие поздние кладки содержат потомство исключительно женского пола (данные 2002 и 2003 года, не показаны). Как уже было сказано, даже во время осеннего пика гамогенеза доля эфиппидальных самок у *D. pulex* не достигает 100%: в конце сезона она составляет около 90%.

Как и у *D. magna*, самцы *D. pulex* каждый год появляются дважды: первый раз – в начале лета, после резкого ухудшения пищевых условий при весеннем пике численности, второй раз – в конце лета, перед осенним переходом к откладке эфиппидальных кладок. Доля самцов в летнее время была ниже, чем у *Daphnia magna* (не более 3% от общей численности популяции).

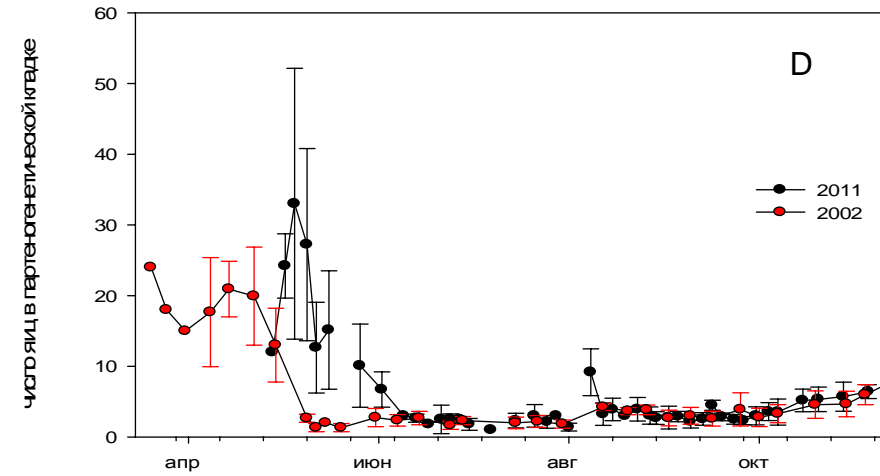
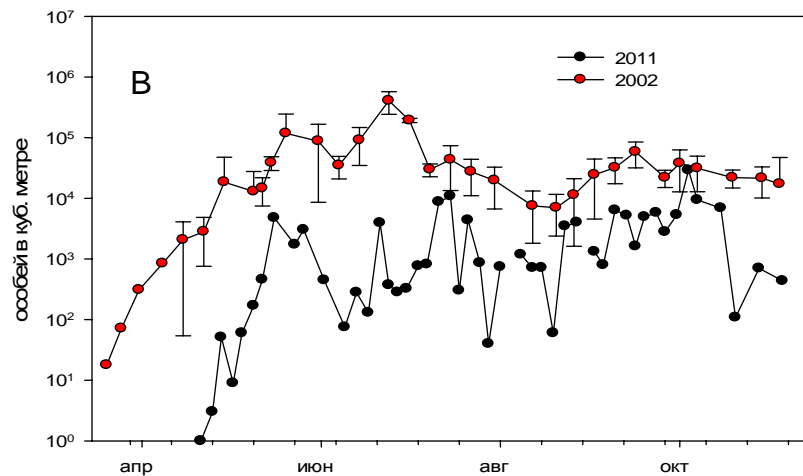
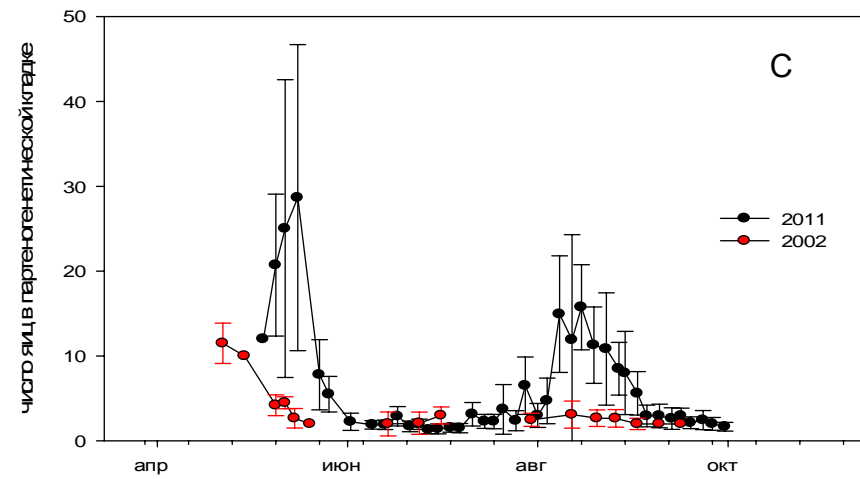
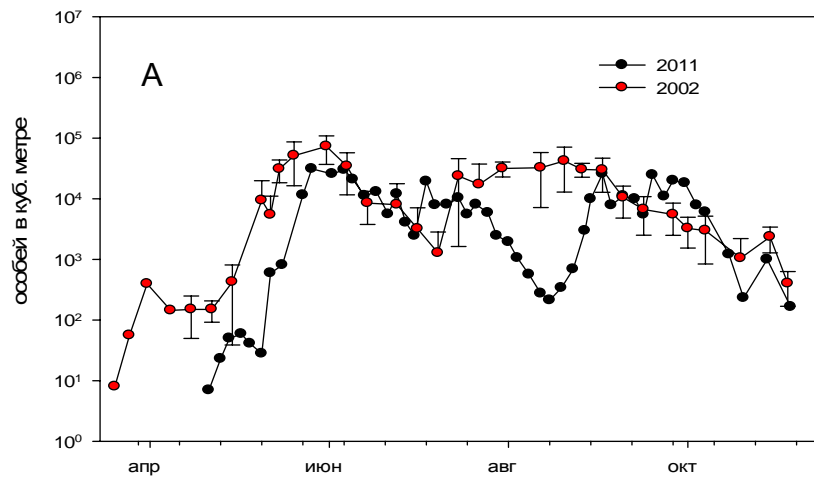
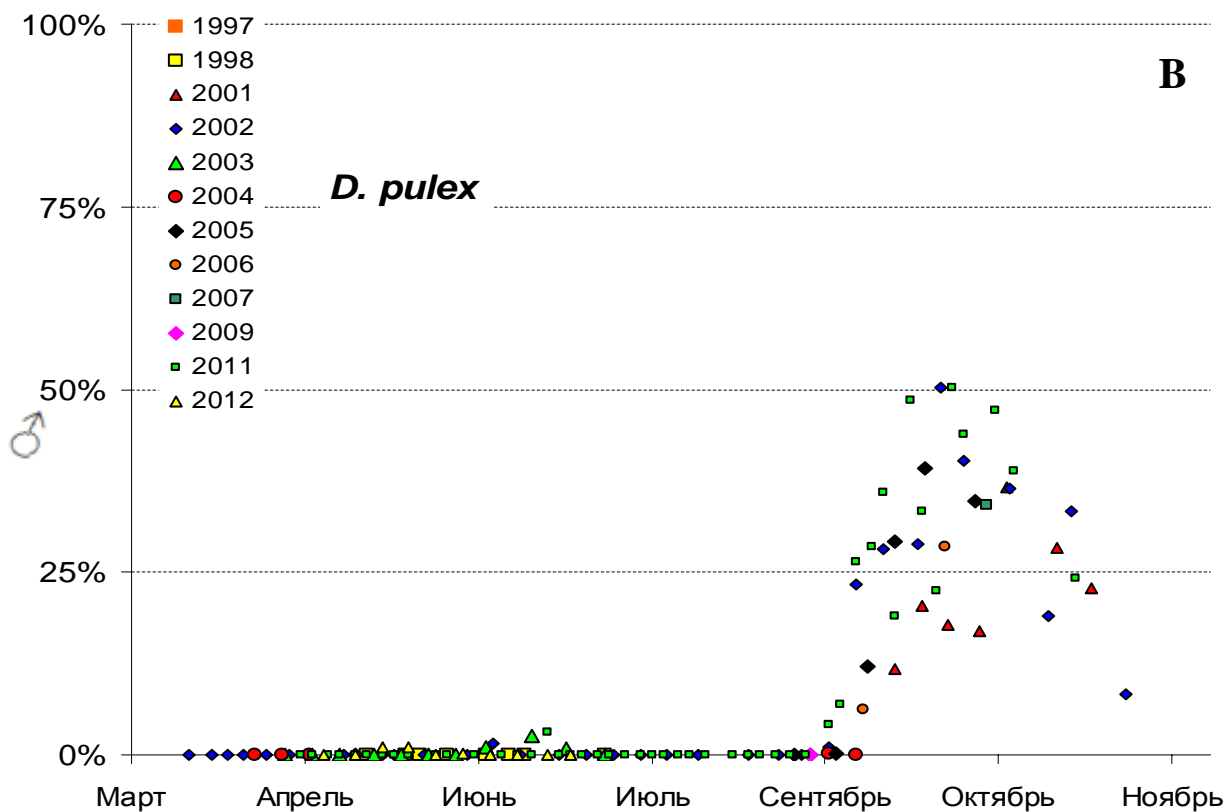
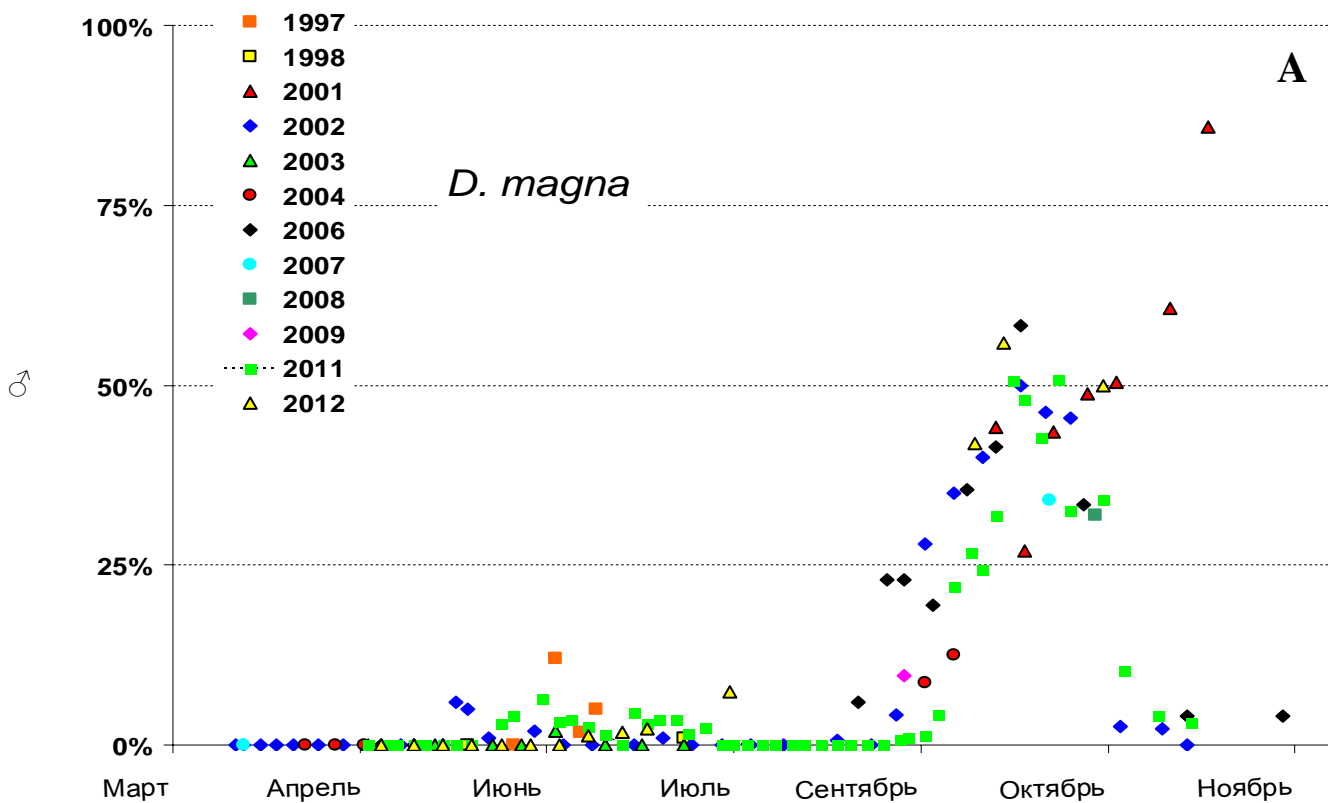


Рисунок 4.2. Численность и плодовитость *D. magna* (A, C) и *D. pulex* (B, D) в пруду Московского зоопарка в 2002 и 2011 гг. Для 2002 года показаны средние значения и стандартные отклонения плотности популяции для четырех точек в пруду (см. *Материалы и методы*), для 2011 года – данные для объединенной пробы. Стрелками показаны даты первого появления самок с партеногенетическими кладками. На графиках плодовитости показаны средние значения и стандартные отклонения для размера кладок (без учета взрослых самок с пустыми выводковыми камерами).



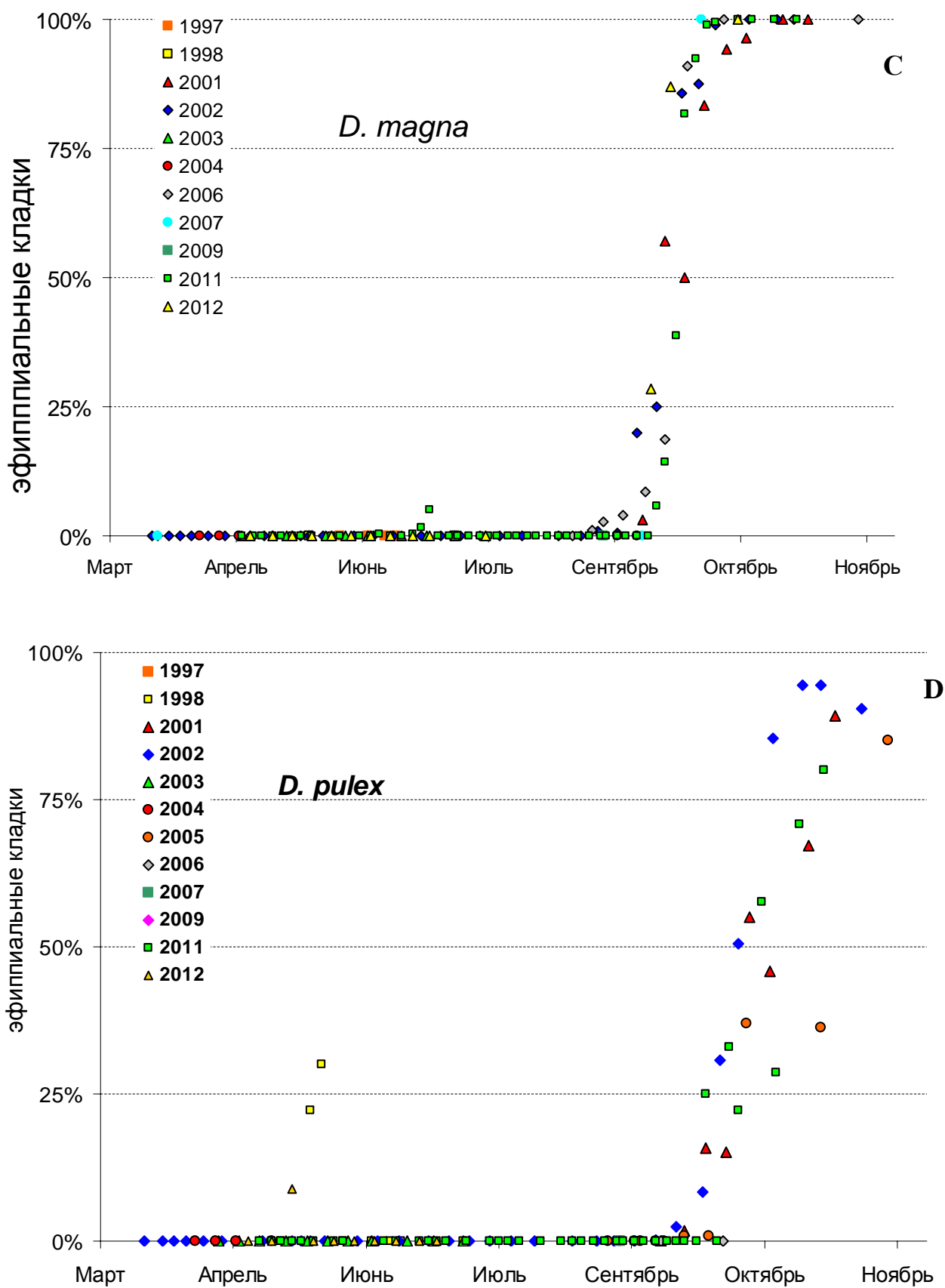


Рисунок 4.3. Доля самцов в популяции (А, В) и доля эфиппильных кладок среди их общего числа (С, D) у *D. magna* (А, С) и *D. pulex* (В, D) за все время наблюдений в пруду Московского зоопарка.

4.3. Банк покоящихся яиц

Структура банка покоящихся яиц в точке сбора в феврале 2003 года проиллюстрирована на Рисунке 4.4, где указана численность эфиппиумов в слое донных осадков толщиной 1 см, в пересчете на 1 м². Показано именно число эфиппиумов, каждый из которых может включать не более двух покоящихся яиц.

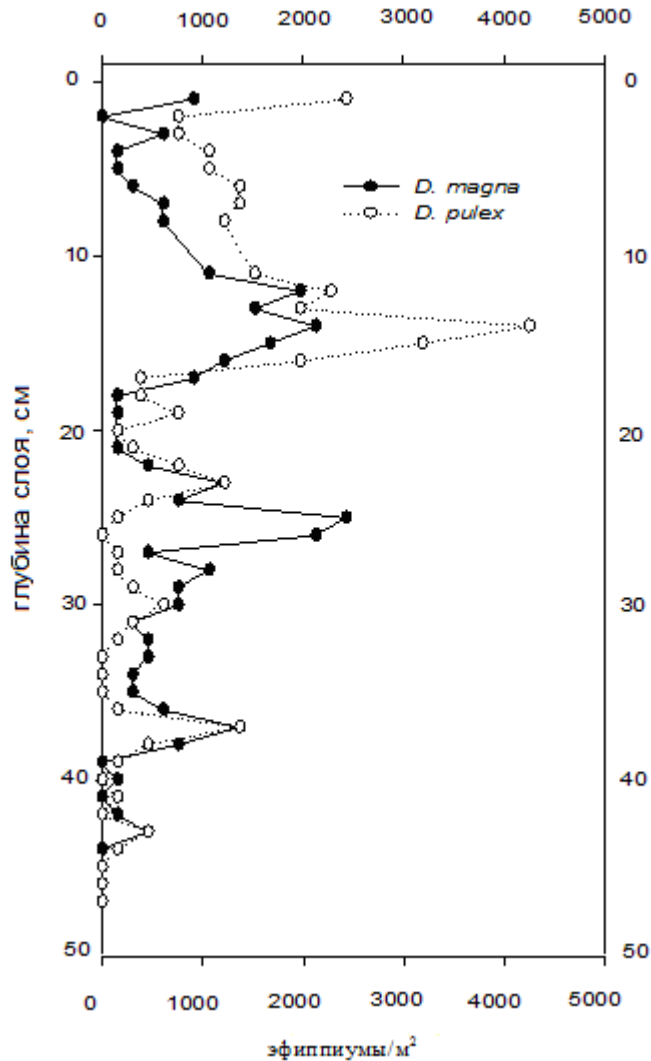


Рисунок 4.4. Структура банка покоящихся стадий в популяции MZ. Данные относятся к количеству эфиппиумов в слое осадков толщиной 1 см, в расчете на 1 м² площади дна.

4.4. Обсуждение результатов главы

Структура банка покоящихся яиц и продолжительность сосуществования двух видов Daphnia: Изучение банка покоящихся яиц позволяет успешно реконструировать историю популяций *Daphnia* в том случае, если в этих популяциях важную роль играет половое размножение (Jankowski, Straile 2004).

В нашем случае, популяции обоих видов *Daphnia* образовали значительный банк покоящихся яиц, распространяющийся до слоев осадков глубиной >40 см. По предварительным оценкам (предварительные опыты по активации покоящихся яиц из колонк грунта), жизнеспособность сохраняет значительная часть эфиппидальных яиц обоих видов, полученных из слоев осадков вплоть до глубины 18 см, а общая численность жизнеспособных эмбрионов в верхних 18 см составляет для каждого из видов порядка нескольких тысяч особей на м² (собственные неопубликованные данные). Мы не проводили датировку взятых проб осадков, однако, исходя из оценок скорости накопления осадков в сходных водоемах (1 см/ год согласно Cousyn et al. 2001), к 2013 году *D. magna* и *D. pulex* сосуществуют в исследованном водоеме уже более 50 лет. Наблюдения планктонной популяции подтверждают, что время сосуществования двух видов дафний в этом пруду Московского Зоопарка превышает 25 лет (Yampolsky, Kalabushkin 1992; Л.Ю. Ямпольский, личное сообщение).

Пополнение банка покоящихся яиц: Дать нижнюю оценку числа покоящихся яиц, откладываемых ежегодно в популяции *Daphnia*, можно исходя из максимальной численности эфиппидальных самок, одновременно встречающихся в планктоне: эти самки уже несут в выводковых покоящиеся эмбрионы, и даже в случае гибели самок их диапаузирующее потомство пополнит банк диапаузирующих яиц. В различные годы оценочная максимальная плотность эфиппидальных самок составила для *D. magna* 430 (2001 г), 440 (2002 г); 1910 (2006 г); 1210 (2011 г) и 1100 (2012 г) особей/м², а для *D. pulex* 729 (2001 г), 1070 (2002 г), 546 (2011 г). Учитывая, что большинство эфиппидумов при откладке

содержит по два покоящихся яйца (приблизительно 38 яиц на 20 эфиппиумов, данные для 2011 г), можно дать минимальную оценку ежегодной продукции покоящихся яиц как 800-3800 яиц/ м² для *D. magna* и 100-2000 яиц/ м² для *D. pulex*.

Пополнение активной части популяции: До момента выхода первого партеногенетического помета из яйцевых сумок матерей, увеличение численности популяции, очевидно, происходит за счет выклева молоди из покоящихся яиц. Поэтому численность популяции в момент появления первых партеногенетических самок (с еще незрелыми яйцами) позволяет приблизительно оценить численность особей, вылупившихся к этому моменту из эфиппиумов. Такая оценка количества вылупляющихся из эфиппиумов дафний заведомо занижена, так как не учитывает ни смертность вылупившейся молоди, ни прибавку за счет молоди, вылупившейся из эфиппиумов уже после начала партеногенетического размножения. Следует, однако, отметить, что именно особи, вылупившиеся из эфиппиумов к тому моменту, как в популяции появятся первые партеногенетические кладки, вносят основной вклад в дальнейшее размножение популяции. Погибшие особи, очевидно, не участвуют в размножении; молодежь, вылупившаяся после начала партеногенетического размножения, в это время весьма интенсивного «теряется» в массе партеногенетического потомства: так, уже через неделю после начала партеногенетического размножения потомство самки, размножающейся партеногенетическим путем, может превышать 100 особей, в то время как самка, вылупившаяся в момент, когда в популяции началось партеногенетическое размножение, к этому времени лишь достигнет половозрелости.

Тем не менее, позднее вылупление, в принципе, может играть определенную роль в динамике и генетическом составе исследованных популяций *Daphnia* в том случае, если происходит уже после пика численности популяции в начале лета, когда на фоне снижения численности и низкой плодовитости активных особей вклад вылупления из эфиппиумов в общее изменение численности может быть существенным (Крылов и др., 1997). При этом сохранение популяции в планктоне

может быть связано как с переживанием взрослых особей, так и за счет вылупления молоди. Ранее нами было показано, что в условиях недостатка пищи *D. magna* из популяции Московского Зоопарка могут жить до 2-3 месяцев (Iampolsky, Galimov 2004), и в большинство лет (например, 2002 г.), видимо именно взрослые самки со сниженной плодовитостью переживают неблагоприятный сезон. Однако, например, в 2011 году численность популяции в середине лета снизилась до значений, сравнимых с численностью вылупляющихся весной особей. Косвенные данные (резкое изменение частот генотипов в популяции *D. magna*) указывают на то, что такое вылупление, возможно, действительно внесло свой вклад в динамику популяции в этот год.

Таким образом, наши результаты позволяют говорить о важной роли, которую играет зимняя диапауза в динамике популяций *D. pulex* и *D. magna*, населяющих исследованный водоем. Долговременное существование обеих популяций невозможно без откладки покоящихся яиц, так как активная часть популяции обоих видов регулярно гибнет в зимнее время.

Тем не менее, роль зимней диапаузы у двух исследованных видов различна. Активная часть популяции *D. magna* никогда не переживает зиму и каждую весну возобновляется из покоящихся яиц. В популяции же *D. pulex*, по крайней мере в некоторые годы, небольшая часть самок переживает зиму, и весенний пик численности обеспечивается не только вылуплением молоди из покоящихся яиц, но и рождаемостью партеногенетических самок. Форма осеннего перехода от партеногенетического к половому размножению соответствует различной роли зимней диапаузы у *D. magna* и *D. pulex*. Хотя в конце осени эфиппидальные самки доминируют в популяциях обоих видов, у *D. pulex*, в отличие от *D. magna*, их доля среди размножающихся самок не достигает 100%, причем партеногенетические кладки состоят исключительно из эмбрионов женского пола. Таким образом, в популяции *D. pulex* сочетаются две стратегии переживания зимы: большая часть популяции переживает зиму в виде диапаузирующих эмбрионов, однако часть особей остается в планктоне. Наши наблюдения указывают на то, что зимующие самки *D. pulex* успешно переживают не все зимы.

В связи со сложностью взятия подледных проб в мелководных водоемах, нам не удалось получить прямые данные по зимней динамике популяций *Daphnia*.

Однако об успехе зимовки можно косвенно судить по размерной структуре популяции сразу после схода льда. Так, в ранних планктонных пробах 2002 и 2004 году присутствовали как взрослые самки *D. pulex*, так и молодь, а в 2003 и 2011 году в ранних пробах присутствовали только самки ранних ювенильных стадий. При этом зимы 2002 и 2004 года были мягче (среднезимние температуры воздуха -5.3°C и -5.2°C , соответственно, таяние льда произошло в марте), чем зимы 2003 и 2011 года (среднезимние температуры -9.4°C и -8.5°C , соответственно, таяние льда произошло в конце апреля). В холодные зимы водоем к концу зимы промерзает почти до дна, что может вызывать недостаток как кислорода, так и пищи. При этом из-за большей толщины льда он тает дольше, так что дольше продолжается и неблагоприятный для дафний период времени. Тем не менее, во все годы часть самок *D. pulex* продолжает размножаться партеногенетически до конца сезона.

Сосуществование различных стратегий зимовки (диапаузы и зимовки активных особей) описано для *D. pulex* в озерах умеренного климата (Lampert et al. 2010) и для *D. umbra* в альпийских озерах (Larsson, Wathne 2006). Авторы предполагают, что устойчивое сосуществование таких стратегий обусловлено чередованием лет, в различной степени благоприятных для зимовки активных особей. Мы также предполагаем, что неполный переход к диапаузе в популяциях связан с преимуществом самок, переживающих короткие и мягкие зимы, поскольку плодовитость таких самок в начале сезона весьма высока, и они успешно размножаются.

Наши данные указывают на худшую приспособленность *D. magna* к низким температурам по сравнению с *D. pulex*. Так, в 2002 году, при низких температурах (около 5°C) время созревания молоди *D. pulex*, судя по размерной структуре популяции, составило около 2.5 недель, а *D. magna* созревали не менее 5 недель и созрели, когда температура воды уже повысилась до 12°C . Кроме того, у *D. magna* наблюдали некоторое падение численности перед началом партеногенетического

размножения (Рисунок 4.3 С), которое, возможно, указывает на высокую смертность вылупившейся молоди при низких температурах.

Возвращаясь к стратегиям переживания зимы на стадии активных или диапаузирующих особей, можно предположить, что, теплые зимы парадоксальным образом оказываются благоприятными для *D. pulex* - вида, лучше адаптированного к низким температурам.

Неадаптивность жизненных стратегий: 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. Поскольку самцы никак не участвуют в партеногенезе, их производство снижает скорость увеличения численности клона и представляет собой лишь один (наряду с производством гамогенетических яиц) из путей пополнения банка покоящихся стадий. Однако эфиппидальные самки в начале сезона практически никогда не встречались. В популяции *D. magna* они появились лишь в 2011 году, и даже в это время соотношение полов среди половых особей (взрослые самцы и эфиппидальные самки) составляло более 9:1. В популяции *D. pulex* эфиппидальные самки появились в начале сезона в сравнительно большом количестве дважды – в 1998 и 2012 годах, однако в даты их появления (середина мая) самцы в популяции не были обнаружены (они появлялись позже, в июне), и яйца в эфиппидумах, скорее всего, оставались неоплодотворенными. Таким образом, и раннее производство самцов обоими видами, и раннее производство эфиппидальных яиц *D. pulex*, видимо, представляет собой в исследованных популяциях напрасную трату ресурсов. В то же время следует отметить, что частичный переход к диапаузе в целом характерен для популяций *Daphnia* умеренного климата, в частности и для *D. magna* и *D. pulex* (личные наблюдения автора).

Еще одним примером неадаптивности является неполный переход к диапаузе в популяции *D. pulex* в годы, когда зимние условия не позволяли перезимовать активным особям. В этой ситуации, производство партеногенетического

потомства перед замерзанием водоема также представляет собой напрасный расход ресурсов.

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. Например, производство самцов в начале сезона может быть выгодным в редкие годы, когда в это время массово появляются эфиппидальные самки, например при пересыхании водоема (нами не наблюдавшегося). С другой стороны, такое неадаптивное поведение может объясняться эволюционными ограничениями или просто низкой скоростью эволюции и сохранением полиморфизма, которому способствует наличие банка покоящихся яиц. Наши данные не позволяют выбрать какое-либо одно из указанных объяснений.

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

5.1. Введение

Чередование диапаузы и фазы активного развития и размножения типично для многих пресноводных беспозвоночных, населяющих временные и сезонные водоемы, в том числе для *Daphnia*. В особенности важную роль диапауза играет в тех популяциях, где планктонная часть не переживает неблагоприятный сезон. Синхронизация начала диапаузы с ухудшением условий среды и выхода из диапаузы с восстановлением благоприятных условий критически важна для экологического успеха диапаузирующих организмов. У *Daphnia*, населяющих сезонные водоемы, выход из диапаузы – то есть возобновление развития диапаузирующих эмбрионов и выход молоди из эфиппиумов – в значительной степени определяет сезонную динамику популяций, поскольку ранняя активация покоящихся яиц *Daphnia* в пределах одного сезона (например, выход молоди сразу после схода льда) связана с риском гибели молоди до половозрелости из-за низкой температуры воды, промерзания или незаполнения водоема. Слишком поздний выход из диапаузы в течение сезона также снижает приспособленность генотипа, так как другие виды и/или клоны успевают размножиться раньше и, таким образом, получают конкурентное преимущество за счет лучшего использования пищевых ресурсов.

Различные сроки выхода из диапаузы можно рассматривать в различных временных масштабах – с одной стороны, с точки зрения раннего или позднего вылупления при наступлении первого после перехода к диапаузе благоприятного сезона, с другой стороны – с точки зрения вероятности вылупления в первый, второй и т.д. благоприятный сезон. Если в некоторые сезоны активная (планктонная) часть популяции *Daphnia* полностью погибает, не успев отложить покоящихся яиц, или продукция покоящихся яиц очень невелика, преимущества

будут получать генотипы, в которых лишь часть покоящихся яиц активируется в начале каждого сезона, а оставшаяся часть сохраняется в покоящемся состоянии в течение двух или нескольких сезонов.

В настоящее время существуют прямые и косвенные данные, свидетельствующие о том, что по крайней мере в части популяций кладоцер, копепод и коловраток вылупление покоящихся яиц несинхронно, растянуто во времени (DeStasio 1989, 1990; Mnatsakanova, Polischuk 1996; Yampolsky, Kalabushkin 1992). В природных популяциях, такое растянутое во времени вылупление может объясняться неодновременным наступлением благоприятных условий (постепенный прогрев водоема, перемешивание донных осадков роющими организмами) или различиями покоящихся яиц в реакции на такие стимулы. В свою очередь, различия в реакции покоящихся яиц на внешние условия могут быть связаны как генетическими различиями между ними, так и с другими факторами, например возрастом яиц и фенотипической пластичностью.

С точки зрения эволюционной генетики, растянутый во времени выход из диапаузы может интерпретироваться как стратегия страхования рисков (bet-hedging) или же генетический полиморфизм. В первом случае, более подробно обсуждаемом в Главе 3, предполагается, что в непредсказуемых условиях среды отбираются генотипы с неоднозначной реакцией на внешние условия. Например, часть потомства одной и той же самки может выходить из диапаузы раньше, а часть позже. Во втором случае, также предсказанном в теоретических моделях (Ellner 1998), предполагается, что варьирующие от года к году внешние условия способствуют сосуществованию в одной популяции генотипов, по-разному реагирующих на стимулы выхода из диапаузы – т.е. генотипы, выходящие из диапаузы раньше, сосуществуют с генотипами, выходящими из диапаузы позже. Для выбора из этих двух гипотез необходимо оценить наличие генетической компоненты в изменчивости сроков выхода из диапаузы.

Задача представленной в настоящей главе работы состояла в оценке изменчивости в отношении сроков выхода из диапаузы покоящихся (эфиппидальных) эмбрионов *D. magna*, взятых из эфиппидального банка природной

популяции, а также выявления генетической компоненты такой изменчивости в экспериментах по искусственному отбору.

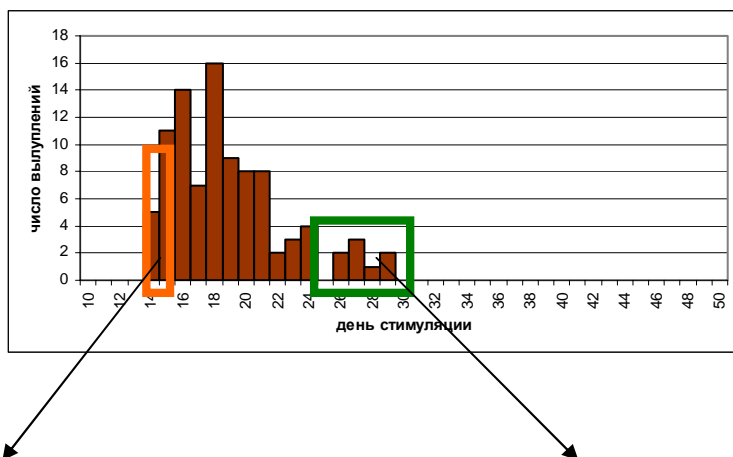
Кроме того, для того чтобы разделить эффект, который оказывают на успех вылупления две отдельные стимуляции и общая продолжительность стимуляции, нами были проведены опыты в которых анализировали зависимость успеха вылупления молоди из одновозрастной выборки эфиппиумов (раздел Материалы и методы).

5.2. Реакция на отбор сроков реактивации

Схемы и результаты отбора на ранее/позднее вылупление и вылупление при повторной представлены на Рисунках 5.1 и 5.2 и в Таблицах 5.1–5.2. Из этих данных видно, что как в случае отбора на ранее/позднее вылупление, так и в случае отбора на повторное вылупление наблюдался ответ. 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).

Таблица 5.1. Различия между линиями отбора на ранее и позднее вылупление при I и стимуляции.

поколение	температура отбор	температура результат	группа отбора	Среднее время вылупления	N	<i>P</i> (критерий Стьюдента)	<i>P</i> (критерий Манна-Уитни))
F₁	5°C	5°C	раннее	18,6	332	<0,0001	<0,0001
			позднее	21,2	240		
F₂	5°C	10°C	раннее	8,9	116	<0,0001	<0,0001
			позднее	10,3	83		

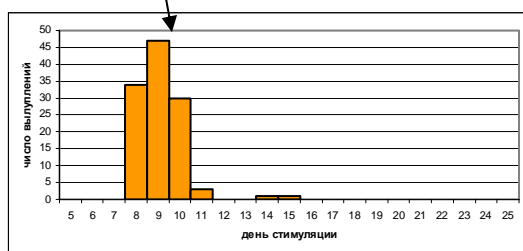
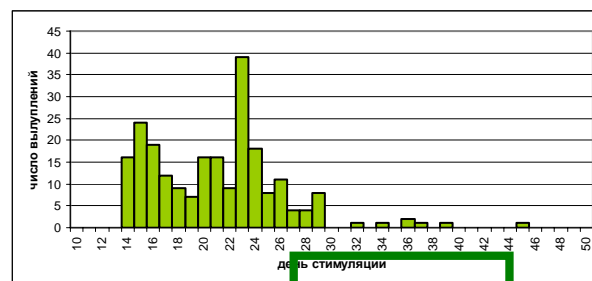


отбор на раннее вылупление

отбор на позднее вылупление



F1



F2
10°C



Рис 5.1. Схемы и результаты отбора на раннее/позднее вылупление при первой стимуляции. Вылупление эфиппиумов из природной популяции и эфиппиумов F_1 проводили при 5°C и фотопериоде 13 часов. Вылупление эфиппиумов F_2 проводили при 10°C и таком же фотопериоде.

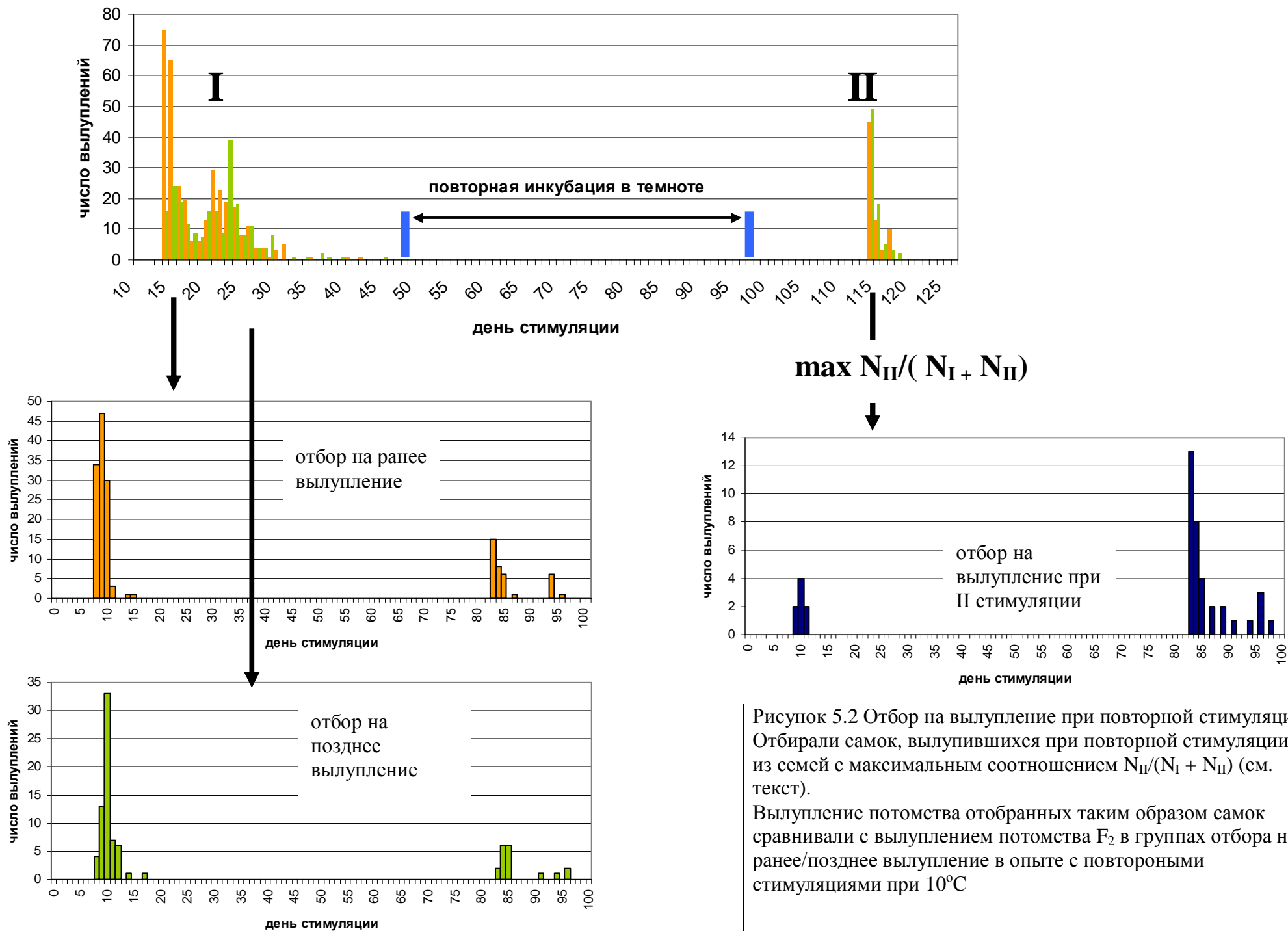


Рисунок 5.2 Отбор на вылупление при повторной стимуляции. Отбирали самок, вылупившихся при повторной стимуляции из семей с максимальным соотношением $N_{II}/(N_I + N_{II})$ (см. текст). Вылупление потомства отобранных таким образом самок сравнивали с вылуплением потомства F_2 в группах отбора на раннее/позднее вылупление в опыте с повторными стимуляциями при 10°C

При отборе на вылупление при повторной стимуляции, уже в первом поколении отмечена очень яркая реакция: в то время как среди потомства в группах, отобранных на ранее/позднее вылупление доля молоди, вылупившейся при первой стимуляции, составляла 76 и 80% соответственно (различие между группами отбора не значимо), в группе, отобранной на вылупление при повторной стимуляции, эта доля составила лишь 19% (различие с двумя другими группами отбора: $p < 0,001$).

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 2-ой стимуляции	43	19% (0.08-0.33)*	81% (0.67-0.92)*

* - 95% доверительные интервалы

5.3. Зависимость успеха вылупления от продолжительности инкубации

Опыты по вылуплению эфиппиумов, отложенных в одно и то же время самками, взятыми из природной популяции (раздел 2.3.5) и инкубированных при 0°C одну неделю или 1, 2 или 3 месяца, показал, что успех вылупления (количество вылупившихся) возрастает с увеличением времени инкубации, так

что при 1-недельной инкубации вылупление полностью отсутствует, а при 3-месячной инкубации максимально (Рисунок 5.3).

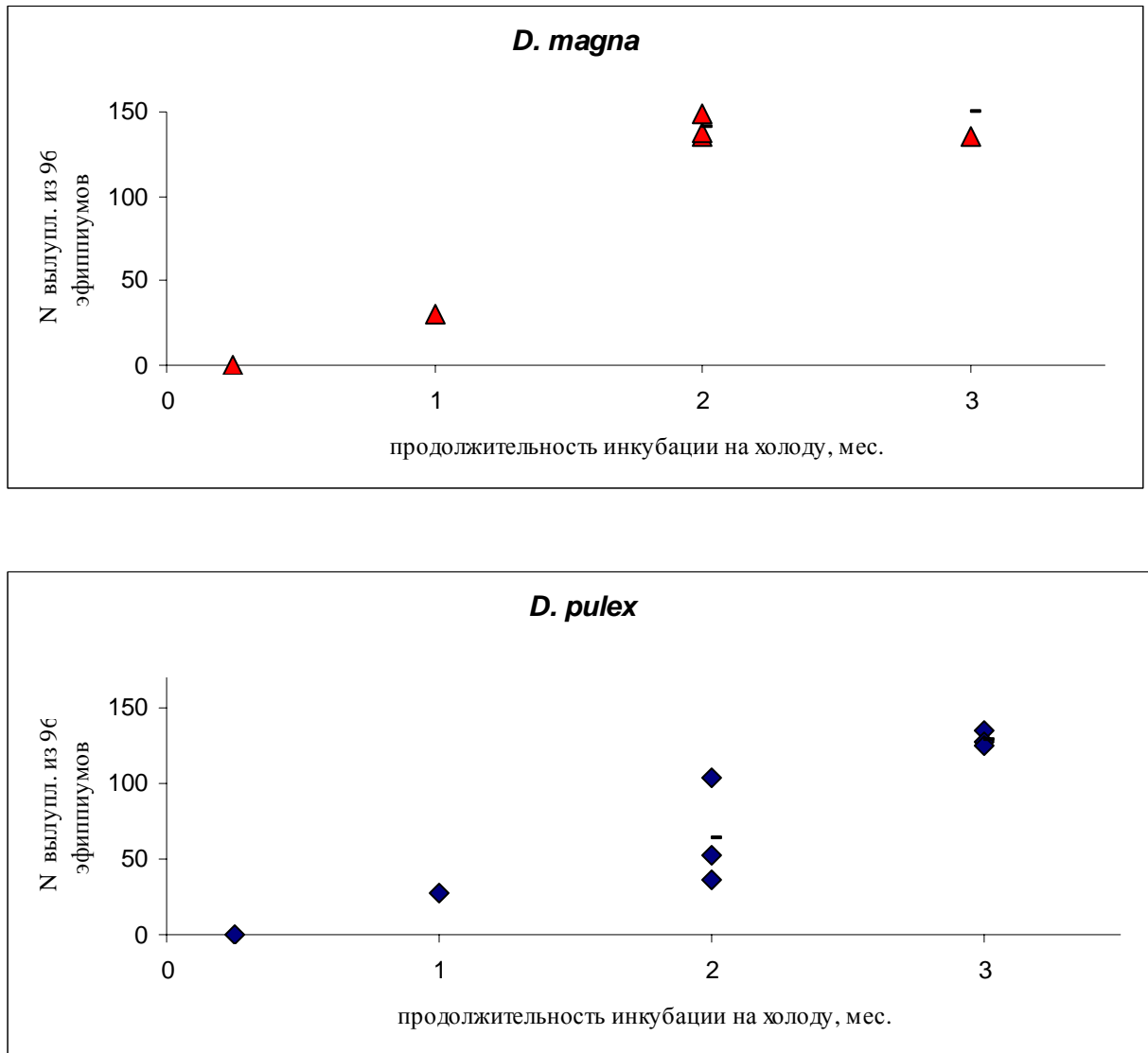


Рисунок 5.3. Количество молоди, вылупившейся из 96 эфиппимов, в зависимости от времени инкубации эфиппимов, взятых из одновозрастной выборки природных эфиппиумов.

5.4. Обсуждение результатов главы

Полученные результаты наглядно показывают наличие генетической компоненты в реакции покоящихся эмбрионов на факторы, способствующие прекращению диапаузы, возобновлению развития и выходу молоди из эфиппиума. Это относится как ко времени, необходимому для возобновления развития при одной стимуляции, так и к необходимости нескольких стимуляций

для возобновления развития. В нашем опыте, видимо, значительная часть эмбрионов начинала свое развитие практически сразу после переноса в условия, стимулирующие прекращение диапаузы, и заканчивала эмбриональное развитие через 7 или 14 суток при температуре 10°C и 5°C, соответственно. Это время достаточно точно соответствует времени развития партеногенетических яиц (от откладки яйца до выхода молоди) при тех же температурах (собственные наблюдения). При этом схема отбора (смена режима во втором туре, природные эфиппиумы в первом туре) не позволяет аккуратно оценить наследуемость, но наши результаты подтверждают наличие генетической компоненты изменчивости.

Методика эксперимента была подобрана таким образом, чтобы максимально соответствовать условиям в водоеме, откуда были взяты пробы. Наши результаты указывают на то, что и в природных условиях «растянутый» выход молоди из эфиппиумов может быть связан не только с внешними факторами, такими как погружение эфиппиумов в донные осадки, но и с внутренними, в том числе с генетическими факторами. В то же время, разумеется, существуют и существенные различия между условиями нашего опыта и условиями, в которых проходит диапауза в природе. Одним из важных различий является продолжительность инкубации эфиппиумов перед стимуляцией вылупления. Смена близкой к нулю температуры и низкой освещенности на условия высокой освещенности довольно точно передают условия весеннего вскрытия водоема: при таянии льда освещенность дна мелкого водоема и температура воды резко возрастают (см. Главу 4). В то же время в водоеме, откуда были взяты природные эфиппиумы *D. magna*, период «инкубации» - т.е. время от откладки эфиппиумов (конец сентября – ноябрь) до схода льда (конец марта – конец апреля) значительно превышает выбранный нами из практических соображений 50-дневный период. Продолжительность инкубации на холоду играет значительную роль в прекращении диапаузы. Так, согласно нашим наблюдениям, из эфиппиумов, инкубированных в течение 25 дней, выходит при стимуляции значительно меньше молоди, чем взятых из той же партии эфиппиумов,

инкубированных в течение 50 дней. Поэтому вылупление при «повторной» стимуляции можно интерпретировать не только как необходимость именно двукратной стимуляции (что в природных условиях соответствовало бы пребыванию в диапаузе в течение двух лет), но и как необходимость в более продолжительной инкубации в условиях низкой освещенности и температуры.

Данные по зависимости успеха вылупления от продолжительности инкубации на холоду поддерживают, скорее, второе объяснение. Действительно, максимальный успех вылупления достигался у *D. magna* лишь после двух месяцев инкубации, в то время как при отборе на ранее/позднее вылупление и вылупление при повторной стимуляции мы инкубировали эфиппиумы лишь в течение 1.5 месяцев. Природный водоем, из которого были взяты эфиппиумы, остается покрытым льдом не менее трех месяцев (с середины декабря до середины марта), а чаще 4-5 месяцев. Таким образом, мы не можем интерпретировать вылупления в наших опытах части молодежи лишь при повторной стимуляции как многолетнюю диапаузу.

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

6.1. Введение

Покоящиеся стадии, известные у многих групп организмов, в том числе насекомых, ракообразных и растений, способные к переживанию неблагоприятных периодов, представляют собой адаптацию к временным и сезонным биотопам. Покоящиеся стадии могут возобновлять развитие в самом начале следующего благоприятного сезона или оставаться в покоящемся состоянии в течение нескольких сезонов, и успешно возобновлять развитие после такой продолжительной диапаузы (Beal 1905; Darlington, Stenbauer 1961; Hairston et al. 1995). У многих растений и некоторых ракообразных ежегодно начинает развитие лишь небольшая часть семян или покоящихся яйца, и образующиеся в результате многолетние банки покоящихся стадий превосходят по численности активную часть популяции. Банки покоящихся стадий дают преимущество при высокой межгодовой изменчивости условий, поскольку служат «страховкой» о неблагоприятных лет (Ellner 1985a, b).

Организмы, обитающие в сезонных условиях, сталкиваются с необходимостью разделения ресурсов между производством покоящихся стадий (ПС) и текущим ростом численности или биомассы. При этом поздний переход к производству ПС может привести к гибели активных особей до того, как будет создан банк покоящихся стадий. С другой стороны, ранний переход снижает скорость популяционного роста и, соответственно, количество произведенных к концу сезона покоящихся стадий, в особенности, если численность (биомасса) популяции значительно возрастает в течение благоприятного сезона.

Как продемонстрировали Коэн (Cohen 1970) и Тейлор (Taylor 1980), в совершенно стабильных условиях (когда время окончания сезона остается

каждый год неизменным или может быть «предсказано» организмом на основании изменения средовых факторов), оптимальной формой перехода к диапаузе является резкий переход от производства активных к производству покоящихся стадий за одно поколение до наступления неблагоприятного сезона (катастрофы). В моделях, направленных на сходные эволюционные проблемы, например, в моделях распределения ресурсов между продукцией рабочих и размножающихся особей у социальных насекомых (Macewicz Osterm 1976) и между ростом и размножением (Kozlowski, Teriokhin 1997), предсказаны сходные оптимальные стратегии. В общем виде такое оптимальное решение основано на принципе Понтрягина (Bulmer 1994). При этом время перехода зависит от продолжительности благоприятного сезона.

Однако длина благоприятного сезона (время его окончания) отличается от года к году и, поскольку предсказательная сила большинства, вызывающих диапаузу, ограничена, время окончания сезона остается неизвестным организму. В таких условиях биотопа возможна эволюция постепенного перехода к диапаузе, представляющая собой стратегию страхования рисков (bet-hedging). В данном случае такая стратегия будет заключаться в постепенном переходе к производству покоящихся стадий (Seeger, Brockmann 1987; Fontes et al. 1995). Преимущества такой модели были продемонстрированы аналитически для случая равномерного распределения длины сезона (King, Roughgarden 1982). Хейрстон и Мюннс (Hairston, Munns 1984) показали преимущество постепенного перехода продукции покоящихся яиц у пресноводного веслоного рачка.

Следует подчеркнуть, что, говоря о непредсказуемой продолжительности благоприятного сезона, мы подразумеваем неспособность организма получать информацию о приближении окончания сезона («катастрофы») в каждый конкретный год. Организму известна только «дата» сезона (определяемая, например, по продолжительности светового дня). В том случае, если организм может определять приближение катастрофы заблаговременно, оптимальной стратегией всегда будет мгновенный переход к производству покоящихся яиц за определенное время до катастрофы. Эта стратегия, по сути, не будет отличаться

от оптимальной стратегии перехода к диапаузе при постоянной длине благоприятного сезона, несмотря на то, что в разные годы длина сезона будет различной.

Из перечисленных теоретических исследований остается неясным, при какой степени непредсказуемости среды требуется «страхование рисков» при производстве покоящихся яиц, и что является лучшей защитой от непредсказуемых изменений среды: постепенный переход к диапаузе или банк покоящихся стадий.

В этой работе мы представляем модель, максимизирующую долговременный успех различных стратегий диапаузы в сезонных местообитаниях, с различной степенью вариабельностью длины сезона. Модель призвана ответить на следующие вопросы:

1. Каким образом оптимальная стратегия производства диапаузирующих стадий зависит от вариабельности длины сезона и скорости популяционного роста при заданных характеристиках яйцевого банка (доле вылупляющихся ежегодно яиц и смертности яиц)?

2. Какова оптимальная доля вылупления и стратегия производства покоящихся яиц в случае, когда они оптимизируются одновременно при различных допущениях относительно популяционного роста и вариабельности условий среды?

Мы рассматриваем также несколько случаев с плотностной зависимостью, в которых стратегия с максимальной приспособленностью необязательно является эволюционно-стабильной и обсуждаем применение этой теории для понимания эволюции продукции диапаузирующих яиц у нескольких организмов, прежде всего у представителей пресноводного зоопланктона.

6.2. Построение модели

Допустим, что размер или биомасса популяции растут в течение благоприятного сезона за счет производства яиц с немедленным развитием или

соматического роста, а максимально возможная скорость производства диапаузирующих стадий пропорциональна численности или биомассе. В этом случае для максимизации общего количества произведенных покоящихся стадий доля ресурсов, вкладываемых в производство покоящихся стадий, должна расти от начала к концу сезона. Допустим, что форму перехода к производству диапаузирующих яиц можно описать следующей логистической функцией:

$$R(t) = \frac{R_m}{1 + \frac{R_m - R_0}{R_0} e^{-qt}}, \quad (1)$$

где

$$R_0 = \frac{R_m}{1 + e^{qt_s}}$$

Форму функции определяют три параметра: t_s - пороговое время перехода; q - скорость перехода, и R_m - максимальная доля имеющихся ресурсов, вкладываемая в производство диапаузирующих стадий.

Сочетания больших значений q и $R_m = 1$ соответствует стратегиям с быстрым и полным переходом от текущего роста популяции к производству покоящихся яиц, а низкие значения q или R_m соответствуют стратегиям постепенного перехода, характерного для стратегии распределения рисков.

Длина благоприятного сезона в модели принята случайной переменной, не зависящей от плотности популяции. Во многих случаях такое допущение может быть вполне реалистичным, хотя существуют и многочисленные исключения (см. Обсуждение). Мы рассматриваем два варианта модели: без внутривидовой конкуренции и с внутривидовой конкуренцией (т.е. с экспоненциальным и логистическим ростом численности). В варианте с конкуренцией количество ресурсов, доступных как для популяционного роста, так и производство диапаузирующих стадий снижается при увеличении размера популяции.

Общее количество покоящихся стадий, произведенных за сезон, при данной стратегии перехода, равно

$$Q(\tau) = \int_0^{\tau} (N(t)R(t))dt \quad (2a)$$

для модели без конкуренции и

$$Q(\tau) = \int_0^{\tau} N(t)R(t)(1 - N(t)/K)dt \quad (2b)$$

для модели с конкуренцией, где $\mathbf{N}(t)$ – функция, описывающая скорость популяционного роста в течение сезона, а \mathbf{K} – максимальная поддерживаемая численность популяции (carrying capacity).

Без ущерба для общности модели, средняя длина сезона была принята за единицу. Кроме того, мы ограничились максимальной длиной сезона двумя средними. Во время симуляции этот максимум достигается редко и только в вариантах с очень изменчивой длиной вариабельностью продолжительности сезона.

Долговременную приспособленность оценивали по Коэну (Cohen, 1966, 1968)

$$F = \int_0^2 P(\tau)((1 - G)(1 - D) + GQ(\tau))d\tau, \quad (3)$$

Где $\mathbf{P}(\tau)$ – доля длины сезонов с продолжительностью τ , \mathbf{G} – часть банка покоящихся яиц, вылупляющаяся в начале каждого сезона и \mathbf{D} – ежегодная смертность покоящихся яиц.

Рост численности популяции в вариантах модели с конкуренцией и без конкуренции описывается экспоненциальной и логистической функциями, соответственно.

$$\frac{dN}{dt} = (1 - R(t))rN(t) \quad (4a)$$

и

$$\frac{dN}{dt} = (1 - R(t))rN(t)\left(1 - \frac{N(t)}{K}\right) \quad (4b)$$

где r - максимальная мгновенная скорость популяционного роста.

Если не указано иное, для обозначения скорости популяционного роста мы используем параметр $\exp(r)$, показывающий, во сколько раз размер популяции увеличивается за средний (с длиной, равной 1) сезон при неограниченной численности скорости роста популяции.

В нашей модели, вероятность катастрофы зависит только от времени года. Распределение длины сезона является либо равномерным, либо нормальным со средним 1 и стандартным отклонением σ . Вероятность катастрофы в момент сезона t в этом случае равна:

$$P(\tau) = \frac{C(\tau)}{\int_0^2 C(t) dt} \quad (5)$$

В случае небольших σ ограничение максимальной длины сезона значением 2 не приводит к потере общности модели, поскольку вероятность катастрофы при длине сезона 2 или больше очень мала. При больших значениях σ это условие является ограничивающим, но увеличение максимальной длины сезона качественно не меняет результаты. Следует отметить, что реальное стандартное отклонение усеченного распределения длины сезона было меньше, чем σ , особенно при больших значениях σ .

Стратегия, соответствующая максимальной долговременной скорости роста была определена численно в соответствии с (3), с учетом (2), (4) и (5) для диапазонов значений параметров продукции диапаузирующих стадий q , R_m и t_s и доли вылупления G . Вначале мы приняли, что G является фиксированным параметром и определили оптимальные значения q , R_m и t_s для $G = 1$ (яйцевой банк отсутствует), $G = 0.5$ (небольшой яйцевой банк) и $G = 0.01$ (большой яйцевой банк). Затем мы оптимизировали параметры продукции диапаузирующих яиц и одновременно доли вылупления. В нескольких случаях были обнаружены

несколько локальных максимумов F , однако все они были близки друг к другу, градиент между ними был низок, и итоговые формы продукции покоящихся яиц были сходными, поэтому в таких случаях в результатах представлен лишь один (глобальный) максимум.

6.3. Результаты модельного эксперимента

Во-первых, мы представляем результаты модели, оптимизирующей продукцию диапаузирующих яиц при фиксированных значениях доли вылупления покоящихся стадий G . На Рисунке 6.1 показаны оптимальные формы перехода к продукции покоящихся яиц в случае экспоненциального роста популяции и нулевой смертности покоящихся яиц. Оптимальные формы перехода были определены для нескольких значений максимальной скорости роста популяции $\exp(r)$ и стандартного отклонения длины сезона σ . На каждом графике представлены три кривые, соответствующие различной доле вылупления покоящихся яиц: $G=1$ (банк отсутствует), $G = 0.5$ (небольшой яйцевой банк) и $G = 0.01$ (большой яйцевой банк).

При фиксированной длине сезона ($\sigma = 0$) наша модель предсказывает резкий переход от продукции субитанных яиц к продукции диапаузирующих яиц за период времени до окончания сезона (времени «катастрофы»), равный $1/r$. Это предсказание не зависит от того, ежегодной доли вылупления G . Чем более изменчива длина сезона, тем в большей степени оптимальный переход к продукции диапаузирующих яиц зависит от G .

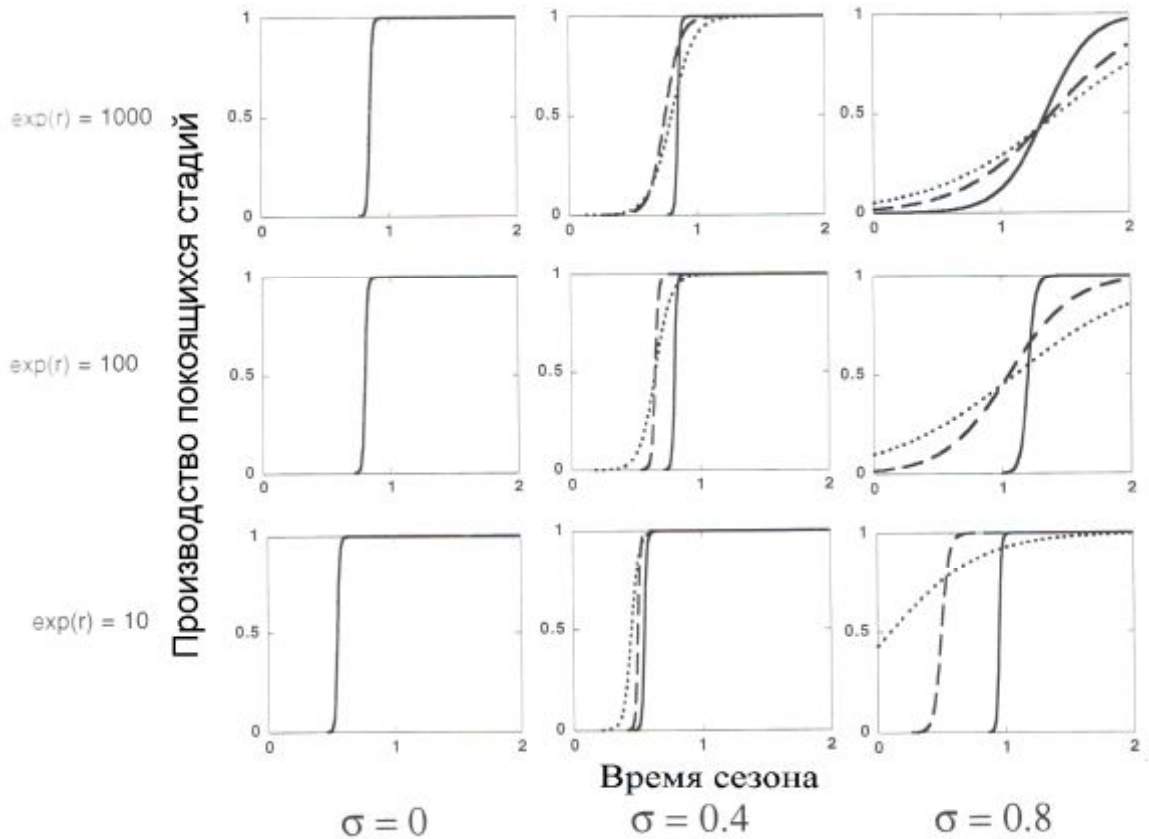


Рисунок 6.1. Оптимальные стратегии производства покоящихся стадий при экспоненциальном росте популяции и нулевой смертности покоящихся стадий. По оси ординат: доля ресурсов, вкладываемых в диапаузирующие стадии (уравнение 1). Каждый график соответствует паре значений стандартное отклонение длины сезона σ / потенциальный прирост популяции за средний сезон $\exp(r)$. Результаты для большого банка покоящихся стадий (доля вылупляющихся каждый год $G = 0,01$; сплошная линия), небольшого банка ($G = 0,5$; пунктир), и отсутствия банка ($G = 1$; точечный пунктир). Средняя длина сезона принята равной 1. При $\sigma = 0$ стратегии не зависят от наличия и размера банка

При низкой доле вылупления G модель предсказывает полный и резкий переход (сплошные линии на Рисунке 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.

Когда доля вылупляющихся покоящихся яиц и вариабельность длины сезона велики, модель предсказывает постепенный переход (прерывистая и точечная

линии на Рисунке 6.1). В этом случае продукция покоящихся яиц начинается рано и медленно повышается в к концу сезона. Чем выше дисперсия длины сезона, тем более плавный переход является оптимальным. При более высокой скорости роста популяции модель предсказывает меньшую долю покоящихся яиц в начале сезона.

Если скорость роста популяции очень низка ($\exp(r) < e$, т.е. $r < 1$), модель предсказывает производство только покоящихся стадий с самого начала сезона (т.е. моновольтинный жизненный цикл) как оптимальную стратегию для любых значений σ и G (данные не представлены).

Ежегодная смертность покоящихся стадий D оказывает лишь незначительное влияние на предсказания модели, слегка сдвигая оптимальный переход в сторону низких значений q и t_s , то есть в сторону менее «рискованных» стратегий. На Рисунке 6.2 представлены результаты для $\exp(r)=100$ и $\sigma = 0.8$. При более низких значениях $\exp(r)$ и σ параметр D оказывает даже меньше влияние на предсказания модели (данные не представлены).

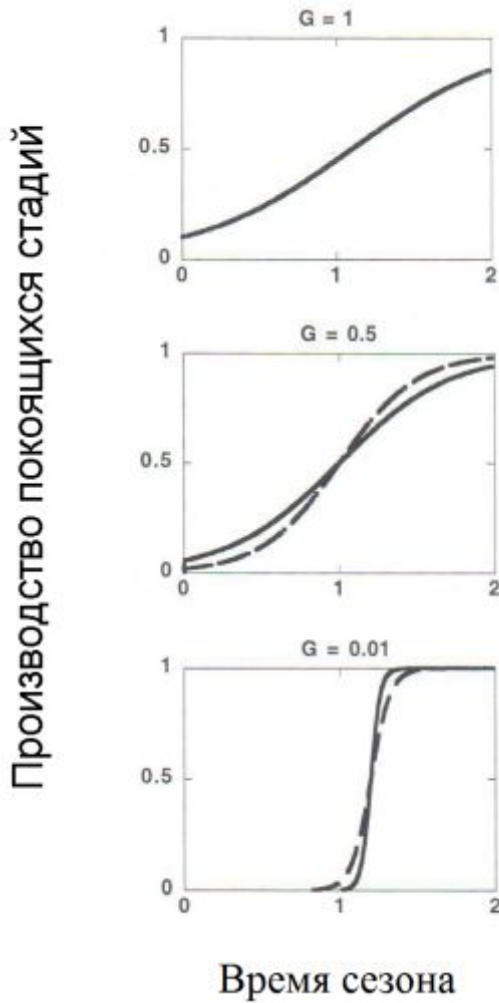


Рисунок 6.2. Влияние смертности диапаузирующих яиц D на оптимальную стратегию производства покоящихся яиц при различных значениях G . Сплошная линия: $D = 0$, пунктир: $D = 0.5$. При $G=1$ линии совпадают. Прирост популяции $\exp(r) = 100$; стандартное отклонение длины сезона $\sigma = 0.8$.

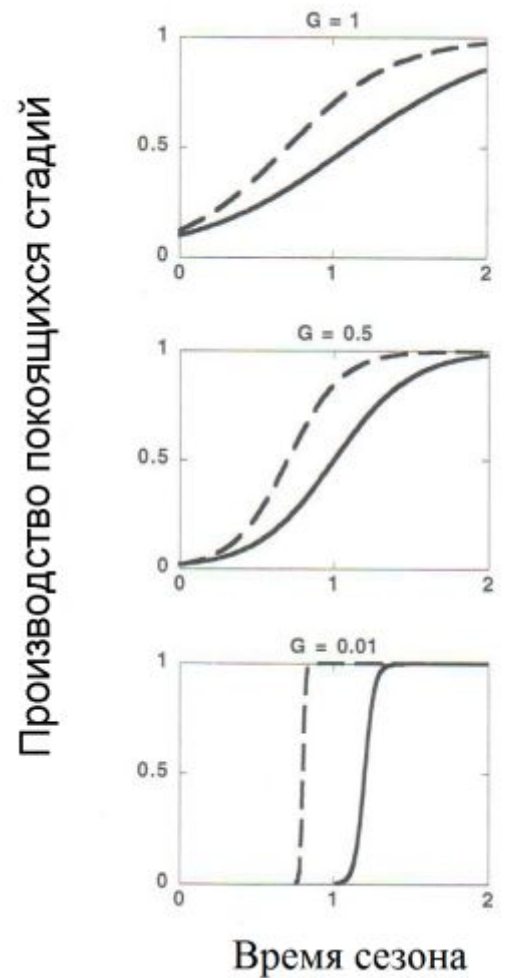


Рисунок 6.3. Влияние внутривидовой конкуренции на оптимальную стратегию производства покоящихся яиц. Оптимальная форма перехода при экспоненциальном (сплошная линия) и ограниченном (пунктир) росте численности. Скорость роста $\exp(r) = 100$; стандартное отклонение длины сезона $\sigma = 0.8$.

Модели с плотностно-зависимым популяционным ростом дают предсказания, сходные с моделью с экспоненциальным ростом, но кривая оптимального перехода в них смещена влево (значения t_s ниже). Чем ниже емкость среды, тем более ранний переход к диапаузе предсказывает модель (данные не представлены).

Рассмотрим теперь результаты модели, одновременно оптимизирующей стратегию производства покоящихся яиц и долю вылупления покоящихся стадий. При низкой скорости роста популяции, модель предсказывает низкую долю вылупления и резкий переход к диапаузе. По мере повышения скорости роста популяции, оптимальная доля вылупления быстро достигает 1, практически независимо от изменчивости длины сезона (Рисунок 6.4). Оптимальные стратегии производства диапаузирующих яиц, предсказанные моделью, в этом случае идентичны тем, что предсказывает модель с фиксированной долей вылупления при $G=1$ и соответствующих значениях $\exp(r)$ и σ .

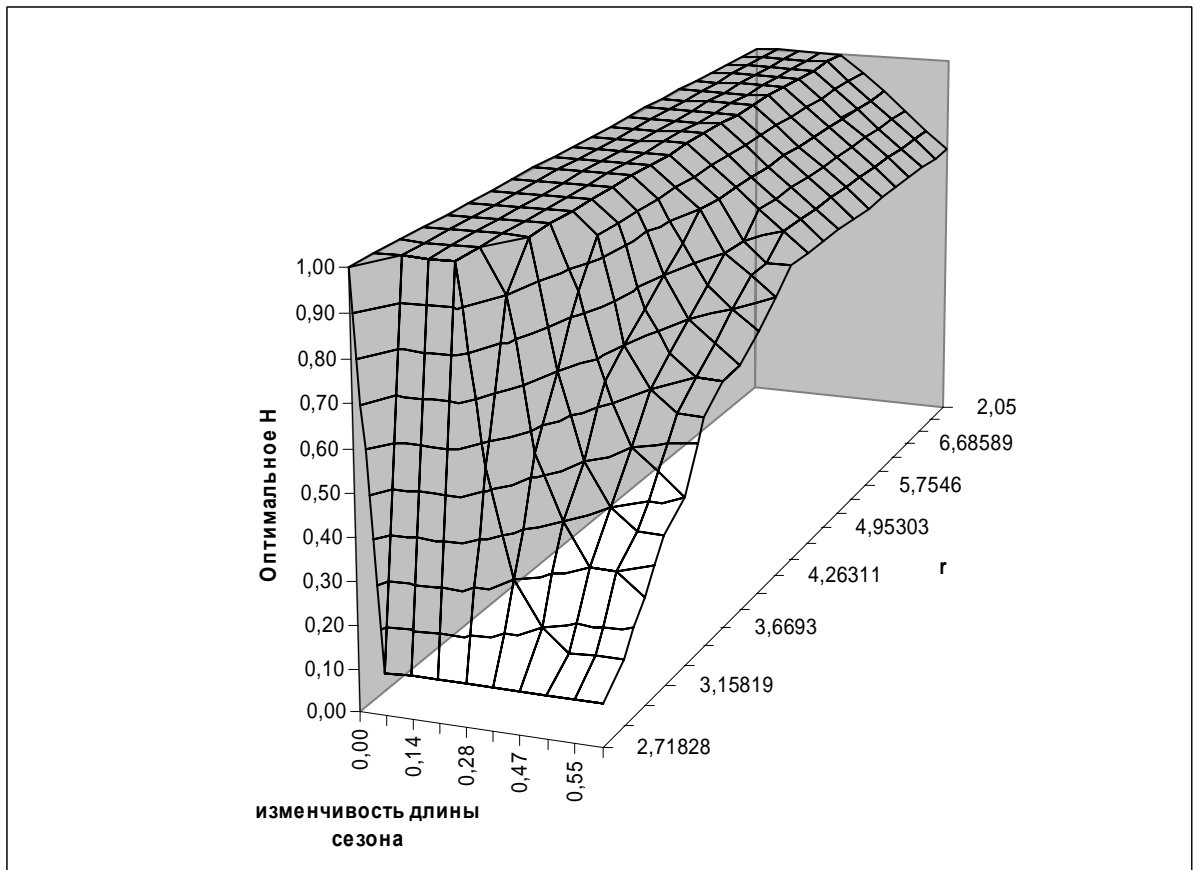


Рисунок 6.4. Оптимальная ежегодная доля вылуплений из яйцевого банка в случае, когда оптимизируется одновременно доля вылупления и стратегия продукции покоящихся стадий. r – максимальная скорость прироста численности (в отличие от прироста на остальных рисунках); σ - стандартное отклонение длины сезона.

Таким образом, в том случае, если продукция диапазирующих яиц и вылупление из банка покоящихся яиц могут эволюционировать одновременно, модель предсказывает два возможных сценария. Во-первых, при низкой скорости роста популяции ($\exp(r) < 10$) оптимальная стратегия состоит в том, чтобы формировать большой банк покоящихся яиц с низкой или средней долей ежегодного вылупления (G от 0 до 0.7) и резко переходить от субитанных к диапазирующим яйцам. Во-вторых, при высоких скоростях популяционного роста, оптимальная стратегия состоит в том, чтобы все или почти все диапазирующие яйца вылуплялись на следующий год после откладки (многолетний яйцевой банк отсутствует или очень невелик) и использовать стратегию страхования рисков (bet-hedging) при переходе к диапаузе в каждом сезоне.

На Рисунке 6.5 показана зависимость долговременной приспособленности различных стратегий от дисперсии длины сезона для оптимальных стратегий с несколькими вариантами ограничений: без яйцевого банка (оптимальный переход к диапаузе в отсутствие яйцевого банка); мгновенное переключение («наивная стратегия») с большим многолетним банком и одновременная оптимизация перехода к диапаузе и доли вылупления из яйцевого банка («лучшая» стратегия). Для сравнения, приведены две другие крайние стратегии: моновольтинная стратегия без яйцевого банка и «идеальная» стратегия, построенная на основании точной информации о продолжительности сезона в каждом конкретном году (и с переходом к диапаузе за время $1/r$ до конца сезона).

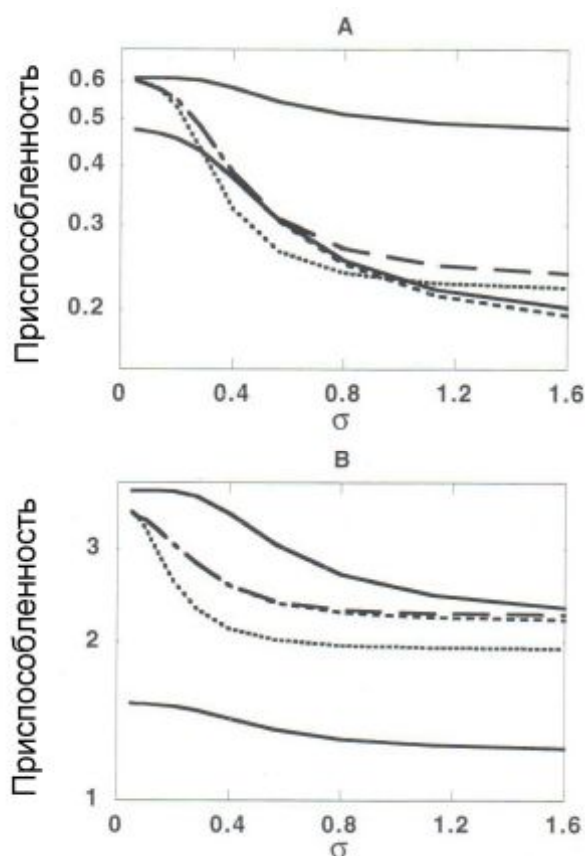


Рис 6.5. Абсолютная приспособленность пяти различных стратегий защиты от неблагоприятных сезонов в непредсказуемых сезонных биотопах. Верхняя сплошная линия: "идеальный предсказатель"; нижняя сплошная линия: моновольтинная стратегия; длинный пунктир: "лучшая стратегия"; короткий пунктир: "оптимальный переход к паузе в отсутствии яйцевого банка "; точечный пунктир: "наивная стратегия с банком". Определения стратегий см. в тексте выше. σ - ст. откл. длины сезона. А: рост популяции за средний сезон $\lambda = \exp(r)$; В: $\lambda = 100$.

В случае небольшой дисперсии длины сезона, все стратегии, за исключением моновольтинной, обладают почти равной приспособленностью, как при медленном, так и при быстром росте популяции. По мере возрастания дисперсии длины сезона все стратегии менее успешны, чем «идеальный предсказатель». Стратегия «наивная стратегия» производства с большим яйцевым банком» менее успешна, чем стратегия в одновременной оптимизацией производства и вылупления во всех условиях, и менее успешна, чем «страховка рисков» без яйцевого банка во всех условиях, за исключением сочетания высокой дисперсии длины сезона и низкой скорости роста популяции. Стратегии «идеальный

предсказатель» и «оптимальное вылупление и продукция» одинаковы успешно при всех условиях, за исключением самих высоких значений σ . Из Рисунка 6.4 видно, что приспособленности двух этих стратегий равны при большей части значений σ и r , так как оптимальная доля вылупления G равна 1 или близка к 1.

6.4. Обсуждение результатов главы

Оптимальные стратегии продукции яиц при фиксированной доле вылупления. Модель предсказывает оптимальное вложение ресурсов организма в производство покоящихся стадий, определяемое, с одной стороны, риском катастрофы до того, как будет отложено достаточное количество покоящихся яиц и, с другой стороны, тем преимуществом, которое дает увеличение численности популяции к моменту начала откладки покоящихся яиц в случае длинного сезона. Наши предсказания хорошо согласуются с ранее опубликованными исследованиями, посвященными продукции покоящихся стадий. При низкой дисперсии длины сезона, наша модель предсказывает резкий переход к продукции покоящихся яиц (Cohen, 1970; Taylor, 1980), а при высокой дисперсии и небольшом яйцевом банке или в отсутствие яйцевого банка модель предсказывает постепенный переход со «страхованием рисков» (King, Roughgarden, 1982; Hairston, Olds, 1987; McNamara, 1994).

В том случае, когда доля вылупления высока (маленький яйцевой банк) наша модель предсказывает постепенный переход к диапаузе с вкладом части ресурсов в диапаузирующие яйца, который позволяет популяции использовать длительные сезоны без риска слишком сильного снижения численности в случае короткого сезона. Чем больше вариабельность окружающей среды, тем более пологий оптимальный переход предсказывает модель.

В том случае, когда банк покоящихся яиц достаточно велик (низкие значения G), стратегия мгновенного перехода к диапаузе обладает преимуществом независимо от дисперсии длины сезона. Следует отметить, что даже сравнительно высокая доля вылупления (например $G = 0.5$ на Рисунке 6.1) дает достаточную

«страховку», так что отпадает необходимость в распределении рисков при производстве диапаузирующих яиц. В ранее опубликованных моделях, предсказывающих резкий переход (Bulmer, 1994; Hairston, Munns, 1994). Наша модель, напротив, предсказывает, что в тех случаях, когда скорость роста популяции и дисперсия длины сезона велики, а популяция защищена от риска вымирания большим банком покоящихся яиц, время перехода к диапаузе может быть более поздним, чем средняя длина сезона. В этом случае отбор благоприятствует адаптации к использованию редких продолжительных сезонов, несмотря на очень низкую продукцию покоящихся яиц в короткие сезоны. Именно адаптацией к некоторым необычно благоприятным сезонам может объясняться тот факт, что многие планктонные организмы, например *Bosmina* и некоторые коловратки, не производят покоящиеся стадии во время пика численности в начале сезона.

В случае плотностно-зависимого (логистического) увеличения численности популяции, когда относительная скорость роста численности снижается к концу сезона, модель предсказывает более ранний переход к производству покоящихся стадий. Снижение скорости роста популяции и емкость среды в этом случае также ведут к более раннему оптимальному переходу к диапаузе. В случае плотностно-зависимого роста, более поздний переход к диапаузе не приводит к существенному увеличению продукции покоящихся яиц, поскольку и численность популяции, и продукция покоящихся яиц в расчете на одну особь в конце сезона ниже, чем в случае неограниченного роста.

Моновольтинная стратегия. Модель предсказывает преимущество моновольтинной стратегии в том случае, если скорость увеличения численности популяции r меньше 1. Это не удивительно, ведь мы знаем, что при низких r оптимальной стратегией является резкий переход к продукции покоящихся яиц. Представим себе упрощенную ситуацию, когда переход происходит мгновенно. В этом случае мультивольтинные популяции при начальной численности (принятой за 1) растут экспоненциально, не производя покоящихся яиц и достигают численности $exp(r*t_s)$ в дальнейшем эта численность сохраняется до конца сезона

T , при этом все доступные ресурсы уходят на производство диапаузирующих яиц. Моновольтинная популяция с постоянной численностью 1 тратит все ресурсы на производство диапаузирующих яиц с начала сезона (0) до конца сезона (T). Мультивольтинная стратегия обладает преимуществом при условии соблюдения неравенства

$$(T-t_s) e^{rt} s > T$$

в случае $T = 1$, принятого в нашей модели, это неравенство сводится к $r > 1$.

Разумеется, в случае непредсказуемой среды T не всегда равно 1. Однако, поскольку при малых r эффект непредсказуемости невелик, это результат действителен в широком диапазоне изменчивости длины сезона. Следует отметить, что при низких значениях r зависимость приспособленности от t_s и R_m вблизи оптимальных значений очень невелика (данные не представлены), в силу чего различия в приспособленности между моновольтинными и лучшими мультивольтинными стратегиями также невелики.

Козволюция стратегий производства покоящихся яиц и вылупления из банка покоящихся яиц. В непредсказуемой сезонной среде популяция может застраховаться от коротких или неблагоприятных в другом отношении сезонов либо с помощью большого яйцевого банку (низкая доля вылупления) или либо с помощью постепенного перехода к производству покоящихся яиц. Как подчеркивают Браун и Венабль (Brown, Venable, 1986), эволюцию характеристик банка покоящихся яиц и признаков активной части жизненного цикла следует рассматривать совместно. В варианте модели, когда доля вылупления и стратегия перехода к диапаузе могут эволюционировать одновременно, механизм адаптации к непредсказуемой сезонной среде зависит в основном от скорости роста популяции в течение сезона. Когда скорость роста популяции низка, лучшей стратегией является сохранение большого банка яиц с низкой долей вылупления (Рисунок 6.4) и резкий ранний переход к производству диапаузирующих яиц (Рисунок 6.1), во многих случаях в самом начале сезона, т.е. моновольтинная

стратегия. Сочетание моновольтинного жизненного цикла и значительного банк покоящихся яиц предсказано в сравнительно узком диапазоне значений r и σ .

В том случае, если скорость роста популяции высока, оптимальная доля вылупления близка к 1 (т.е. яйцевой банк невелик или отсутствует) и адаптация к непредсказуемым изменениям длины сезона достигается благодаря оптимальной форме продукции диапаузирующих яиц. Эта закономерность мало зависит от уровня непредсказуемости среды: при любой скорости роста популяции предсказанная оптимальная доля вылупления близка либо к 0, либо к 1, при любых значениях σ . (Рисунок 6.4). Следует, однако, отметить, что мы рассматривали лишь нормальное и однородное распределение длины сезона и этот результат может не сохраняться при значительно большей дисперсии длины сезона, например, при бимодальном распределении длины сезона.

Как показано на Рисунке 6.5, стратегия «наивного перехода к диапаузе» с большим яйцевым банком (см., например в Cohen 1966, 1968) будет менее успешной, чем стратегия «плавного перехода» без яйцевого банка (например, King, Roughgarden 1982) за исключением ситуаций, когда максимальная вариабельность длины сезона сочетается с низкой скоростью роста популяции. При этом обе стратегии обладают меньшей приспособленностью, чем «лучшая» стратегия (при которой одновременно оптимизированы характеристики банка покоящихся яиц и стратегия перехода к диапаузе), по крайней мере, при высокой дисперсии длины сезона.

Возникает вопрос о том, насколько часто в природе мултивольтинные популяции защищены от непредсказуемости среды именно большим яйцевым банком, а не более эффективной стратегией распределения рисков при производстве диапаузирующих яиц.

Организм, способный заранее предсказать окончание благоприятного сезона, разумеется, обладает преимуществом перед любой стратегией, не обладающей такой возможностью (Рисунок 6.5). Однако эволюция способности предсказывать изменения среды может быть ограничена временными корреляциями между факторами средовыми сигналами, определяющими переход к диапаузе, и

собственно ухудшением условий. Заметим, что в тех случаях, когда велики и скорость роста популяции, так и дисперсия длины сезона, разница в приспособленности между «идеальным предсказателем» и оптимальной стратегией производства покоящихся яиц сравнительно невелика (Рисунок 6.5 В). Нарушение различных начальных условий нашей модели, конечно, может сделать результаты модели недействительными. Например, в нашей модели численность популяции не снижается после начала производства покоящихся яиц. Это условие, вероятно, нарушается в случае организмов с низкой продолжительностью жизни и в тех случаях, когда производство покоящихся яиц приводит к увеличению смертности (а также в тех случаях, когда к диапаузе переходят взрослые особи). В таких ситуациях сводятся на нет те преимущества, которые дают стратегиям «распределения рисков» в редкие продолжительные сезоны, и это может резко изменить предсказание, согласно которому распределение рисков в активной части жизненного цикла дает лучшую защиту, чем банк покоящихся стадий.

Ограничения эволюции яйцевых банков и продукции диапаузирующих стадий. Мы описали эволюцию ковариации между двумя механизмами, защищающими популяцию от непредсказуемости длины сезона. В природе, однако, такая эволюция ограничена различными факторами. Доля вылуплений может быть ограничена либо очень низкими (например, в том случае, когда лишь некоторые из диапаузирующих яиц оказываются в благоприятных условиях или получают нужные для вылупления сигналы) или очень высокими (когда диапаузирующие яйца не обладают механизмами, допускающими частичную активацию) значениями. Например, значительная часть диапаузирующих яиц *Daphnia* вылупляется вскоре после первого воздействия дневного света после однократного замораживания (Schwartz, Hebert, 1987a). При этом лишь очень немногие яйца *Daphnia* вылупляются, если покрыты 1-см слоем жидкого ила (Галимов, Ямпольский, неопубликованные данные). Таким образом, 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, где они могут оставаться в состоянии диапаузы долгие годы (Hairston et al., 1995), пока случайное перемешивание донных осадков не вынесет их на поверхность.

Различные параметры кривых перехода к диапаузе в нашей модели также могут быть ограничены в природных популяциях. Так, скорость перехода к производству покоящихся яиц q , может быть ограничена временем, требующимся отдельным особям для реакции на средовые сигналы. С другой стороны, у некоторых организмов могут существовать ограничения, не дающие возможности одновременно вкладывать ресурсы в рост активной части популяции и производство покоящихся стадий. Например, планктонные ракообразные обычно не могут одновременно производить диапаузирующие и субитанные яйца. Можно предположить, что такие организмы находятся под действием отбора, с тем, чтобы избежать этих ограничений и использовать стратегию страхования рисков. Например, в тех случаях, когда предпочтительно страхование рисков, клоны партеногенетических ветвистоусых раков могут получать преимущество благодаря внутриклональной вариации по времени производства покоящихся яиц. Такая внутриклональная изменчивость может быть достигнута за счет «неполной» реакции особей на сигналы среды, вызывающие откладку эфиппиальных яиц. Еще одной возможностью избежать этого ограничения является производство покоящихся стадий, так как производство самцов также является вкладом в производство покоящихся яиц. Этот механизм страхования рисков возможен только в том случае, если в популяции многочисленны другие клоны, дающие эфиппиумы (Yampolsky, 1992); в противном случае производство самцов будет бесполезным.

Случаи плотностной зависимости. В нашей модели приспособленность каждой стратегии вылупления и перехода к диапаузе не зависит от плотности популяции. В природных популяциях, однако, успех генотипа с определенной стратегией диапаузы может зависеть от частот которой этой и других стратегий в популяции. Это возможно в двух случаях: во-первых, когда сезонный рост

численности популяции зависит от ее плотности, так что преимущества, которые дает увеличение численности активной части, зависит от того, какая часть популяции производит субитанные яйца. Во-вторых, в тех случаях, когда время катастрофы (окончания благоприятного для размножения сезона) зависит от плотности популяции, так что риски, связанные с субитанным размножением, зависят от того, какая часть популяции использует этот тип размножения. Такие плотностно-зависимые «катастрофы», маловероятные в случае растений, вполне обычны в популяциях зоопланктеров.

При плотностной зависимости популяция, в которой доминирует стратегия с «распределением» рисков, может подвергаться инвазии «рискованной» стратегии (например, стратегии с более поздним переходом к производству покоящихся яиц). При этом «рискованная» стратегия может вначале получить преимущество, так как при низкой численности такая стратегия может лишь незначительно изменить время общепопуляционной «катастрофы». С увеличением частоты такой стратегии ее преимущество снижается. Как показали Эллнер с соавторами (Ellner et al., 1998), при определенных обстоятельствах рискованные стратегии с большим банком покоящихся яиц могут сосуществовать с менее рискованными стратегиями производства покоящихся яиц с меньшим банком покоящихся яиц. В любом случае, оптимальные стратегии, представленные в нашей работе, не обязательно являются эволюционно-стабильными.

Влияние гамогенеза. В нашей модели, форма перехода к диапаузе и выхода из нее является свойством отдельных видов или клонов. Применение нашей модели к внутривидовой изменчивости существенно ограничено. Диапаузирующие стадии обычно образуются при гамогенетическом размножении, даже в тех случаях, когда рост активной части популяции происходит за счет бесполого размножения. Такой тип размножения может двояко влиять на предсказания нашей модели. Во-первых, в каждом половом поколении отдельные стратегии могут смешиваться благодаря рекомбинации, при этом формируется унимодальное распределение параметров производства покоящихся яиц. Это снижает значение плотностной зависимости.

С другой стороны, генотипы со значительно различающимся временем перехода к диапаузе могут оказаться репродуктивно изолированы друг от друга, несмотря на совместное обитание. Такая изоляция может приводить к симпатрическому видообразованию (Tauber, Tauber, 1987). Будет ли эта изоляция достаточно сильна для того, чтобы преодолеть эффект рекомбинации, зависит от генетического контроля параметров диапаузы (числа локусов), и характера роста популяции (например, снижение относительного обилия «осторожной» стратегии к тому моменту, когда «рискованная» стратегия начинает производить покоящиеся яйца). Было бы интересно исследовать генетическую модель эволюции стратегии инициации и терминации диапаузы для предсказания условий, в которых сохраняется полиморфизм или происходит видообразование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как уже обсуждалось в водной части настоящей работы, исчерпывающее понимание связи изменчивости и наследуемости экологически важных признаков с действующими в природных условиях факторами отбора (если оно возможно вообще) представляет собой слишком амбициозную задачу для рамок диссертационной работы. В настоящей работе я попытался лишь исследовать некоторые аспекты диапаузы и гамогенеза *Daphnia magna* в контексте естественного жизненного цикла.

Предложенная в главе 6 модель, безусловно, слишком проста и обща, для того, чтобы ее было возможно верифицировать данными из природных популяций. Тем не менее, она позволяет проиллюстрировать некоторые принятые представления о концепции распределения рисков, которые, по сути, сводятся к трем положениям: во-первых оценка приспособительного значения признака должна учитывать долговременную приспособленность организма и его потомков; во-вторых, эволюция в направлении повышения долговременной приспособленности может приводить к снижению приспособленности в более коротком временном масштабе, т.е. поведению, которое представляется неадаптивным; в-третьих, при оценке влияния какого-либо компонента жизненного цикла на приспособленность его следует рассматривать в контексте жизненного цикла в целом, поскольку коэволюция компонентов (например перехода к диапаузе и выхода из нее).

Данные, полученные при исследовании диапаузы и гамогенеза в природных популяциях *D. magna* и *D. pulex* в течение нескольких сезонов, указывают на возможные примеры неадаптивного в коротком масштабе времени (в конкретный сезон) поведения этих видов: регулярное появление у обоих видов в начале сезона самцов, которые обычно не участвуют в размножении из-за отсутствия в это время эфипиальных самок, и всегда неполный переход *D. pulex* к диапаузе в конце сезона, несмотря на последующую гибель активной части популяции в зимний период (по крайней мере, в некоторые годы). Обе эти особенности жизненного

цикла, возможно, обеспечивают преимущества в некоторые годы: появление самцов в случае резкого ухудшения условий в начале сезона, а неполный переход к диапаузе – при быстром наращивании численности активной части популяции ранней весной в годы с мягкими зимами.

Результаты отбора на ранее или позднее вылупление и на вылупление после повторной стимуляции (Глава 4) указывают на наличие генетической изменчивости в сроках реактивации покоящихся яиц (возобновления развития) как в кратковременном (после однократной стимуляции) так и в долговременном (необходимое число циклов инкубации/стимуляции) масштабе. Однако данные по зависимости успеха вылупления от продолжительности инкубации говорят о том, что при интерпретации данных по вылуплению с точки зрения эволюции в природных популяциях следует проявлять большую осторожность.

В главе, посвященной половой специализации клонов *Daphnia magna*, мы обнаружили, что в популяциях этого вида широко распространены клоны, неспособные к производству самцов, которые в целом для производства полового потомства нуждаются в присутствии в популяции самцов, из клонов, способных к производству последних. Особенности наследования признака «бессамцовости» делают клоны, неспособные к производству самцов, отличной модельным объектом для исследования эволюции определения пола и систем размножения. Использование этой модели и применение современных молекулярно-генетических методов позволило нам впервые прямо продемонстрировать у Cladocera аутомиктическое размножение. Следует отметить, что для ракообразных в целом аутомиксис был также впервые показан в 2015 году, причем наряду с *Daphnia magna* наличие аутомиксиса было впервые доказано у *Artemia*.

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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, В.Р. Диапауза ракообразных: эколого-физиологические аспекты / В.Р. Алексеев – М.: Наука, 1990. – 144 с.
2. Верещагин, Г.Ю. Об изменениях цикличности Cladocera в зависимости от географической широты местности / Г.Ю. Верещагин // Протоколы заседания Общества естествоиспытателей при Варшавском университете. – 1912. – Т. 13. – № 1-2. – С. 241-275.
3. Грант, В. Эволюционный процесс: Критический обзор эволюционной теории: Пер. с англ. / В. Грант – М.: Мир, 1991. – 488 с.
4. Гиляров, А.М. Динамика численности пресноводных планктонных ракообразных / А.М. Гиляров – М.: Наука, 1987. – 189 с.
5. Данилевский, А.С. Фотопериодизм и сезонное развитие насекомых / А.С. Данилевский – Л: Изд-во ЛГУ, 1961. – 242 с.
6. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности: Пер. с англ. / М. Кимура – М.: Мир, 1985. – 394 с.
7. Корчагин, А.Н. Фауна московских окрестностей. 1: Ракообразные. / А.Н. Корчагин // Труды лаборатории при Зоологическом музее Московского университета. – 1887 – Т. 3. – вып. 2. – 124 с.
8. Котов, А.А. Морфология и филогения Anomopoda (Crustacea: Cladocera) / А.А. Котов – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – 638 с.
9. Крылов, П.И. Зоопланктон кислотного озера: стратегия выживания в условиях дефицита пищи / П.И. Крылов, Е.А. Полякова, **Я.Р. Галимов** // Реакция озерных экосистем на изменения биотических и абиотических условий. Труды Зоологического Института РАН. – 1997 – т. 272. – С. 87—106
10. Макрушин, А.В. Наблюдения над овогенезом некоторых Cladocera / А.В. Макрушин // Труды Института Биологии Внутренних Вод. – 1966. – Вып.12 (15). – С. 175-182

11. Макрушин, А.В. Изменения в организме самок некоторых Cladocera при переходе к гамогенезу / А.В. Макрушин // Зоологический журнал. – 1970. – Т. 49. № 10. – 1573-1575.
12. Макрушин, А.В. Ангидробиоз первичноводных беспозвоночных: сохранение жизнеспособности в высушенном состоянии / А.В. Макрушин – Л.: Наука, 1985. – 104 с.
13. Майр, Э. Популяции, виды и эволюция / Э. Майр. – М.: Мир, 1974 – 460 с.
14. Мордухай-Болтовской, Ф.Д. Хищные ветвистоусые Podonidae, Polyphemidae, Cercopagidae, Leptodoridae фауны мира / Ф.Д. Мордухай-Болтовской, И.К. Ривьер // Определители по фауне СССР, издаваемые Зоологическим Институтом АН СССР. – 1987. – Л.: Наука. – 182 с.
15. Макрушин, А.В. Наблюдения над овогенезом некоторых Cladocera / А.В. Макрушин // Труды Института Биологии Внутренних Вод. – 1966. – Вып. 12 (15). – С. 175-182.
16. Макрушин, А.В. 1970. Изменения в организме самок некоторых Cladocera при переходе к гамогенезу / А.В. Макрушин // Зоологический журнал. – 1970. – Т.49. – № 10. – С. 1573-1575.
17. Ребриков, Д.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование / Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, Е.С. Шубина, В.В. Ильинский – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 235 с.
18. Смирнов, Н.Н. Биология ветвистоусых ракообразных / Н.Н. Смирнов // Зоология беспозвоночных (Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ АН СССР). – 1975. – Т. 3. – С. 1-116.
19. Abrusan, G. Biochemical limitation of resting egg production in *Daphnia* / G. Abrusan, P. Fink, W. Lampert // Limnology and Oceanography. – 2007. – V. 52. – № 4. – P. 1724–1728.
20. Adamowicz, S.J. The scale of divergence: a phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus / S.J. Adamowicz, A. Petrusek, J.K. Colbourne, P.D.N. Hebert,

- J.D.S. Witt // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2007. – V. 50. – P. 423-436.
21. Agar, W.E. Parthenogenetic and sexual reproduction in *Simocephalus vetulus* and other Cladocera / W.E. Agar // *Journal of Genetics*. – 1914. – V. 3. – P. 179.
 22. Agar, W.E. Experiments on inheritance in parthenogenesis / W.E. Agar // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*. – 1914b. – V. 205. – P. 421-489.
 23. Agar, W.E. The genetics of *Daphnia* hybrid during parthenogenesis / W.E. Agar // *Journal of Genetics*. – 1920. – V. 10 – P. 303-330.
 24. Agresti, A. 1998 Approximate is better than “exact” in interval estimation of binomial proportions / A. Agresti, B.A. Coull // *The American Statistician*. – 1998. – V. 52. – P. 119-126.
 25. Alekseev, V.R. Maternal control of resting-egg production in *Daphnia* / V.R. Alekseev, W. Lampert // *Nature*. – 2001. – V. 414 – P. 899-901.
 26. Allen, M.R. Genetic and environmental factors influence survival and hatching of diapausing eggs / M.R. Allen // *Limnology and Oceanography*. – 2010. – V. 55. – № 2. – P. 549-559.
 27. Arnott, S.E. The influence of drought and re-acidification on zooplankton emergence from resting stages / S.E. Arnott, N.D. Yan // *Ecological Applications*. – 2002. – V. 12. – №1. – P. 138-153.
 28. Banta, A.M. Inheritance in Parthenogenesis and in Sexual Reproduction in Cladocera / A.M. Banta, T.R. Wood // *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. – 1928a. – V. 9. – № 3-4. – P. 264–269.
 29. Banta, A.M. A thermal race of Cladocera originating by mutation / A.M. Banta, T.R. Wood // *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. – 1928b. – V.19. – №3-4. – P. 261-263.
 30. Banta, A.M. Genetic evidence that the cladoceran male is diploid / A.M. Banta, T.R. Wood // *Science*. – 1928c.– V. 67. – № 1723. – P. 18-19.

31. Banta, A.M. Crowding the mothers as a means of controlling male production / A.M. Banta, L.A. Brown // *Physiological Zoology*. – 1929. – V. 2. – № 1. – P. 80-92.
32. Banta, A.M. Population density as related to sex and to evolution in Cladocera / A.M. Banta // *American Naturalist*. – 1937. – V. 71. – № 732. – P. 34-49.
33. Barr, C.M. Hybridization и regional sex ratios in *Nemophila menziesii* / C.M. Barr // *Journal of Evolutionary Biology*. – 2004. – V. 17. – P. 786-794.
34. Benzie, J.A.H. The genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*) (Anomopoda: Daphniidae). Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world 21 / J.A.H. Benzie/ Ghent: Kenobi Productions, Leiden: Backhuys Publishers, 2005. – 376 p.
35. Berg, K. Cyclic reproduction, sex determination and depression in the Cladocera / K. Berg // *Biological Review*. – 1934. – V. 9. – № 2. – P. 139 -173.
36. Berner, D.B. Photoperiod and water temperature as inducers of gamogenesis in a dicyclic population of *Scapholeberis armanata* Herrick (Crustacea: Cladocera: Daphniidae) / D.B. Berner, L. Nguyen, S. Nguy, S. Burton // *Hydrobiologia*. – 1991. – V. 225 – P. 269-280.
37. Boersma, M. Environmental stress and local adaptation in *Daphnia magna* /M. Boersma, L. De Meester, P. Spaak // *Limnology and Oceanography*. – 1999. – V.44. – P.393–402.
38. Brendonck, L. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment / L. Brendonck, L. De Meester // *Hydrobiologia*. – 2003. – V. 491. – P. 65–84.
39. Brewer, M.C. Mating behaviours of *Daphnia pulicaria*, a cyclic parthenogen: comparisons with copepods / M.C. Brewer // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*. – 1998. – Vol. 353. – № 1369. – P. 805–815.
40. Bulmer, M. *Theoretical Evolutionary Biology* / M. Bulmer – Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1994. – 352 pp.
41. Burland, T.G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software / T.G. Burland // *Methods in Molecular Biology*. – 2000. – V. 132 – P. 71-91.

42. Cáceres, C.E. Temporal variation, dormancy, and coexistence: A field test of the storage effect / C.E. Cáceres // Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A. – 1997. – Vol. 94. – P. 9171-9175.
43. Cáceres, C.E. Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs / C.E. Cáceres // Ecology. – 1998. – V. 79. – № 5. – P. 1699-1710.
44. Cáceres, C.E. How well do laboratory experiments explain field patterns of zooplankton emergence? / C.E. Cáceres, M.S. Schwalbach // Freshwater Biology. – 2001. – V. 46. – P. 1179-1189.
45. Cáceres, C.E. Incidence of diapause varies among populations of *Daphnia pulicaria* / C.E. Cáceres, A.J. Tessier // Oecologia. – 2004b. – V. 141. – P. 425-431.
46. Cáceres, C.E. How long to rest: the ecology of optimal dormancy and environmental constraint / C.E. Cáceres, A.J. Tessier // Ecology. – 2003. – V. 84. – P. 1189-1198.
47. Cáceres, C.E. To sink or to swim: variable diapause strategies among *Daphnia* species / C.E. Cáceres, A.J. Tessier // Limnology and Oceanography. – 2004a. – V. 49. – № 4 (2). – P. 1333-1340.
48. Carmona, M.J. Selection of low investment in sex in a cyclically parthenogenetic rotifer / M.J. Carmona, N. Dimas-Flores, E.M. Garcla-Roger, M. Serra // Journal of Evolutionary Biology. – 2009. – V. 22. – P. 1975-1983.
49. Carvalho, G. The effect of food availability, female culture-density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera) / G. Carvalho, R.N. Hughes // Freshwater Biology. – 1983. – V. 13. – P. 37-46
50. Carvalho, G.I. Distribution and hatching of resting eggs in large-lake *Daphnia* / G. Carvalho, H.G. Wolf // Freshwater Biology. – 1989. – V. 22. – № 4. – P. 86-91.
51. Charlesworth, B. A model of evolution of dioecy and gynodioecy / B. Charlesworth, D. Charlesworth // American Naturalist. – 1978. – V. 112. – P. 975-997.

52. Charlesworth, B. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation / B. Charlesworth // *Current Biology*. – 1996. – V. 6. – P. 149-162.
53. Charlesworth, D. Evolution of plant breeding system / D. Charlesworth // *Current Biology*. – 2006. – V. 16. – P. R726-R735.
54. Chen, C.Y. Consequences of fall warming for zooplankton overwintering success / C.Y. Chen, C.L. Felt // *Limnology and Oceanography*. – 1996. – V. 41. – № 5. – P.1077-1086.
55. Clement, M. TCS: a computer program to estimate gene genealogies / M. Clement, D. Posada, K. Crandall // *Molecular Ecology*. – 2000. – V. 9. – № 10. – P.1657-1660.
56. Cohen, D. Optimizing reproduction in a randomly varying environment / D. Cohen // *Journal of Theoretical Biology*. – 1966. – V. 98. – P. 519-529.
57. Cohen, D. A general model of reproduction in a randomly varying environment / D. Cohen // *Journal of Ecology*. – 1968. – V. 56. – P. 219-228.
58. Cohen, D. Theoretical model for the optimal timing of diapause / D. Cohen // *American Naturalist*. – 1970. – V. 104 – P. 389.
59. Colbourne, J.K. The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach / J.K. Colbourne, P.D.N. Hebert // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*. – 1996. – V. 351. – P. 349-360.
60. Colbourne, J.K. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex* // J.K. Colbourne, M.E. Pfrender, D. Gilbert et al. // *Science*. – 2011. – V. 331. – № 6017. – P. 555-561.
61. Cousyn, C. Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes / L. Cousyn, L. De Meester, J.K. Colbourne, L. Brendonck, D. Verschuren, F. Volckaert // *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* – 2001. – V. 98. – № 11. – P. 6256-6260.
62. Crease, T.J. A test for the production of sexual pheromones by *Daphnia magna* / T.J. Crease, P.D.N. Hebert // *Freshwater Biology*. – 1983. – V.13. – P. 491-496.

63. Cristescu, M.E. A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics / M.E. Cristescu, J.K. Colbourne, J. Radivojac, M. Lynch // *Genomics*. – 2006. – V.88. – № 4. – P. 415-430.
64. Crosetti, D. Distribution and life cycles of cladocerans in temporary pools from central Italy / D. Crosetti, F. G. Margaritora // *Freshwater Biology*. – 1987. – V. 18.– P.165-175.
65. Delph, L.F. Merging theory и mechanism in studies of gynodioecy/ L. F. Delph, P. Touzet, M. F. Bailey// *TREES*. – 2007. – V. 22. – № 1. – P. 17-24.
66. De Meester, L. Hatching of *Daphnia* sexual eggs. 1. Intraspecific Differences in the hatching responses of *Daphnia magna* eggs / L. De Meester, H. Dejager // *Freshwater Biology*. – 1993. – V. 30. – № 2. – P. 219-226.
67. De Meester. L. Hatching of *Daphnia* sexual eggs. 2. The effect of age and a 2nd stimulus / L. De Meester, H. Dejager // *Freshwater Biology*, – 1993. – V. 30. – № 2. – P. 227-233.
68. De Meester. L. An uncoupling of male and sexual egg production leads to reduced inbreeding in the cyclical parthenogen *Daphnia* / L. De Meester, J. Vanoverbeke // *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*.– 1999. – V. 266. – № 2. – P. 2471-2477.
69. Deng, H.W. Photoperiodic response of sexual reproduction in the *Daphnia Pulex* Group is reversed in two distinct habitats / H.W. Deng // *Limnology and Oceanography*. – 1997. – V. 42. – № 3. – P. 609-611.
70. DeGelas, K. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe / K. DeGelas, L. DeMeester // *Molecular Ecology*. – 2005. – V. 14. – P. 753-764.
71. DeStasio. B.T.J. The seed bank of freshwater crustacean: copepodology for plant ecologist / B.T.J. DeStasio // *Ecology*. – 1989. – V. 700. – P. 1377-1389.
72. DeStasio, B.T.J. The role of dormancy and emergence patterns in the dynamics of freshwater zooplankton community/ B.T.J. DeStasio // *Limnology and Oceanography*. – 1990. – V. 35. – P.1079-1090.

73. Dumont, H.J. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 19/ H.J.Dumont, S. Negrea // Backhuys, 2002, 397 pp.
74. Ebert, D. Family planning in *Daphnia*: When is clutch size determined? / D. Ebert, L.Y. Yampolsky // Russian Journal of Aquatic Ecology. – 1992. – V. 1. – P.143-147.
75. Ebert, D. A genome for the environment / D. Ebert // Science. – 2011. – V. 331. – P. 539-540.
76. Edmondson, W.T. The seasonal life history of *Daphnia* in an arctic lake / W.T. Edmondson // Ecology. – 1955. – V. 26. – № 3. – P.439-455.
77. Ferrari, D. The induction of sexual reproduction in *Daphnia magna*: genetic differences between arctic and temperate populations / D. Ferrari, P.D.N. Hebert // Canadian Journal of Zoology. – 1982. – V. 60. – № 9. – P. 2143-2148.
78. Fitzsimmons, J.M. No evidence of *Wolbachia* among Great Lakes area populations of *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) / J.M. Fitzsimmons, D.J. Innes // Journal of Plankton Research. – 2005. – V. 27. – P. 121-124.
79. Folmer, O. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek // Molecular Marine Biology and Biotechnology.– 1994. – V. 3. – P. 121-124.
80. Fox, J.W. Coexistence mechanisms and the paradox of the plankton: quantifying selection from noisy data / J.W. Fox, W.A. Nelson, E. McCauley // Ecology. – 2010.– V. 91. – № 6. – P.1774-1786.
81. Frey, D.G. Contrasting strategies of gamogenesis in northern and southern populations of Cladocera / D.G. Frey // Ecology. – 1982.– V. 63. – № 1. – P. 223-241.
82. Fryer, G. Functional morphology and the adaptive radiation of the Daphniidae (Branchiopoda: Anomopoda)/ G. Fryer // Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B. – 1991. – V. 331. – P. 1-99.

83. Gliwicz, Z.M. Life history synchronization in a long-lifespan single-cohort *Daphnia* population in a fishless alpine lake / Z.M. Gliwicz, A. Slusarczyk, M. Slusarczyk // *Oecologia*. – 2001.– V. 128. – P. 368–378.
84. Haag, C.R. A new hypothesis to explain geographic parthenogenesis / C.R. Haag, D. Ebert // *Annales Zoologici Fennici*. – 2004. – V. 41. – № 4. – P. 539-544.
85. Haag, C.R. Strong inbreeding depression in a *Daphnia* metapopulation / C.R. Haag, J.M. Hottinger, M. Riek, D. Ebert // *Evolution*.– 2002. – V. 56. – P. 518-526.
86. Hairston, N.G. Timing of copepod diapause as an evolutionary stable strategy / N.G. Hairston, W.R. Munns // *American Naturalist*. – 1984. – V. 123. – P. 733-751.
87. Hairston. N.G. Population differences in the timing of diapause: a test of hypotheses / N.G. Hairston, E.J. Olds // *Oecologia*.– 1987. – V. 71. – P. 339-344.
88. Hairston, N.G. Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank / N. G. Hairston, R. A. van Brunt, C. M. Kearns, D. R. Engstrom // *Ecology*. – 1995. – V. 77. – P. 2382-2392.
89. Hairston, N.G. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments / N.G. Hairston // *Limnology and Oceanography*. – 1996. – V. 41. – № 5. – P. 1087-1092.
90. Hairston, N.G. The effect of diapause emergence on the seasonal dynamics of a zooplankton assemblage / N.G. Hairston, Jr., A.M. Hansen, W.R. Schaffner // *Freshwater Biology*. – 2000. – V. 45. – P. 133-145.
91. Hebert. P.D.N. Inheritance during parthenogenesis in *Daphnia magna* / P.D.N. Hebert, R.D. Ward // *Genetics*. – 1972. – V. 71. – № 4. – P. 639-642.
92. Hebert, P.D.N. Obligate asexuality in *Daphnia* / P.D.N. Hebert // *American Naturalist*. – 1981 – V. 117. – № 5. – P. 784-789.
93. Hebert. P.D.N. Genetics of *Daphnia* / P. D. N. Hebert // *Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia*. – 1987 – V. 45. – P. 439-460.

94. Hebert, P.D.N. Life at low temperatures: A novel breeding-system adjustment in a polar cladocera / P.D.N. Hebert, C.L. Rowe, S.J. Adamowicz // *Limnology and Oceanography* – 2007– V. 52. – №6 – P. 2507-2518.
95. Herzig, A. Resting eggs – a significant stage in the life cycle of the crustaceans *Leptodora kindti* and *Bythotrephes longimanus* / A. Herzig // *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*. – 1985 – V. 22. – P. 3088-3098.
96. Hiruta, C. Abortive meiosis in the oogenesis of parthenogenetic *Daphnia pulex* / C. Hiruta, C. Nishida, S. Tochinai // *Chromosome Research*. – 2010. – V. 18. – P. 833–840.
97. Hiruta, C. How does the alteration of meiosis evolve to parthenogenesis? - case study in a water flea, *Daphnia pulex* / C. Hiruta, S. Tochinai // *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity* (Ed. A. Swan) Croatia, InTech.- 2012 – P. 109-122
98. Hobaek, A. Sex Determination in *Daphnia magna* / A. Hobaek, P. Larsson // *Ecology*. – 1990. –V. 71. – P. 2255-2268.
99. Iampolsky, L.I. Evolutionary genetics of aging in *Daphnia* / Iampolsky, L.I., Ia.R. Galimov // *Журн. Общ. Биологии* – 2004. – V. 66. – № 5. – P. 416- 424
100. Innes, D.J. Sex allocation variation in *Daphnia pulex* / D.J. Innes, R.L. Dunbrack // *Journal of Evolutionary Biology*. – 1993. – V. 6. – P.559-575.
101. Innes, D.J. Origin and genetic basis of obligate parthenogenesis in *Daphnia pulex* / D.J. Innes, P.D.N. Hebert // *Evolution*. – 1988. – V. 42. – № 5. – P. 1024-1035.
102. Innes, D.J. Genetics of *Daphnia obtusa*: genetic load и linkage analysis in a cyclical parthenogen / D.J. Innes // *Journal of Heredity*.– 1988. – V.80. –P. 6-10.
103. Innes, D.J. Sexual reproduction of *Daphnia pulex* in a temporary habitat / D.J. Innes // *Oecologia*. – 1997. – V. 111 – P. 53–60.
104. Innes, D.J. Avoiding the cost of males in obligately asexual *Daphnia pulex* (Leydig) / D.J. Innes, C.J. Fox, G.L. Winsor // *Proceedings of the Royal Society of London, B*. – 2000. – V. 267. –P. 991-997.

105. Jacobs, J. Microevolution in predominantly clonal populations of pelagic *Daphnia* (Crustacea: Phyllopoda): Selection, exchange, and sex / J. Jacobs // Journal of Evolutionary Biology. – 1993. – V. 6 – № 2. – P. 559-575.
106. Jankowski, T. Allochronic differentiation among *Daphnia* species, hybrids and backcrosses: the importance of sexual reproduction for population dynamics and genetic architecture / T. Jankowski, D. Straile // Journal of Evolutionary Biology. – 2004. – V. 17. – № 2. – P. 312-321.
107. King, D. Graded allocation between vegetative and reproductive growth for annual plants in growing seasons of random length / D. King, J. Roughgarden // Theoretical Population Biology. – 1982. – V. 22. – P. 1-16.
108. Klüttgen, B. 1994. ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton / B. Klüttgen, U. Dülmer, M. Engels, H.T Ratte // Water Research. – 1994. – V. 28 – P. 743-746.
109. Korpelainen, H. Sex ratio of the cyclic parthenogen *Daphnia magna* in a variable environment / H. Korpelainen // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 1989. – V. 27. – № 4. – P. 310-316.
110. Kotov, A.A. Study of the late embryogenesis of *Daphnia* (Anomopoda, 'Cladocera', Branchiopoda) and a comparison of development in Anomopoda and Ctenopoda / A.A. Kotov, O.S. Boikova // Hydrobiologia. – 2001. – V. 442. – № 1-3. – P. 127-143.
111. Kotov, A.A. Mesozoic fossils (>145 Mya) suggest the antiquity of the subgenera of *Daphnia* and their coevolution with chaoborid predators / A.A Kotov, D.J. Taylor // BMC Evolutionary Biology. – 2011. – V. 11– №. 129.
112. Lampert, W. *Daphnia*: development of a model organism in ecology and evolution / W. Lampert // Excellence in Ecology. – 2011. – V. 21. – P. 1-250.
113. Lampert, W. Coexisting overwintering strategies in *Daphnia pulex*: A test of genetic differences and growth responses / W. Lampert, K.P. Lampert, P. Larsson // Limnology and Oceanography. – 2010 – V. 55 – P. 1893-1900.

114. Larsson, P. Swim or rest during the winter - what is best for an alpine daphnid? / P. Larsson, I. Wathne // *Archive fuer Hydrobiologie*. – 2006. – V. 167. – P. 265-280.
115. Lass, S. Hatching with the enemy: *Daphnia* diapausing eggs hatch in the presence of fish kairomones / S. Lass, M. Vos, J. Wolinska, P. Spaak // *Chemoecology*. – 2005. – V. 15. – № 1. – P. 7-12.
116. LeBlanc. G.A. Males on demand: the environmental–neuro-endocrine control of male sex determination in daphnids / G.A. LeBlanc, E.K. Medlock // *FEBS Journal*. – 2006. – V. 282. – № 21. – P. 4080-4093.
117. Lloyd D.G. The maintenance of gynodioecy и androioecy in angiosperms / D.G. Lloydd // *Genetica*. – 1975. – V. 45. –P. 325-339.
118. Lopatina, T.S. Assessment of the volatility and thermal stability of chemicals that stimulate females of *Moina macrocopa* (Cladocera) to produce diapausing eggs / T.S. Lopatina, E.S. Zadereev // *Russian Journal of Ecology*. – 2015. – V. 46 – № 1. –P. 103-108.
119. Lubbock. J. An account of the two methods of reproduction in daphnia, and of the structure of the ephippium / J. Lubbock // *Proceed of the Royal Society of London*. – 1857. – V. 8 – P. 352-354.
120. Lynch. M. Localization of the genetic determinants of meiosis suppression in *Daphnia pulex* / M. Lynch, A. Seyfert, B. Eads, E. Williams // *Genetics*. – 2008. – V. 180. – P. 312-327.
121. MacNamara. J.M. Timing of entry into diapause: Optimal allocation to “growth” and “reproduction” in stochastic environment / J.M. MacNamara // *Journal of Theoretical Biology*. – 1994. – V. 1868. – P. 201-209.
122. Mercot. H. 1995. Sex-ratio distortion in *Drosophila simulans*: co-occurrence of a meiotic drive и a suppressor of drive / H. Mercot, A. Atlan, M. Jacques, C. Montchamp-Moreau // *Journal of Evolutionary Biology*. – 1995. – V. 8. – P. 283-300.
123. Mergeay, J. Two hundred years of a diverse *Daphnia* community in Lake Naivasha (Kenya): effects of natural and human-induced environmental change / J.

- Mergeay, D. Verschuren, L. Van Kerckhoven, L. De Meester // *Freshwater Biology* – 2004. – V. 49. – P. 998-1013.
124. Mergeay, J. *Daphnia* species diversity in Kenya, and a key to the identification of their ephippia / J. Mergeay, D. Verschuren, L. De Meester // *Hydrobiologia*. – 2005. – V. 542. – P. 261-274.
125. McTaggart, S.J. Rates of recombination in the ribosomal DNA of apomictically propagated *Daphnia obtusa* lines / S.J. McTaggart, J.L. Dudycha, A. Omilian, T.J. Crease // *Genetics*. – 2007. – V. 175. – P. 311-320.
126. Miyakawa, H. Mutation in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans / H. Miyakawa, K. Toyota, I. Hirakawa, Y. Ogino, S. Miyagawa, S. Oda, S. Miura, J.K. Colbourne, T. Iguchi // *Nature Communications*. – 2013. – V. 4. – P. 1856.
127. Mnatsakanova, E.A. Role of parthenogenetic natality and emergence from diapausing eggs in the dynamics of some rotifer populations / E.A. Mnatsakanova, L.V. Polischuk // *Hydrobiologia*. – 1996. – V. 320 – P. 169-178.
128. Mitchell, S.L. No evidence for kin-preferential swarming in *Daphnia* / S.L. Mitchell, L. De Meester, G. Carvalho, L. J. Weider // *Journal of Animal Ecology*. – 1995. – V. 64. – P. 777-779.
129. Montero-Pau, J. Application of an inexpensive и high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplankton diapausing eggs / J. Montero-Pau, A. Gomez, J. Munoz // *Limnology and Oceanography: Methods*. – 2008. – V. 6. – № 6. – P. 218-222.
130. Moreira dos Santos, M.M. The controlled production and hatching of ephippia of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) for toxicity testing / M.M. Moreira dos Santos – Ph. Thesis, Gent: Universiteit Gent. – 340 pp.
131. Moritz, C. A note on the hatching and viability of *Ceriodaphnia* ephippia collected from lake sediment / C. Moritz // *Hydrobiologia*. – 1987. – V. 145. – P. 309–314.
132. Oda, S. Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs / S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita, T. Iguchi // *Chemosphere*. – 2006. – V. 63. – № 9. – P. 1477–1484.

133. Ojima, Y. On the Spermatogenesis of *Daphnia pulex* (de Geer) / Y. Ojima // Journal of the Faculty of Science of Hokkaido University, Series VI. Zoology. – 1954a. – V. 12. – №1 -2. – P. 225-229.
134. Ojima, Y. Some cytological observations on parthenogenesis in *Daphnia pulex* (de Geer) / Y. Ojima // Journal of the Faculty of Science of Hokkaido University, Series VI. Zoology. – 1954a. – V. 12. – №1-2. – P. 230–241.
135. Ojima, Y. A cytological study on the development and maturation of the parthenogenetic and sexual eggs of *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera) / Y. Ojima // Kwansai Gakuin University Annual Studies. – 1958. – V. 6. – P. 123-176.
136. Olmstead, A.W. Temporal and quantitative changes in sexual reproductive cycling of the cladoceran *Daphnia magna* by a juvenile hormone analog / A.W. Olmstead, G.A. Leblanc // Journal of Experimental Zoology. – 2001. – V. 290. – № 2. – P. 148-155.
137. Olmstead, A.W. Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna* / A.W. Olmstead, G.A. Leblanc // Journal of Experimental Zoology. – 2002. – V. 293. – № 7. – P. 736-769.
138. Omilian, A.R. Ameiotic recombination in asexual lineages of *Daphnia* / A.R. Omilian, M.E. Cristescu, J.L. Dudycha, M. Lynch // Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. – 2006. – V. 103 – № 49. – P. 18638-18643.
139. Pajunen, V.I. Long-term dynamics in rockpool *Daphnia* metapopulation / V.I. Pajunen, I. Pajunen // Ecography. – 2003. – V. 26 – № 6. – P. 705-830.
140. Pancella. J.R. 1963. Light induced hatching of *Daphnia* resting eggs / J.R. Pancella, R.G. Stross // Chesapeake Science. – 1963. – V. 4. – P. 135-140.
141. Pauwels. K. Biochemical adaptation for dormancy in subitaneous and dormant eggs of *Daphnia magna* / K. Pauwels, R. Stocks, A. Verbiest, L. De Meester // Hydrobiologia. – 2007. – V. 594. – P. 91- 96.
142. Pérez-Martínez C. Reproduction strategies of *Daphnia pulicaria* population in a high mountain lake of Southern Spain / C. Pérez-Martínez, C.J. Barea-Arco, J.M. Conde-Porcuna, R. Morales // Hydrobiologia. – 2007. – V. 594. – P. 75-82.

143. Pijanowska, J. Summer diapause in *Daphnia* as a reaction to the presence of fish / J. Pijanowska, G. Stolpe // Journal of Plankton Research. – 1996. – V. 18. – № 18. – PP. 1407-1412.
144. Polischuk, L.V. Comparison of two approaches used to calculate zooplankton mortality / L.V., Polischuk, A.M. Ghilarov // Limnology and Oceanography. – 1981 – V. 26 – P.1162-1168.
145. Rider, C.V. / Rider C. V., Gorr T. A. Olmstead A. W., Wasilak B. W. and LeBlanc G. A. // The Journal of Experimental Biology. – 2005. – V. 208. – P. 15-23.
146. Rispe, C. Extreme life-cycle and sex ratio variation among sexually produced clones of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) / C. Rispe, J. Bonhomme, J.C. Simon // Oikos. – 1999. – V. 86. – P. 254-264.
147. Ross, M.D. Evolution of dioecy from gynodioecy / M.D. Ross // Evolution. – 1970. – V. 24. – P. 827-828.
148. Routtu, J. The first-generation *Daphnia magna* linkage map / J. Routtu, B. Jansen, I. Colson, L. DeMeester, D. Ebert // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – P.508.
149. Sasaki A. The evolutionarily stable phenotype distribution in a random environment/ A. Sasaki, S. Ellner // Evolution. – 1995. – V. 49. – № 22. – P. 337-350.
150. Sassaman, C. Sex determination and evolution of unisexuality in the Conchostraca / C. Sassaman, // Hydrobiology – 1995. – V. 298. – P. 45-65
151. Sassaman. C. Sex determination and evolution of unisexuality in the Conchostraca / C. Sassaman, // Hydrobiology – 1995. – V. 298. – P. 45-65
152. Sassaman. C. Reproductive isolation and genetic differentiation in North American species of *Triops* (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca) / C. Sassaman, M.A. Simovich, M. Fugate // Hydrobiology – 1997. – V. 359. – P. 125-147
153. Shan, R.K., Interbreeding between two stocks of a chydorid cladoceran / R.K. Shan, D.G. Frey // BioScience. – 1968. – V. 8. – №. 3. –P. 203-205.
154. Scharer, L. Tests of sex allocation theory in simultaneously hermaphroditic animals / L. Scharer // Evolution. – 2009. – V. 63. – P. 1377-1405.

155. Schwartz, S.S., Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia* / S.S. Schwartz, P.D.N. Hebert // *Freshwater Biology*. – 1987a. – V. 17. – P. 373-379.
156. Schwartz, S.S. Breeding system of *Daphniopsis ephemeralis*: adaptations to a transient environment / S.S. Schwartz, P.D.N. Hebert // *Hydrobiologia*. – 1987. – V. 145. – P. 195-200.
157. Shei, P. Population Dynamics of *Daphnia rosea* in a Small Eutrophic Pond / P. Shei, T. Iwakuma, K. Fujii // *Ecological Research*. – 1988. – V.3 – P. 291-304.
158. Ślusarczyk, M. Predation-induced diapause in *Daphnia* / M. Ślusarczyk // *Ecology*. – V. 76. – P.1008-1013.
159. Ślusarczyk, M.L. Food threshold for diapause in *Daphnia* under the threat of fish predation / M.L. Ślusarczyk // *Ecology*. – 2001. – V. 82. – №. 4. – C. 1089-1096.
160. Smirnov, N.N. *Physiology of the Cladocera*. / N.N. Smirnov – London etc.: Academic Press, 2014. – 352 p.
161. Sommer, U. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters / U. Sommer, Z.M. Gliwicz, W. Lampert, A. Duncan // *Archive fuer Hydrobiologie*. – 1986. – V. 106 – P. 433- 471.
162. Spaak, P. Sexual reproduction in *Daphnia*: interspecific differences in a hybrid species complex / P. Spaak // *Oecologia*. –1995. – V. 104. – P. 501 – 507.
163. Spaak, P. The influence of fish kairomones on the induction and vertical distribution of sexual individuals of the *Daphnia galeata* species complex / P. Spaak, M. Boersma // *Hydrobiologia*. – 2001. – V. 442. – №. 1-3. – P. 185-193.
164. Storch, O. *Cladocera, Wasserflöhe* / O. Storch // P. Schulze (ed.). *Biologie der Tiere Deutschlands*. – 1925. – V. 15. – № 14. – P. 23-102.
165. Stross, R.G. Photoperiod control of diapause in *Daphnia*. II. Induction of winter diapause in the arctic / R.G. Stross. // *Biological Bulletin*. – 1969. – V. 136. – P. 264-273.
166. Stross R.G. Diapause induction requires two stimuli / R.G. Stross, J.C. Hill // *Science*. –1965. – V.150. – № 3702. – P. 1462-1464.

167. Stross, R.G. Photoperiod control of winter diapause in the fresh-water crustacean, *Daphnia* / R.G. Stross, J.C. Hill // *Biological Bulletin*. – 1968. – V. 134. – № 1. – P. 176-198.
168. Stross, R.G. Light and temperature requirements for diapause development and release in *Daphnia* / R.G. Stross // *Ecology*. – 1966. – V. 47. – P. 368–374.
169. Stross, R.G. The reproductive cycle of *Daphnia* in an arctic pool / R.G. Stross, D.A. Kangas // *Ecology*. – 1969. – V. 50. – № 3. – P. 457-460.
170. 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.
171. Swar, D.B. Seasonality and Fecundity of *Daphnia lumholtzi* Sars in Lake Phewa, Nepal / D.B. Swar, C.H. Fernando // *Hydrobiologia*. – 1979. – V. 64. – № 3. – P. 261-268.
172. Tauber, C.A. Inheritance of seasonal cycles in *Chrysoperla* (Insecta: Neuroptera) / C.A. Tauber, M.J. Tauber // *Genetic Research*. – 1987. – V. 49 – P. 215-223.
173. Taylor, F. Optimal switching to diapause in relation to the onset of winter / F. Taylor // *Theoretical Population Biology*. – 1980. – V. 18. – P. 125-133.
174. Tessier, A.J. 2004. Differentiation in sex investment by clones and population of *Daphnia* / A.J. Tessier, C.E. Caceres // *Ecology Letters*. – 2004. – V. 7. – P. 695-703.
175. Toyota, K. NMDA receptor activation upstream of methyl farnesoate signaling for short day-induced male offspring production in the water flea, *Daphnia pulex* / K. Toyota, H. Miyakawa, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, Y. Ogino, N. Tatarazako, S. Miyagawa, T. Iguchi // *BMC Genomics*. – 2015. – V. 42. – P. 186.
176. Tsugeki, N.K. Sedimentary records of reduction in resting egg production of *Daphnia galeata* in Lake Biwa during the 20th century: A possible effect of winter warming. / N.K. Tsugeki, S. Ishida, J. Urabe // *Journal of Paleolimnology*. – 2009. – V. 42. – P.155-165.

177. Tucker, A.E. Population-genomic insights into the evolutionary origin and fate of obligately asexual *Daphnia pulex* / A.E. Tucker, M.S. Ackerman, B.D. Eads, S. Xu, M. Lynch / Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. – 2013. – V. 110 – P. 15740-15745.
178. Vandekerkhove, J. Hatching of cladoceran resting eggs: temperature and photoperiod / J. Vandekerkhove, S. Declerck, L. Brendonck, J.M. Conde-Porcuna, E. Jeppesen, L. De Meester // Freshwater Biology. – 2005. – V. 50. – P. 96–104.
179. Van Damme. J.M.M. 2004. Multiple CMS-restorer gene polymorphism in gynodioecious *Plantago coronopus* / J.M.M. Van Damme, M.P.J. Hundscheid, S. Ivanovic, H.P. Koelewijn // Heredity. – 2004. – V. 93. – P. 175-181.
180. Vanoverbeke, J. Within season short-term hatching delays suggest risk-spreading behaviour in populations of the freshwater cladoceran *Daphnia*. / J. Vanoverbeke, L. De Meester// Ecoscience. – 2009. – V. 16. – № 4. – P. 441-451.
181. Vanvlasselaer, E. An exploratory review on the molecular mechanisms of diapause termination in the waterflea, *Daphnia* / E. Vanvlasselaer, L. De Meester // Dormancy and Resistance in Harsh Environments (Chapter 11) Topics in Current Genetics. – 2010. – V. 21. – P. 189-202.
182. Ventura, M. Reproduction as one of the main causes of temporal variability in the elemental composition of zooplankton / M. Ventura, J. Catalan // Limnology and Oceanography. – 2005. –V. 50. – P. 2043–2056.
183. Walser, B. Strong intraspecific variation in genetic diversity and genetic differentiation in *Daphnia magna*: the effects of population turnover and population size / B. Walser, C.R. Haag // Molecular Ecology. – 2012. – V. 21. – P. 851–861.
184. Warren, E. Observation on Inheritance in parthenogenesis / E. Warren // Proceedings of the Royal Society of London. – 1899 – V. 65 – P. 154-158.
185. Weeks, S.C. Maintenance of androdioecy in the freshwater shrimp, *Eulimnadia texana*: Estimates of inbreeding depression in two populations / S.C. Weeks, B.R. Crosser, R. Bennett, M. Gray, N. Zucker // Evolution – 2000 – V. 54 – P. 878-887.

186. Weissmann, A. Beiträge zur Naturgeschichte der Daphnoiden / A. Weissman // *Zietschrift für Wissenschaftliche Zoologie* – 1879 –V.33: 55-270.
187. Winsor, G.L. Sexual reproduction in *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) observations on male mating behaviour and avoidance of inbreeding / G.L. Winsor, D. Innes // *Freshwater Biology* – 2002. – V. 47. – № 3. – P 441-450.
188. Wolf, H.G. II *In situ* observations on the hatching of eggs and their contribution to population and community structure / H.G. Wolf, G. Carvalho // *Freshwater Biology*. – 1989. – V. 22. – P. 471-278.
189. Wood, T.R. Resting eggs that fail to rest / T.R.Wood // *American Naturalist*. – 1932. – V. 66 – № 704. – P. 277-281.
190. Wood, T.R. Observations on procuring and hatching sexual eggs of *Daphnia longispina* / T.R. Wood, A.M. Banta // *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. – 1933. – V. 29. – P. 437–454.
191. Wood, T.R. Hatchability of *Daphnia* and *Moina* sexual eggs without drying / T.R., Wood, A.M. Banta. // *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*. – 1937. – V. 35. – P. 229–243.
192. Yampolsky, L.Yu. Genetic Variation in the Sexual Reproduction Rate within a Population of a Cyclic Parthenogen, *Daphnia magna* / L.Yu. Yampolsky // *Evolution*. – 1992. – V. 46. – P. 833-837.
193. Yampolsky, L.Yu., Genetic Variability in an Intermittent Population of *Daphnia magna*/ L.Yu Yampolsky, B.A Kalabushkin // *Genetika*. – 1992. – V. 28. – № 6. – P. 41-50.
194. Yampolsky, L.Yu., Galimov Ya.R. Evolutionary genetics of aging in *Daphnia* / L.Yu Yampolsky, Ya.R. Galimov // *Journal Obschey Biologii*. – 2005. – V. 66. – P. 416-424.
195. Yaron, Z. Notes on the ecology and entomostracan fauna of temporary rainpools in Israel / Z. Yaron // *Hydrobiologia*. – 1964. – V.26 – № 4. –P. 489-513.
196. Yurista, P.M. Growth, Survivorship and Reproduction of *Daphnia middendorffiana* in Several Arctic Lakes and Ponds / P.M. Yurista, W. J. O'Brien // *Journal of Plankton Research*. – 2001. – V. 23. – № 7. –P. 733-744.

197. Zaffagnini, F. Karyologic observations on the maturation of the summer and winter eggs of *Daphnia pulex* and *Daphnia middendorffiana* / F. Zaffagnini, B. Sabelli // *Chromosoma*. – 1972. – V. 36. – P. 193-203.
198. Zaffagnini, F. Reproduction in *Daphnia* / F. Zaffagnini // *Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia*. – V. 45. – P. 245-284.
199. Zehnder, A. Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz / A. Zehnder, P.R. Gorham // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1960. – V. 6. – P. 645–660.