





**POLYPLOÏDIE ET TOLÉRANCE THERMIQUE CHEZ LES  
MICROCRUSTACÉS DU GENRE *DAPHNIA***

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de Maîtrise en gestion de la faune et de ses habitats  
(profil recherche) en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

PAR

© SARAH-BÉATRICE BERNIER

Avril 2021

**Composition du jury :**

**David Deslauriers, président du jury, Institut des sciences de la mer de Rimouski**

**France Dufresne, directrice de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Pierre Blier, codirecteur de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Anne-Marie Dion-Côté, examinatrice externe, Université de Moncton**

Dépôt initial le 9 novembre 2020

Dépôt final le 13 avril 2021



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, un grand merci à ma directrice de recherche, France Dufresne. Merci pour la confiance et la liberté que tu m'as accordée durant ce projet de recherche. J'ai pu développer mon autonomie et ma confiance en moi. Tes conseils, tes encouragements et ta compassion étaient toujours bienvenus et appréciés. Je suis certainement une meilleure scientifique après ces deux ans sous ta supervision.

Merci à Pierre Blier d'avoir contribué à mon projet et d'avoir offert son soutien, toujours avec une touche d'humour et de bonne humeur. Toutes nos discussions m'ont été très enrichissantes et tu as toujours su me relancer sur de nouvelles pistes à explorer dans mon projet.

Merci à l'équipe du laboratoire. Frédérique, ta présence au laboratoire et nos discussions ont vraiment fait la différence ces deux dernières années. Jean-Michel, tes grands éclats de rire m'ont manqué quand tu es parti. Astrid, tes sages conseils m'ont toujours été utiles. Merci.

Merci à Claude Belzile pour toute l'aide apportée. Ton enthousiasme pour les daphnies et leurs cellules est contagieux! Merci à Pierre Rioux pour son soutien et ses intarissables jeux de mots.

Ma vie à l'université aurait été bien terne si je n'avais pas eu des amies aussi extraordinaires pour partager les bons moments comme les mauvais, et me faire sortir du labo de temps à autre: Amélie, Caroline, Océane, Zélie et Héloïse. Merci du fond du cœur.

Merci à toute ma famille pour leur soutien inconditionnel dans cette aventure, même si personne ne semble se souvenir sur quoi porte *vraiment* ma maîtrise... peut-être qu'en lisant une partie, vous allez finalement comprendre que c'est bel et bien « daphnie », non « daphné »!

Merci à David Deslauriers et Anne-Marie Côté-Dion pour la correction et l'évaluation de ce mémoire.

Merci à tous les organismes subventionnaires qui ont apporté leur soutien financier et m'ont permis de vivre ces deux dernières années : CRSNG, FUQAR, FRQNT, PFSN et Desjardins.

Un merci tout spécial à Gaël pour son soutien moral et technique. Tu es précieux pour moi. Merci d'être là.

## RÉSUMÉ

Il est depuis longtemps reconnu que les organismes asexués et polyploïdes présentent des distributions différentes des espèces parentes sexuées et diploïdes. Ce phénomène, nommé « parthénogenèse géographique », se retrouve à la fois chez les plantes et les animaux. Les causes de ce patron de distribution sont encore mal comprises aujourd'hui, même si la parthénogenèse géographique est étudiée chez diverses espèces depuis plusieurs décennies. De récentes études sur des plantes alpines suggèrent que la température est un facteur important pour expliquer la distribution de la polyploïdie. Chez les animaux, la température n'a pas encore été directement liée à la parthénogenèse géographique. Les hautes latitudes, où les températures locales sont plus basses, sont des environnements de prédominance pour les polyploïdes. Le rôle de la tolérance thermique et d'autres traits associés à la température méritent d'être examinés pour comprendre ce phénomène. Cette étude a pour but principal de vérifier si des différences de tolérance thermique pourrait expliquer la distribution différentielle des espèces polyploïdes. Les objectifs spécifiques sont de vérifier : 1) si les clones diploïdes et polyploïdes ont des différences de tolérance thermique, 2) si la taille corporelle et la taille cellulaire est liée à la tolérance thermique et 3) si l'expression de deux gènes clés, Hsp70 et la catalase, sont associés à la tolérance thermique. Dans une première étude, des daphnies *Daphnia tenebrosa* diploïdes et triploïdes sont échantillonnées et élevées jusqu'à l'âge de trois jours. La taille corporelle et la tolérance thermique, par la mesure du C<sub>tmax</sub>, sont évaluées. Des différences significatives de taille et de tolérance thermique entre les daphnies diploïdes et triploïdes sont relevées. Une deuxième étude a été menée avec des *Daphnia pulex* diploïdes et triploïdes de différentes régions climatiques et en ajoutant des mesures de tailles cellulaires et d'expression génique de Hsp70 et de la catalase. Les triploïdes ont une tolérance thermique plus faible et des cellules plus grosses que les diploïdes. Ce projet est le premier à démontrer des différences de tolérance thermique en fonction de la ploïdie chez les daphnies. Les résultats suggèrent également que la taille de cellules est le mécanisme qui limite la tolérance thermique plutôt que les autres déterminants étudiés.

Mots clés : C<sub>tmax</sub>, tolérance thermique, *Daphnia pulex*, polyploïdie, taille cellulaire, parthénogenèse géographique



## ABSTRACT

It has long been recognized that asexuals and polyploids have different geographic distributions compared to their sexual and diploid parent species. The phenomenon, named “geographical parthenogenesis”, is found in both plant and animal species. Causes for this distribution pattern are still unclear today, even though geographical parthenogenesis has been reported decades ago. Recent studies on alpine plant species suggest that temperature could be an important factor of polyploid distribution. Temperature has yet to be directly tested in the context of geographical parthenogenesis in animals. High latitudes, with lower local temperatures than temperate regions, are environments with high frequencies of polyploids. Temperature and traits related to thermal tolerance should be investigated as causal factors of geographical parthenogenesis. In this study, we investigated geographic distribution of polyploidy as a function of thermal tolerance in relation to: body size, cell size, gene expression of heat-shock protein Hsp70 and/or gene expression of antioxidant enzyme catalase in diploid and polyploid clones of the microcrustacean *Daphnia*. In a preliminary study, triploid and diploid *Daphnia tenebrosa* were sampled and reared until three days old. Body size and Ctmax, a measure of thermal tolerance, were measured. Results show significant differences of body size and thermal tolerance between ploidy levels. A laboratory study was concluded, using triploid and diploid clones of *Daphnia pulex* from different climatic regions along with measures of cell sizes and gene expression of Hsp70 and catalase. Our results showed that triploid daphnia had significantly lower thermal tolerance and larger cells. This study is the first to show thermal tolerance differences between polyploid and diploid *Daphnia*. Our results imply that cell size is the mechanism setting thermal tolerance limits.

Keywords : Ctmax, thermal tolerance, *Daphnia pulex*, polyploidy, cell size, geographical parthenogenesis

## TABLE DES MATIÈRES

Remerciements .....	ii
Résumé .....	iv
Abstract .....	v
Table des matières .....	vi
Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures .....	ix
Introduction générale.....	1
1. La polyploïdie .....	1
1.1. Occurrence de la polyploïdie.....	1
1.2. Les effets de la polyploïdie .....	2
2. La distribution des espèces polyploïdes .....	4
2.1 Hypothèses de la parthénogenèse géographique.....	4
3. Le cas de <i>Daphnia pulex</i> .....	9
3.1 Hybridation, asexualité et polyploïdie chez <i>Daphnia pulex</i> .....	9
3.2 La parthénogenèse géographique chez <i>Daphnia pulex</i> .....	12
4. La tolérance thermique comme mécanisme de la parthénogenèse géographique.....	13
4.1 La tolérance thermique chez les daphnies.....	14
4.2 Déterminants de la tolérance thermique.....	14
5. Problématique.....	17
5.1 Objectifs, hypothèses et prédictions.....	18
CHAPITRE 1	
Ploidy-related differences in size and thermal tolerance of <i>Daphnia tenebrosa</i> clones .....	20
Abstract .....	21
Introduction .....	22
Materials and methods .....	23
Animals .....	23
Thermal tolerance measurement .....	24
Size measurement.....	24

Clonal identification .....	24
Statistical analyses .....	26
Results.....	27
Discussion and conclusion.....	28
CHAPITRE 2	
Does size matter? Evidence of size-mediated thermal tolerance in a polyploid ectotherm..	32
Abstract .....	33
Introduction.....	34
Materials and methods .....	37
Animals .....	37
Clonal identification .....	38
Ploidy level .....	40
Rearing.....	41
Thermal tolerance .....	42
Size measurements.....	44
Heat shock experiment.....	46
RNA extraction and RT-qPCR .....	47
Statistical analyses .....	48
Results.....	49
Critical thermal maximum (Ctmax).....	49
Size measurements.....	53
Expression of Hsp70 and catalase .....	55
Discussion .....	58
Critical thermal maximum (Ctmax).....	58
Body and cell sizes .....	60
Hsp70 and catalase gene expression .....	62
Conclusion .....	63
Acknowledgments .....	64
Supplementary material .....	65
Conclusion générale.....	68
Références bibliographiques.....	72

**LISTE DES TABLEAUX**

Table 1: Genotypes and ploidy level of <i>D.tenebrosa</i> clones used in this experiment .....	26
Table 2. Clone name, ploidy level, climatic zone of origin and sampling location of all 17 clones used in this experiment .....	38
Table 3. Sample spreadsheet of gene C <sub>T</sub> (cycle threshold) fold expression change data analysis of Hsp70 according to the 2 <sup>-ΔΔCT</sup> method by Livak and Schmittgen (2001).....	65

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Modes de reproduction par parthénogenèse cyclique (A) et parthénogenèse obligatoire (B) chez *Daphnia*. Durant le cycle de parthénogenèse en (A), les femelles produisent des œufs diploïdes sans fertilisation. Durant le cycle sexué, les femelles produisent des gamètes haploïdes fertilisés par les mâles, formant des œufs de résistance diploïdes. En (B), les femelles produisent plutôt des œufs de résistance diploïdes non-réduits, sans fertilisation par les mâles. Certains clones se reproduisant par parthénogenèse obligatoire forment tout de même des mâles. Figure tiré de Innes et Dufresne, 2020. ....11
- Figure 2. C<sub>t</sub>max plotted against body size for all 16 diploid (open symbols, n=38) and triploid (filled symbols, n=66) *Daphnia tenebrosa* clones. Regression lines based on the slope of the mixed models are shown for both ploidy levels .....28
- Figure 3. Maximum-likelihood reconstruction of the phylogenetic relationships between each clone used in this experiment based on mitochondrial gene ND5. Distances are shown for each branch. The tree is rooted through European *D. pulex*. All added *Daphnia* sequences (*Daphnia pulex* R2 10 2 ND5, *Daphnia pulex* Metis3 ND5, *Daphnia pulex* R2 14 4 ND5, *Daphnia pulex* POV1 ND5, *Daphnia pulex* RES4 ND5, *Daphnia tenebrosa* T59 ND5 and *Daphnia pulex* Dp076 002) are available in Genbank.....40
- Figure 4 : C<sub>t</sub>max setting with the thermocycler, temperature probe and video camera (A). Recordings show temperature and individual *Daphnia* swimming in 0.5 mL tubes installed on the thermocycler's heating block (B).....43
- Figure 5. Scanning electron microscope images of *D. pulex* with diamond shaped-prints on the shell (A, B, C) and laser scanning microscope images showing the presence of one nucleus in each print (D). In (D), membranes were stained with Nile Red and nuclei with SYBR Green I following permeabilization in ethanol 70%. Pictures taken by Claude Belzile (ISMER-UQAR) on a JEOL 6460LV scanning electron microscope and a Carl Zeiss LSM700 confocal laser scanning microscope .....45
- Figure 6. Cells were measured in the anterior region of the ventral margin of the carapace. Scale bar shown in red is 100 µm in length. The direction of cell measurement is displayed by the black arrow.....46

- Figure 7. C<sub>tmax</sub> measurements by ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C). Mean C<sub>tmax</sub> values and error bars are shown. Significant values of  $p < 0.05$  are shown with a star symbol (\*) and values of  $p = 0.05$  are shown with a dot symbol (•)..... 49
- Figure 8. C<sub>tmax</sub> measurements by climatic zone (subarctic and temperate), ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C). Error bars are shown ..... 50
- Figure 9. C<sub>tmax</sub> measurements of diploids by climatic zone (subarctic and temperate) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C). Error bars are shown ..... 51
- Figure 10. C<sub>tmax</sub> by body size (A) or cell size (B) and acclimation temperature (+ : 16°C, • : 20°C, Δ : 24°C). Equations, p values and R<sup>2</sup> values are framed ..... 52
- Figure 11. Body size (A) and cell size (B) by ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C) with error bars. Significant values of  $p < 0.05$  are shown with a star symbol (\*)..... 53
- Figure 12. Body size (A) and cell size (B) by climatic zone (subarctic, temperate), ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C) with error bars. Significant values of  $p < 0.05$  are shown with a star symbol (\*)..... 54
- Figure 13. Cell size of diploids by climatic zone (subarctic, temperate) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C) with error bars..... 55
- Figure 14. Mean normalized expression fold change of Hsp70 (A) and catalase (B) by ploidy levels (2n, 3n) and treatment (heat shock, control). All clones were raised at 20°C for this experiment..... 56
- Figure 15. Mean normalized expression fold change of Hsp70 (A) and catalase (B) by clone and treatment (heat shock, control) with error bars. All clones were raised at 20°C for this experiment..... 57
- Figure 16. Body size by cell size and acclimation temperature (+ : 16°C, • : 20°C, Δ : 24°C). Equations, p values and R<sup>2</sup> values are framed ..... 66
- Figure 17. Mean C<sub>tmax</sub> (°C) of *Daphnia* raised at 20°C by normalized expression fold change of Hsp70 (A) and catalase (B). Equations, R<sup>2</sup> values and p values are shown for each graph. A label for the “Ste-Luce” clone is shown in each graph. .... 67

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1. La polyploïdie

La polyploïdie est l'état d'un organisme qui possède plus de deux séries complètes de chromosomes. Elle se produit naturellement lorsqu'il y a fusion de gamètes qui ont plus d'un jeu de chromosomes ou lors d'un dédoublement spontané de chromosomes. La polyploïdie se classe en deux catégories selon le mode d'apparition: l'autopolyploïdie et l'alloployploïdie (Thompson & Lumaret, 1992). Les autopolyploïdes subissent une augmentation du jeu de chromosomes au sein d'une même espèce. Ceci peut se produire par de nombreux mécanismes: un dédoublement de génome lors d'une non-réduction suite à la mitose, la fertilisation de gamètes non réduits suite à la méiose ou par polyspermie, soit la fertilisation d'un œuf par plus d'un spermatozoïde (Otto & Whitton, 2000). L'alloployploïdie survient lors d'une hybridation. L'hybridation est très fréquente chez les plantes, et pourrait également être le mode prévalent d'apparition d'espèces polyploïdes animales (Gregory & Mable, 2005).

### 1.1. Occurrence de la polyploïdie

La polyploïdie est un phénomène très répandu chez les plantes. Il est estimé que 50% à 80% du nombre total d'espèces de plantes sont polyploïdes (Masterson, 1994). Le taux de formation de polyploïdes est particulièrement élevé chez les angiospermes : une espèce par 100 000 (Ramsey & Schemske, 1998) et il est probable que la polyploïdie soit apparue chez tous les angiospermes dans leur histoire évolutive (Wendel, 2000). Chez les gymnospermes, la fréquence d'espèce polyploïdes est d'environ 5% (Ahura, 2005). Chez les animaux, l'existence d'espèces polyploïdes a longtemps été perçue comme étant un phénomène extrêmement rare, voire inconnu (Christensen, 1980; Muller, 1925). Bien qu'elle soit plus rare chez les animaux que chez les plantes (Mable, 2004), la polyploïdie est observée chez

plusieurs espèces de vertébrés et d'invertébrés (Gallardo *et al.*, 2004; Gregory & Mable, 2005; Mable, 2004). On retrouve des cas de polyploïdie dans presque tous les phyla majeurs, à l'exception des oiseaux (Gregory & Mable, 2005; Lewis, 1980).

## 1.2. Les effets de la polyploïdie

La présumée rareté de la polyploïdie chez les animaux a certainement contribué au fait que l'importance de la polyploïdie comme mécanisme évolutif a longtemps été sous-estimée (Mable, 2004). Elle était perçue comme un facteur qui complique et entrave le processus évolutif (Stebbins, 1971a, 1971b). Aujourd'hui, les avantages évolutifs et les effets de la polyploïdie sont bien documentés (revu par Comai, 2005; revu par Gregory & Mable, 2005; Levin, 1983; revu par Otto & Whitton, 2000).

Au niveau génétique, la duplication du génome peut entraîner un effet de redondance des gènes. Ceci permet d'annuler ou réduire l'effet des mutations délétères chez les polyploïdes (Paquin & Adams, 1983). La redondance des gènes permet également aux gènes dupliqués d'obtenir de nouvelles fonctionnalités et une diversification dans leur expression (Osborn *et al.*, 2003). Par exemple, de nouvelles enzymes « hybrides » peuvent apparaître si les gènes dupliqués incluent différentes sous-unités d'une enzyme. Cette diversité enzymatique pourrait donner aux polyploïdes une plus grande versatilité biochimique (Barber, 1970). La polyploïdie est également associée à une augmentation de l'hétérozygotie, de la diversité allélique et des effets d'hétérosis (vigueur accrue de la progéniture hybride) (Birchler *et al.*, 2010; Chen, 2010). Ces traits génomiques procurent ainsi une plus grande flexibilité physiologique et métabolique dans des environnements variés et changeants (Hörandl, 2006; Johnson, 1974; Levin, 1983).

Au niveau cellulaire, la polyploïdie est caractérisée par l'augmentation du contenu d'ADN nucléaire, ce qui augmente le volume et la taille des cellules (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001; Otto & Whitton, 2000; Stebbins, 1971a). L'augmentation du volume cellulaire réduit le ratio surface/volume et modifie les vitesses de processus dépendant des



surfaces membranaires (Cavalier-Smith, 1978). Selon Weiss *et al.* (1975), la diminution du ratio surface/volume avec l'augmentation de la ploïdie pourrait être désavantageux pour le fitness. Dans certaines conditions, le fitness serait en partie déterminé par des processus liés à la surface membranaire des cellules, comme l'activité d'enzymes se trouvant sur les membranes cellulaires. Dans ces conditions, un organisme ayant un niveau de ploïdie plus élevé serait désavantagé par le ratio surface/volume plus faible. Le contraire se produirait si le fitness dépendait plutôt des activités reliées au volume cellulaire, comme la quantité de protéines ou d'ARN.

L'un des effets les plus communs lié à la polyploïdie est le changement vers un mode de reproduction asexué (revu par Otto & Whitton, 2000). Chez les animaux, la parthénogenèse (reproduction asexuée par des œufs non fertilisés) est habituellement associée à la polyploïdie (Stebbins, 1980) et plusieurs polyploïdes sont également asexués (revu par Comai, 2005; et Otto & Whitton, 2000). Chez les plantes, la plupart des espèces se reproduisant par apomixie (reproduction asexuée par la non-réduction méiotique des œufs) sont également polyploïdes. Cependant, la majorité des plantes polyploïdes ne sont pas apomictiques (Otto & Whitton, 2000), l'apomixie étant un mode de reproduction rare chez les angiospermes (Carman, 1997). L'association entre la polyploïdie et la reproduction asexuée est différente chez les angiospermes puisque la polyploïdie semble précéder l'apparition de l'apomixie (Stebbins, 1980), tandis que les animaux, la parthénogenèse survient généralement avant la polyploïdie (Innes & Dufresne, 2020; revu par Otto & Whitton, 2000; Xu *et al.*, 2015)

La polyploïdie affecte également le développement des organismes. Les polyploïdes ont généralement des taux de croissances plus faibles que leurs espèces parentes diploïdes (revu par Otto & Whitton, 2000). Il existe de fortes corrélations négatives entre le contenu d'ADN et le taux de développement chez les angiospermes (Bennett, 1972), les amphibiens (Fankhauser, 1945; Goin *et al.*, 1968; Licht & Lowcock, 1991) et les insectes (Bier & Muller,

1969). Les effets de la polyploïdie sur la taille des cellules et sur le taux de croissance tendent à augmenter la taille à maturité chez de nombreux polyploïdes, particulièrement chez les invertébrés (revu par Gregory & Mable, 2005).

Ces différents effets physiologiques et métaboliques font en sorte que les polyploïdes pourraient avoir une meilleure tolérance écologique que les diploïdes (Levin, 1983; Lokki & Saura, 1980). Cette tolérance se reflète sur la capacité de dispersion des polyploïdes.

## **2. La distribution des espèces polyploïdes**

Le terme « parthénogenèse géographique » décrit le patron de distribution particulier retrouvé chez de nombreuses espèces asexuées (Vandel, 1928). Les espèces asexuées sont plus nombreuses dans les hautes altitudes, latitudes et dans les environnements perturbés. Ce patron s'observe également de façon fréquente chez les espèces polyploïdes (Beaton & Hebert, 1988; Brochmann *et al.*, 2004; Kirchheimer *et al.*, 2016; Little *et al.*, 1997), de par l'association courante entre la reproduction asexuée et la polyploïdie. Puisque ce patron est présent chez les plantes et les animaux, ceci suggère que la reproduction asexuée, la polyploïdie ou un facteur lié à ces caractères procure un avantage dans ces milieux.

### **2.1 Hypothèses de la parthénogenèse géographique**

Le fait que des taxons sexués et asexués apparentés possèdent des patrons de distribution différents est un reconnu, mais toutefois mal compris depuis longtemps. Les causes possibles de la parthénogenèse géographique sont sujet à débat depuis plusieurs décennies. Parmi les hypothèses les plus populaires, on retrouve celles impliquant l'hybridation, le mode de reproduction, le dédoublement de génome, les interactions biotiques, ou les traits d'histoire de vie. Pour un cas donné, plusieurs facteurs peuvent

contribuer au patron observé et ces hypothèses sont donc non mutuellement exclusives. Les paragraphes suivants font un sommaire non exhaustif des hypothèses expliquant la parthénogenèse géographique ainsi que certains contre arguments les plus utilisés.

La prévalence de l'hybridation comme mode d'apparition de la polyploïdie à la fois chez les plantes et les animaux (Gregory & Mable, 2005) suggère un atout chez les hybrides. Ceux-ci pourraient alors exploiter des habitats plus extrêmes que leurs parents diploïdes et sexués. L'hybridation semble être particulièrement importante pour le succès des plantes, puisque la plupart des plantes polyploïdes s'établissant avec succès sont de nature hybride (Soltis *et al.*, 2003; Stebbins, 1971a; Stebbins, 1985). Un des atouts les plus importants de l'hybridation est qu'elle procure une variabilité génétique plus rapidement que le taux de mutations *de novo* (Anderson & Stebbins, 1954; Barton, 2001). Cette variabilité pourrait donc conférer une plus grande tolérance aux facteurs environnementaux dans certaines régions (Kearney, 2005; Löve & Löve, 1957; Manton, 1950) et faciliter la recolonisation suite aux glaciations (Kearney, 2005). Cependant, certaines espèces autopolyploïdes (qui possèdent plus de deux jeux de chromosomes provenant de la même espèce parentale, sans hybridation) peuvent présenter un patron de parthénogenèse géographique (Borgen & Hultgård, 2003; Yamane *et al.*, 2003). L'origine hybride ne serait donc pas nécessaire pour la parthénogenèse géographique. De plus, l'hybridation homoploïde (sans changement de ploïdie) chez les diploïdes ne permet pas une expansion de l'habitat ni une tendance à utiliser des habitats plus nordiques (Arnold & Bennett, 1993; Rieseberg *et al.*, 2003; Rieseberg & Wendel, 1993; Stace, 1976). L'hybridation seule ne pourrait donc pas expliquer les distributions géographiques de tous les polyploïdes.

L'asexualité a également été présentée comme un avantage lié à la polyploïdie (Stebbins, 1950), puisque la polyploïdie s'accompagne généralement d'un changement vers un mode de reproduction asexuée chez les plantes comme les animaux (revu par Comai, 2005; et Otto & Whitton, 2000; Stebbins, 1980). Il a également été démontré que les angiospermes polyploïdes ont en moyenne des taux d'auto-fertilisation plus élevés que les

espèces parentes diploïdes (Barringer, 2007). La parthénogenèse peut permettre la colonisation rapide et efficace d'une niche en comparaison d'une population sexuée (Roughgarden, 1972; Stebbins, 1950). Une reproduction asexuée évite le « coût de la sexualité » de la production de mâles (Maynard Smith, 1978). Cependant, la prévalence de l'hermaphrodisme chez les plantes évite ce « coût de la sexualité » (Maynard Smith, 1978). Le succès des espèces asexuées et apomictiques dépend de nombreux facteurs (revu par Hörandl, 2006) et le mode de reproduction ne constitue pas à lui seul une explication au phénomène de parthénogenèse géographique pour toutes les espèces.

La duplication du génome est également mise en cause dans la parthénogenèse géographique. Une étude sur une espèce d'ostracodes diploïdes sexués, diploïdes asexués et triploïdes asexués suggère que la polyploïdie causerait le patron de parthénogenèse géographique chez cette espèce plutôt que le mode de reproduction (Adolfsson *et al.*, 2010). Selon Bierzychudek (1985), le succès des polyploïdes dans certains environnements est dû aux effets positifs de la polyploïdie. Il est maintenant connu que les multiples copies de gènes permettent de modifier leurs expressions, ce qui permet des effets d'hétérosis et procure aux polyploïdes une plus grande flexibilité métabolique (Adams & Wendel, 2005; Chen, 2010; Comai, 2005; Osborn *et al.*, 2003; Renny-Byfield & Wendel, 2014; te Beest *et al.*, 2012). Cependant, ces changements génomiques peuvent également être négatifs. Les changements dans l'expression et la régulation de l'expression des gènes pourraient être délétères si ceux-ci ont été au préalable optimisés par sélection chez les parents diploïdes. De plus, les polyploïdes d'origines récentes sont fréquemment associés à des instabilités phénotypiques et génomiques, comme la stérilité, des anomalies phénotypiques ou des problèmes lors de la ségrégation des chromosomes (Comai *et al.*, 2000; Madlung *et al.*, 2005; Mayer & Aguilera, 1990; Wang *et al.*, 2010). Ces effets font en sorte que le taux d'extinction des néopolyploïdes, soit les lignées qui ne sont pas encore établies, est élevé (Levin, 2019; Mayrose *et al.*, 2011; Soltis *et al.*, 2014). La polyploïdie peut également induire la production de cellules aneuploïdes (qui possèdent un nombre anormal de chromosome) dû à des difficultés à compléter la mitose (Klinner & Bottcher, 1992; Mayer & Aguilera, 1990).

L'aneuploïdie peut à son tour causer de l'instabilité génomique et épigénétique et pourrait favoriser le développement de cancers (Matzke *et al.*, 2003; Mayer & Aguilera, 1990; revu par Storchova & Pellman, 2004). La polyploïdie comportant de nombreux désavantages, il est difficile de s'appuyer exclusivement sur les effets bénéfiques de la duplication du génome pour justifier le patron général de la parthénogenèse géographique.

Une autre des hypothèses de la polyploïdie géographique concerne les interactions biotiques. Les espèces polyploïdes sont fréquemment associées aux habitats perturbés ou inoccupés suite aux glaciations du Pleistocène (Bierzychudek, 1985; Vandel, 1928). Il a été suggéré que la parthénogenèse ne perdure que dans ces habitats où il y a absence de compétition et d'interactions biotiques (Brochmann *et al.*, 2004; Parisod *et al.*, 2010). Les espèces sexuées auraient un avantage dans les environnements à fortes compétitions biotiques, puisque la recombinaison augmenterait la vitesse d'adaptation (McDonald *et al.*, 2016). L'existence de populations mixtes d'asexuées et de sexuées contredit pourtant cette hypothèse (revu par Hörandl, 2006). L'hypothèse de la « Reine Rouge », soit les interactions biotiques de coévolution entre parasites et hôtes, a également été mise en cause dans ce contexte (Meirmans *et al.*, 2006). Les parasites suivent la distribution des espèces sexuées, se retrouvant dans les régions de basses latitudes plus chaudes (Hamilton, 1990). L'hypothèse de la « Reine Rouge » stipule que la sexualité pose un avantage chez les hôtes dans leur lutte contre les parasites. Les génotypes rares sont favorisés chez les hôtes, puisqu'ils leur permettent d'échapper aux parasites et le mode de reproduction sexuée fournit ces génotypes rares plus rapidement que l'asexualité, grâce à la recombinaison (Glesener & Tilman, 1978; Hamilton, 1980; Hamilton *et al.*, 1990). Cependant, cette hypothèse a été supportée seulement quand les parasites sont particulièrement virulents (May & Anderson, 1983).

Finalement, il a été suggéré que les traits d'histoire de vie puissent affecter la distribution des espèces polyploïdes. Chez les plantes et les animaux, plusieurs espèces polyploïdes présentent des traits d'histoires de vie différents des espèces diploïdes parentes. Les traits d'histoire de vie incluent la reproduction, la croissance, la taille à maturité et la

grosseur des œufs. Chez les plantes, la polyploïdie est fréquemment associée aux espèces de plantes pérennes angiospermes (Van Drunen & Husband, 2019) et herbacées (Barringer, 2007; Stebbins, 1971a). Celles-ci ont un cycle de vie plus long comparativement aux annuelles. Les herbacées pérennes diffèrent également dans le taux d'auto-fertilisation par rapport aux herbacées annuelles et aux plantes ligneuses pérennes (Barrett *et al.*, 1996). Chez les animaux, il a été démontré que les escargots d'eau douce *Potamopyrgus antipodarum* diploïdes atteignent leur maturité plus lentement que les polyploïdes (Larkin *et al.*, 2016). Les salamandres hybrides du genre *Ambystoma* tétraploïdes sont plus grosses tout au long du développement larvaire, se métamorphosent plus tard, ont une queue plus large et ont un poids plus important que les diploïdes et triploïdes (Licht & Bogart, 1989). Les daphnies *Daphnia pulex* triploïdes ont une plus grande taille et produisent de plus gros œufs que les diploïdes. Elles atteignent également la maturité plus tôt que les diploïdes lorsqu'elles sont élevées à faible température (Dufresne & Hebert, 1998). Ces différences de traits d'histoires de vie, dû aux effets nucléotypiques (définis comme étant les conditions du noyau qui impactent la cellule et l'organisme par Bennett (1971)), pourraient permettre aux espèces polyploïdes de s'établir avec plus de succès dans certains environnements et expliquer le patron de distribution observé.

Beaucoup d'efforts et de nombreuses hypothèses ont été émises pour mieux comprendre la biogéographie des espèces polyploïdes. La plupart des hypothèses énoncées ci-dessus sont non-exclusives et de nombreux facteurs pourraient causer le patron de distribution (Haag & Ebert, 2004). Puisqu'il y a relativement peu de données comparatives sur plusieurs taxons avec un gradient géographique suffisamment large, les généralisations quant à la parthénogenèse géographique sont limitées et aucun consensus n'est encore établi (Rice *et al.*, 2019).

### 3. Le cas de *Daphnia pulex*

Chez les animaux, la parthénogenèse géographique se retrouve notamment chez les daphnies du complexe d'espèces *Daphnia pulex* (Colbourne & Hebert, 1996). Le complexe d'espèces *Daphnia pulex* regroupe diverses espèces comportant de nombreux clones diploïdes et triploïdes (Colbourne *et al.*, 1998; Vergilino *et al.*, 2009). Le complexe *Daphnia pulex* est une composante importante des écosystèmes d'eau douce des régions arctiques, subarctiques et tempérées en Amérique du Nord. Les espèces *D. pulex*, *Daphnia pulicaria*, *Daphnia middendorffiana* et *Daphnia tenebrosa* (Dufresne & Hebert, 1998) en font notamment partie.

#### 3.1 Hybridation, asexualité et polyploïdie chez *Daphnia pulex*

La polyploïdie dans le complexe *D. pulex* est rapportée chez deux espèces seulement : *D. tenebrosa* et *D. middendorffiana* (Dufresne & Hebert, 1995, 1997). Cette dernière espèce est composée des clones exclusivement polyploïdes se reproduisant par parthénogenèse obligatoire, tandis que *D. tenebrosa* inclut également des lignées diploïdes (Dufresne & Hebert, 1997).

La parthénogenèse obligatoire et la parthénogenèse cyclique sont les deux modes de reproduction retrouvés chez les daphnies (Hebert *et al.*, 1988). La parthénogenèse cyclique comprend une phase clonale, dite améiotique (sans méiose), durant laquelle les daphnies femelles produisent des œufs non fertilisés (Figure 1A). Durant la phase sexuée, il y a production d'œuf de résistance suite à la fertilisation des gamètes haploïdes femelles par les gamètes haploïdes mâles (Taylor *et al.*, 1999). La parthénogenèse cyclique correspond au mode ancestral, mais quelques lignées ont éliminé la phase sexuée et ne se reproduisent que par parthénogenèse obligatoire (Hebert *et al.*, 1988). Les daphnies se reproduisant par parthénogenèse obligatoire ont un cycle de vie strictement asexué. Les œufs de résistances sont des œufs non-réduits qui possèdent le même bagage génétique que la mère (Hebert &

Crease, 1983; Innes & Dufresne, 2020; Innes & Hebert, 1988). Certaines lignées se reproduisant par parthénogenèse obligatoire produisent des mâles fonctionnels qui peuvent ensuite se reproduire dans des lignées sexuées (Innes & Hebert, 1988; Xu *et al.*, 2015) (Figure 1B).



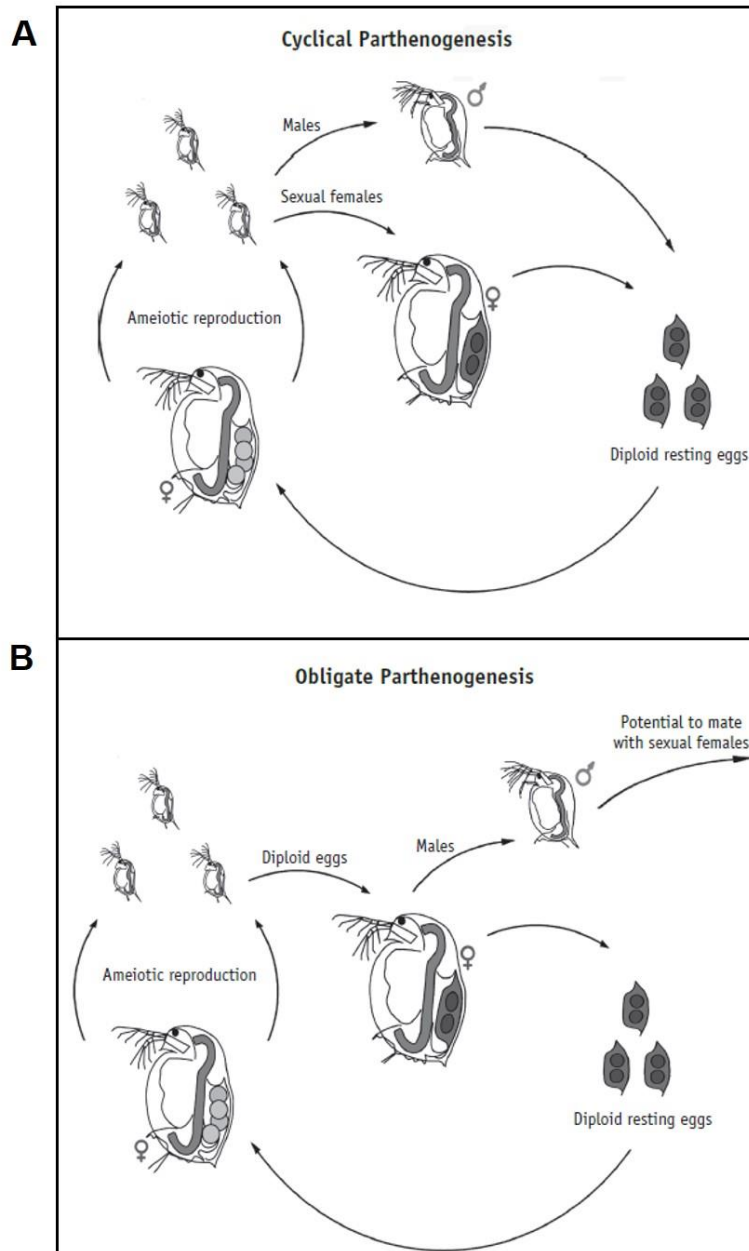


Figure 1. Modes de reproduction par parthénogenèse cyclique (A) et parthénogenèse obligatoire (B) chez *Daphnia*. Durant le cycle de parthénogenèse en (A), les femelles produisent des œufs diploïdes sans fertilisation. Durant le cycle sexué, les femelles produisent des gamètes haploïdes fertilisés par les mâles, formant des œufs de résistance diploïdes. En (B), les femelles produisent plutôt des œufs de résistance diploïdes non-réduits, sans fertilisation par les mâles. Certains clones se reproduisant par parthénogenèse obligatoire forment tout de même des mâles. Figure tiré de Innes et Dufresne, 2020.

L'occurrence de la polypléidie chez le genre *Daphnia* est associée au mode de reproduction par parthénogenèse obligatoire (Dufresne & Hebert, 1994; Xu *et al.*, 2015). L'apparition de l'asexualité par des événements d'hybridation semble précéder l'apparition de la polypléidie chez *D. pulex* (revu par Innes & Dufresne, 2020). Presque toutes les lignées se reproduisant par parthénogenèse obligatoire présentent des signes d'hybridation (Dufresne & Hebert, 1995; Dufresne *et al.*, 2011). De même, tous les clones polypléides proviennent d'événements d'hybridation interspécifique entre *D. pulex* et une autre espèce (Dufresne & Hebert, 1994). Xu *et al.* (2013) ont découverts que les mâles de lignées se reproduisant par parthénogenèse obligatoire peuvent produire du sperme diploïde. Ceci suggère que la polypléidie chez les daphnies serait apparu suite à un événement d'hybridation impliquant le sperme diploïde d'un tel mâle et un œuf haploïde d'une femelle de lignée de parthénogenèse cyclique (Xu *et al.*, 2013). En Amérique du Nord, les événements répétés d'hybridation entre les espèces *D. pulicaria* et *D. pulex* ont engendré des clones triploïdes se reproduisant par parthénogenèse obligatoire qui sont restreints aux hautes latitudes (Beaton & Hebert, 1988; Dufresne & Hebert, 1994, 1997).

### 3.2 La parthénogenèse géographique chez *Daphnia pulex*

Le patron de parthénogenèse géographique est présent chez *D. pulex* : la parthénogenèse cyclique est plutôt typique des daphnies qui vivent près de la limite sud de répartition (Beaton & Hebert, 1988) et ce mode de reproduction n'est pas retrouvée au nord du 55°N (Vergilino *et al.*, 2009). Aux hautes latitudes, les lignées se reproduisent par parthénogenèse obligatoire (Dufresne *et al.*, 2011). Les clones diploïdes se retrouvent en région tempérée et subarctique. Les clones triploïdes et strictement parthénogènes sont absents des régions tempérées et ne se retrouvent qu'en région subarctique et dans l'arctique (Beaton & Hebert, 1988; Dionne *et al.*, 2017; Dufresne & Hebert, 1997).

Les mécanismes spécifiques qui expliquent la présence accrue de clones de daphnies triploïdes en hautes latitudes n'ont pas été identifiés. Des travaux antérieurs ont démontré que le métabolisme aérobie des clones triploïdes ne différait pas de celui des clones diploïdes (Ratté, 2011). Les clones triploïdes n'expriment pas plus les gènes de réparation de l'ADN lorsqu'exposé aux UV (Martin, 2018). La comparaison des traits d'histoire de vie entre les clones diploïdes et triploïdes du subarctique montre que les polyploïdes ont une plus grande taille corporelle, produisent de plus gros œufs et de plus gros nouveau-nés que les diploïdes. Elles atteignent la maturité sexuelle à un âge et une taille supérieures aux daphnies diploïdes à 17°C, 20°C et 24°C. Le contraire se produit à faible température (Dufresne & Hebert, 1998). À 10°C, les daphnies polyploïdes deviennent matures plus tôt que les diploïdes. Ceci pourrait leur conférer un avantage compétitif par rapport aux daphnies diploïdes dans les hautes latitudes où les températures annuelles sont plus basses (Dufresne & Hebert, 1998). Ces études ne démontrent pas si la présence de polyploïdes dans les hautes latitudes est due à un avantage compétitif dans ces régions, ou si les polyploïdes sont plutôt désavantagés par les milieux tempérés, ce qui expliquerait leur absence au sud du subarctique.

#### **4. La tolérance thermique comme mécanisme de la parthénogenèse géographique**

Chez les plantes, il a été suggéré que la distribution des espèces polyploïdes pourrait être attribuée à l'influence directe du climat. Les basses températures peuvent former du pollen non réduit qui cause la polyploïdie chez la descendance (Belling, 1925; De Storme *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2011). Les membres polyploïdes de plusieurs espèces de plantes alpines exploiteraient une niche thermique avec des températures plus basses que les diploïdes (Kirchheimer *et al.*, 2016; Schinkel *et al.*, 2016; Theodoridis *et al.*, 2013).

Chez les animaux, peu d'études ont vérifié le lien entre le climat et la parthénogenèse géographique. Une étude de parthénogenèse géographique chez le coléoptère diploïde *Ips typographus* montre que celle-ci est associée à la température (Meirmans *et al.*, 2006). Les populations parthénogènes du gecko *Heteronotia binoei* occupent des régions avec très peu

de précipitations comparées aux populations parentales sexuées et diploïdes (Kearney *et al.*, 2003). Chez les daphnies, les traits physiologiques qui permettent une acclimatation aux températures locales n'ont pas été explorés pour expliquer le succès des polyploïdes en hautes latitudes. Puisque la température annuelle moyenne dans les régions arctiques et subarctiques est plus basse, il est possible que les clones de daphnies triploïdes aient une tolérance thermique plus faible que les diploïdes.

#### 4.1 La tolérance thermique chez les daphnies

Les études sur la tolérance thermique sont particulièrement pertinentes dans le contexte actuel de changements climatiques. Les daphnies sont de bons modèles ectothermes aquatiques pour ces études. Leur distribution sur un large gradient latitudinal permet de vérifier les adaptations aux températures locales. Les études de Geerts *et al.* (2014, 2015) montrent que les daphnies possèdent un potentiel évolutif de tolérance thermique lors de l'augmentation de la température. Les daphnies acclimatées à des températures plus élevées ont une meilleure tolérance thermique (Geerts *et al.*, 2015). Celles provenant de populations nordiques présentent des niveaux de tolérance thermique inférieure aux populations plus au Sud (Geerts *et al.*, 2014; Yampolsky *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que la tolérance thermique et ses déterminants pourraient expliquer la distribution géographique des espèces polyploïdes, qui seraient à leur limite thermique en région subarctique.

#### 4.2 Déterminants de la tolérance thermique

##### *4.2.1. La taille corporelle*

La taille corporelle est un déterminant important de la tolérance thermique chez les ectothermes. Dans le contexte de la parthénogenèse géographique, deux règles associant température et taille corporelle sont particulièrement d'intérêt : les clines de Bergmann (Bergmann, 1847) et la règle température-taille (Atkinson, 1994). L'hypothèse des clines de

Bergmann propose que les régions plus chaudes soient peuplées d'espèces comparativement plus petites que les régions froides (Bergmann, 1847). La règle température-taille décrit le phénomène observé où les ectothermes élevés aux hautes températures présentent des tailles à maturité plus petites (Atkinson, 1994). La règle de température-taille est observée chez les daphnies (Geerts *et al.*, 2014; Geerts *et al.*, 2015; Hoefnagel *et al.*, 2018). Il a été suggéré que les arthropodes qui suivent la règle température-taille sont également plus larges aux latitudes plus hautes, ce qui contribue au patron géographique des clines de Bergmann (Horne *et al.*, 2015). Une méta-analyse de Daufresne *et al.* (2009) a révélé que la taille corporelle des ectothermes diminue avec l'augmentation de la température observée depuis quelques décennies, en accord avec l'hypothèse des clines de Bergmann. En plus de ces deux règles, il a été observé que les ectothermes de petites tailles sont généralement plus résistants aux hautes températures (Geerts *et al.*, 2014; Geerts *et al.*, 2015; Leiva *et al.*, 2019). Le lien qui existe chez les ectothermes entre la taille corporelle et la tolérance thermique indique que le mécanisme limitant la tolérance thermique est dépendant de la taille.

#### 4.2.2 La diffusion de l'oxygène

Il a été suggéré que le mécanisme limitant la tolérance thermique soit la diffusion de l'oxygène. Les capacités aérobies des organismes seraient le premier processus limité par la température (Atkinson *et al.*, 2006; Chapelle & Peck, 1999; Forster *et al.*, 2012; Pörtner, 2001, 2002; Pörtner & Knust, 2007; Verbeck *et al.*, 2011). Les hautes températures augmentent les taux métaboliques des ectothermes (Pörtner, 2009; Schulte *et al.*, 2011) mais n'augmente que légèrement le taux de diffusion de l'oxygène dans les tissus ou le milieu (Brown *et al.*, 1991; Letey *et al.*, 1962; Seymour, 1994). La capacité de fournir l'oxygène aux tissus serait donc réduite par rapport à la demande métabolique à température élevée (Pörtner & Farrell, 2008). Les hautes températures pourraient particulièrement impacter les ectothermes aquatiques (Atkinson *et al.*, 2006; Forster *et al.*, 2012) puisque la solubilité de l'oxygène diminue avec l'augmentation de la température dans l'eau (Woods, 1999), ce qui peut rendre le milieu hypoxique.

Chez les ectothermes de petite taille, avec de petites cellules, les limites de tolérance thermique pourraient survenir à des concentrations d'oxygène plus faibles que chez les ectothermes de grandes tailles. La diffusion de l'oxygène est facilitée par les petites tailles de cellules. Celles-ci ont un ratio surface/volume supérieur (Atkinson *et al.*, 2006; Pörtner, 2001), ce qui diminue la distance de diffusion à l'intérieur des tissus (Czarnoleski *et al.*, 2014). La diminution de la taille corporelle qui accompagne l'augmentation de la température chez les ectothermes (la règle de température-taille) pourrait donc être une conséquence directe de la diminution de la taille des cellules pour permettre une diffusion adéquate de l'oxygène (Pörtner, 2004).

La polyploïdie tend à augmenter la taille corporelle, particulièrement chez les invertébrés (revu par Gregory & Mable, 2005; Otto & Whitton, 2000). Ceci est dû à la relation positive entre la taille du génome et la taille des cellules (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001). L'augmentation du volume cellulaire par la polyploïdie diminue le ratio surface/volume, ce qui affecte la vitesse des processus métaboliques, dont la diffusion de l'oxygène. Pour cette raison, il est possible que les tailles cellulaires et corporelles plus larges des daphnies triploïdes affectent négativement leur tolérance thermique et expliquerait leur absence des milieux tempérés.

#### 4.2.3. *Les protéines et enzymes antioxydantes*

Si la diffusion de l'oxygène limite la tolérance thermique, certains déterminants de la tolérance thermique pourraient être des traits associés au stress oxydant. Le stress thermique cause chez les ectothermes un stress oxydant et des dommages aux protéines (Klumpen *et al.*, 2017). Le stress oxydant est un état où l'organisme subit une production accrue de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Les DRO, tel que  $H_2O_2$  et  $O_2^-$ , sont des molécules qui peuvent causer des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines (Apel & Hirt, 2004; Costantini, 2014). Les traits physiologiques qui confèreraient une meilleure tolérance thermique chez les

diploïdes pourraient donc être liés aux mécanismes antioxydants et de protection des protéines.

Les températures extrêmes causent des changements enzymatiques liés à la résistance au stress oxydant (Brans *et al.*, 2018; Costantini, 2014; revu par Suzuki & Mittler, 2006). Les enzymes antioxydantes visées, dont la catalase, montrent des niveaux d'activité augmentés ou fluctuants lors d'une exposition aux températures élevées ou lors d'un stress thermique (Becker *et al.*, 2011; Brans *et al.*, 2018). Ce sont des enzymes essentielles pour la détoxification des DRO et pour la tolérance thermique. Ces tendances se retrouvent également chez les daphnies, où les clones tolérants à la chaleur montrent des capacités antioxydantes plus importantes (Coggins *et al.*, 2017).

Les protéines de choc thermique (Hsp) et leurs gènes associés sont impliqués dans la réponse adaptative des organismes aux changements de température (Bentley *et al.*, 2017). Les Hsp sont des protéines chaperonnes ayant un rôle actif dans la défense cellulaire contre la détérioration et l'agrégation des protéines lors d'un stress thermique (Somero, 2010). Les grandes familles de Hsp, soient les Hsp70 et Hsp90, sont toutes régulées à la hausse lors de stress thermique (Feder, 1999) afin de limiter la dénaturation des protéines (Richter *et al.*, 2010).

## **5. Problématique**

De nombreuses hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer le phénomène de distribution de la polyploïdie, à la fois chez les plantes et les animaux. La plupart des études étant restreintes par le gradient géographique ou encore par l'absence de populations sympatriques (populations de diploïdes et polyploïdes dans un même espace), les conclusions sont limitées dans leur portée. Dans les hypothèses possibles de la parthénogenèse géographique, l'effet de la température et du climat ont été très peu étudiés. Les études

effectuées, chez les plantes et les animaux, montrent que la température pourrait expliquer une partie du phénomène. Les daphnies sont des modèles de choix pour étudier la question de la parthénogenèse géographique. Leur distribution est comprise sur un large gradient longitudinal et les populations diploïdes et triploïdes cohabitent au subarctique canadien.

### 5.1 Objectifs, hypothèses et prédictions

L'objectif global de mon projet de maîtrise est d'évaluer la tolérance thermique de clones diploïdes et triploïdes afin de déterminer si cette dernière explique leur répartition différentielle.

Les objectifs spécifiques sont d'examiner si la tolérance thermique est associée à 1) une plus petite taille cellulaire, 2) une plus petite taille corporelle et 3) une plus grande expression des gènes Hsp70 et de la catalase.

**Hypothèse 1.** Le contenu d'ADN nucléaire plus important des organismes polyploïdes augmente la taille de leurs cellules, ce qui entraîne fréquemment une augmentation de leur taille corporelle.

**Prédiction 1.** Les daphnies polyploïdes présentent des tailles corporelles et cellulaires plus grandes comparativement aux daphnies diploïdes.

**Hypothèse 2.** Les capacités aérobies, plus précisément le transport de l'oxygène, pourraient limiter la gamme de tolérance thermique des organismes. Un décalage entre la demande en oxygène et la capacité de fournir cet oxygène serait le premier mécanisme qui restreint la tolérance thermique des organismes.



**Prédiction 2.** Étant donné le plus petit rapport surface/volume des grosses cellules, il est attendu que des tolérances thermiques plus faibles soient observées chez les daphnies qui ont de plus grosses cellules. Les daphnies polyploïdes devraient donc avoir une tolérance thermique plus faible que les diploïdes et les daphnies élevées à basse température (peu importe leur niveau de ploïdie) devrait également avoir une tolérance thermique restreinte dû à l'effet bien connu de la température sur la taille de cellules des ectothermes.

**Hypothèse 3.** La tolérance thermique élevée, particulièrement lors d'un choc thermique, peut être associée à des régulations à la hausse de protéines chaperones comme les Hsp70 et d'enzymes antioxydantes, par exemple la catalase, qui protègent et conservent l'intégrité des protéines et des cellules de l'organisme.

**Prédiction 3** Les daphnies qui ont une tolérance thermique plus faible présentent une expression diminuée de Hsp70 et de la catalase.

Ces résultats sont importants pour mieux comprendre les causes de la distribution géographique des espèces polyploïdes. Ils permettront également d'évaluer si les clones diploïdes des régions tempérées remplaceront éventuellement les clones triploïdes dans les régions subarctiques et arctiques.

# CHAPITRE 1

## **PLOIDY-RELATED DIFFERENCES IN SIZE AND THERMAL TOLERANCE OF *DAPHNIA TENEBROSA* CLONES**

Sarah-Béatrice Bernier and France Dufresne

Non soumis

Laboratoire de Biologie Évolutive, Département de Biologie, Université du Québec à  
Rimouski,  
300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1

### **Abstract**

Polyploid species exhibit different distribution patterns compared to diploids. Both plant and animal polyploids are often found at higher altitudes and latitudes. We investigated the thermal tolerance of diploid and polyploid clones of the ectotherm *Daphnia tenebrosa*. C<sub>max</sub> values and body size measurements of three-day-old organisms revealed that triploid *Daphnia* have lower thermal tolerance and larger body size than diploids. Despite these results, C<sub>max</sub> was not significantly affected by body size. This could be explained by the lack of size magnitude in the study, as only three-day-old *Daphnia* of both ploidy were used. Our results imply that thermal tolerance could affect the distribution of polyploid organisms.

Keywords: *Daphnia tenebrosa*, geographical parthenogenesis, C<sub>max</sub>, body size, polyploidy.

## **Introduction**

It is generally known that asexual species occupy different niches than their sexual relatives (Bell, 1982; Bierzychudek, 1985; Hörandl, 2006; Schinkel *et al.*, 2016; Vandel, 1928). First identified by Vandel (1928), who coined the term “geographical parthenogenesis”, the cause for this pattern remains controversial. Parthenogenesis is generally associated with polyploidy (Stebbins, 1980) and many polyploid animals are asexuals (reviewed in Comai, 2005; and Otto & Whitton, 2000). Both plant and animal asexuals and polyploids are often found in higher altitudes and latitudes and in harsh environments beyond the ecological limits of their sexual and diploid parents (Brochmann *et al.*, 2004; Kirchheimer *et al.*, 2016; Little *et al.*, 1997; Zhang & Lefcort, 1991). Polyploidy is thought to have a role in geographical parthenogenesis, providing fitness advantages that would enable polyploids and asexuals to adjust in these environments (Bierzychudek, 1985; Lundmark, 2006; Schinkel *et al.*, 2016). This distribution suggests there is some adaptive value or selective advantage of polyploidy in these environments. Studies on polyploid plants suggest that climate, especially temperature, is an important factor in niche differentiation of polyploids (Kirchheimer *et al.*, 2016; Rice *et al.*, 2019). Cold treatments trigger the formation of unreduced gametes and can cause polyploidy in descendants (Otto & Whitton, 2000; Ramsey & Schemske, 1998).

For ectotherms, temperature is a crucial environmental factor, as it affects functional processes at every biological level. High rearing temperature is correlated with decreasing body size, with higher temperature producing smaller-sized ectotherms (Atkinson, 1994). Smaller ectotherms generally show higher thermal tolerance than those larger-sized (Geerts *et al.*, 2014; Geerts *et al.*, 2015; Leiva *et al.*, 2019). Polyploid animals have more genetic material and thus generally possess larger cells than diploids (Cavalier-Smith, 1978), which in turn can increase body size and limit thermal tolerance. This lower thermal tolerance of the larger-sized polyploids could contribute to the geographical parthenogenesis pattern of polyploid organisms.

Members of the species complex *Daphnia pulex* are ideal model organisms to test this hypothesis. Some species of the complex, such as *Daphnia tenebrosa*, have both triploid and diploid clones co-existing in the Canadian subarctic. Studying the effects of polyploidy on *Daphnia* from one sympatric population eliminates environmental biases from geographically isolated polyploid and diploid populations, where both populations are locally adapted to different regions.

This study aims to compare the thermal tolerance of diploid and triploid clones of subarctic *Daphnia tenebrosa* to understand the role of temperature in the distribution of polyploidy. To test the size-dependency of thermal tolerance, we also measure body size.

## **Materials and methods**

### **Animals**

All *D. tenebrosa* clones were sampled from ponds in Churchill, Manitoba (58°47'N, 94°11'W) in July 2018 using Student plankton nets with 150 µm mesh. Eighty-three ponds were sampled in the area near the Churchill rocket range. Sampled organisms were transported from the field to the lab in closed plastic jars inside a cooler without ice for up to three hours. Additional pond water from the field was sampled for *Daphnia* rearing in the lab. Sampling was performed almost everyday for a month, with an average of three ponds sampled per day. After each sampling trip, gravid females *Daphnia* sampled from each pond were isolated and reared in 50 mL of pond water until the release of neonates. The neonates were isolated from their mothers and reared at room temperature in pond water for three days. From each brood, one or two neonate daphnia were preserved in 95% ethanol for subsequent clonal identification using microsatellites analysis while all other neonates were used for C<sub>t</sub>max and size measurements (see below). All *Daphnia* were fed around 0.5 mL of a concentrate of live *Scenedesmus obliquus* daily. All animals were reared and all experiments were performed at room temperature.

### Thermal tolerance measurement

We measured thermal tolerance using the critical thermal maxima (Ctmax), the temperature at which the animal loses motor functions and faints. The method for measuring Ctmax was modified from Geerts *et al.* (2014, 2015). Ctmax on three-day-old daphnia were performed using a thermocycler (Biometra®) with the heating block adapted to fit 48 x 0.5 mL tubes. The Ctmax protocol is fast-ramping, which is characterised by a rapid rise in temperature starting at 20°C and rising one degree per minute. Fast-ramping assays prevent the hardening of animals to high temperatures which can bias the heat tolerance results (Ribeiro *et al.*, 2012). Individual three-day-old daphnia were introduced into 0.5 mL tubes containing pond water using a plastic 7.5 mL transfer pipette and tubes were randomly placed on the thermocycler. A temperature probe measured temperature in real time in the test tubes. The experimental unit was filmed from above with a HD Camera (Fujifilm FinePix HS30EXR), and each Ctmax was scored on video recordings. The Ctmax was determined as the temperature (one decimal) at which the animals stop swimming and sink to the bottom of the tubes. A total of 19 Ctmax runs were performed on the three-day-old daphnia in 20 days.

### Size measurement

The total length of each daphnia was measured after the Ctmax measurements, using a binocular at 16X equipped with a digital camera A35100U3 (OMAX). The length was measured with ToupView software (OMAX, v.3.7). The total length was measured from the base of the tailspine to the top of the compound eye.

### Clonal identification

Total DNA was extracted using 50µL QuickExtract™ (Epicentre Biotechnologies) for individual daphnia, as in Dionne *et al.* (2011). Four microsatellite loci were used to obtain clonal identification: DPU6, DPU30, DPU183 and DPU502 (Colbourne *et al.*, 2004). The microsatellite DPU124 was used to differentiate between *D. tenebrosa* and *Daphnia*

*pulex* samples, as only *D. tenebrosa* shows a peak on this microsatellite. DNA was amplified in total reaction volumes of 10  $\mu$ L with 2.5X reaction buffer with  $MgSO_4$  (New England BioLabs), 0.25mM of dNTP, 0.1  $\mu$ M of the forward primer, 0.2  $\mu$ M of the reverse primer, 1 U of *Taq* polymerase (Sigma Aldrich), 50-100ng DNA and 0.2  $\mu$ M of M13 fluorescent label, either HEX or FAM (Alpha DNA). A touchdown PCR protocol was used to amplify the markers, with the first annealing temperature of 55°C dropping one degree every cycle until the last annealing temperature of 50°C. Amplifications were performed in these cycling conditions: one minute of denaturing step followed by 45 sec incubation at 94°C, annealing at the right temperature for 55 sec and extension for 60 sec at 72°C. This cycle was repeated twice with each annealing temperature. A final extension of 10 minutes at 72°C completed the PCR. The products were verified on 3% agarose gel and sent to Genome Quebec at McGill University (Montréal, Canada) for microsatellites analyses with a fluorescent scanner. We used PeakScanner™ Software (v.1.0, ThermoFisher) to score alleles (Table 1). Incomplete genotypes of *D. tenebrosa* and *D. pulex* genotypes had their  $C_{tmax}$  and size measurements discarded from this study.

Table 1: Genotypes and ploidy level of *D.tenebrosa* clones used in this experiment

Clone	Ploidy level	Dpu6	Dpu30	Dpu124	Dpu183	Dpu502
A	Triploid	150150	165165	124124	113119	122128130
B	Triploid	144148	163167169	124124	111113	122130
C	Triploid	150150	163165	124124	111113115	122130
D	Triploid	150150	163165	124124	111113115	130130
E	Diploid	150150	165165	124124	113119	128130
F	Triploid	146146	165165	124124	111113119	118120122
G	Diploid	150150	165165	124124	113119	122130
H	Triploid	150150	163165	124124	111113115	122122
I	Diploid	160160	165165	124124	117117	130130
J	Triploid	150150	163165	124124	111113115	118122130
K	Diploid	150150	165165	124124	113113	122130
L	Diploid	160160	165165	124124	117117	122130
M	Triploid	144144	165165	124124	111113119	118122
N	Diploid	150160	163165	124124	117119	130130
O	Diploid	150150	165165	124124	113119	122122
P	Diploid	150160	163165	124124	117119	128130

### Statistical analyses

We tested for the effect of ploidy (categorical; diploid and triploid) on the two response variables C<sub>tmax</sub> and body size using two linear-mixed effect models. We tested the relationship between body size and C<sub>tmax</sub> with another linear-mixed effect model, using body size as a covariate of ploidy. We integrated the clone as a random effect in all models. Marginal and conditional R<sup>2</sup> were calculated using the package “MuMIn” (Barton, 2018), and the slopes were integrated as a random effect. All statistical analyses were performed in R 3.5.1 (R Core Team, 2018) using the package “lmerTest” (Kuznetsova *et al.*, 2017). Model



assumptions were checked visually with residuals vs fitted values, histograms of residuals and Q-Q plot.

## **Results**

We identified 16 different *D. tenebrosa* clones. Half of those are triploid and the other half are diploid. A total of 104 C<sub>tmax</sub> measurement of three-day-old *D. tenebrosa* were scored, with 38 C<sub>tmax</sub> measurements for diploids and 66 for triploids. The design is unbalanced towards triploids, as ploidy and genotype were only discovered after C<sub>tmax</sub> and size measurements.

Body size was significantly different between the two ploidy levels of *D. tenebrosa*, with triploid daphnia being larger than diploids ( $F_{1;14.02}=13.96$ ;  $p < 0.001$ ). Diploid daphnia had a higher thermal tolerance, measured as C<sub>tmax</sub>, than triploids ( $F_{1;15.51}=6.92$ ;  $p=0.019$ ). Visually, body size seems to affect C<sub>tmax</sub> (Figure 2) but statistically, no significant relationship was found between C<sub>tmax</sub> and body size ( $F_{1;86.75}=0.15$ ;  $p=0.701$ ).

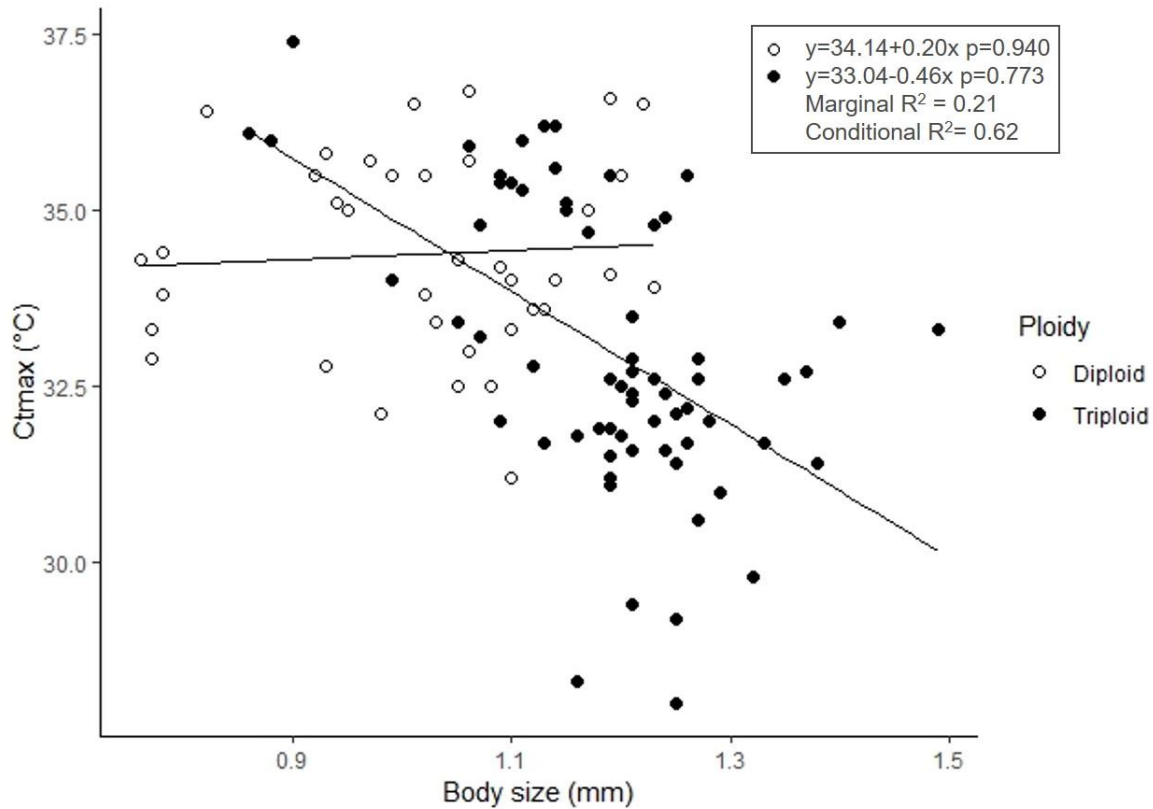


Figure 2. C<sub>tmx</sub> plotted against body size for all 16 diploid (open symbols, n=38) and triploid (filled symbols, n=66) *Daphnia tenebrosa* clones. Regression lines based on the slope of the mixed models are shown for both ploidy levels

### Discussion and conclusion

Polyploidy has pronounced effects in the biology and evolution of organisms (Otto, 2007). Extra sets of chromosomes change the number of alleles, gene expression, reproduction and size of organisms (Oberprieler *et al.*, 2019; Otto & Whitton, 2000; Paquin & Adams, 1983). Polyploidy also affects geographical distribution, with polyploids often being more frequent in higher latitudes. Understanding the mechanisms driving this pattern could provide insights into how geographical distributions could shift with increasing temperatures in the current global change we are experiencing.

Our results confirm that polyploid *D. tenebrosa* are larger than diploids at the same age and they exhibit lower thermal tolerance. To our knowledge, this is the first study showing that polyploidy influences thermal tolerance (directly measured by the  $C_{tmax}$ ) in *Daphnia*. These results imply that thermal tolerance can contribute to the geographical patterns of polyploid species, as lower thermal tolerance could confine them to colder, higher latitudes.

Studies contrasting  $C_{tmax}$  for organisms of different ploidy levels are scarce. Ellis *et al.* (2013) found that polyploid brook trout had a lower  $C_{tmax}$  than diploids, but only under hypoxic conditions beyond experienced during thermal challenge. By contrast, Bowden *et al.* (2018) found no differences of  $C_{tmax}$  for salmon of different ploidy levels. Other studies measured the mortality of thermally challenged trout species and found differences according to ploidy levels, with triploids having higher mortality (Altimiras *et al.*, 2002; Ojolic *et al.*, 1995).

Even though polyploid *D. tenebrosa* are larger than diploids and exhibit lower thermal tolerance, it is not possible to link thermal tolerance to size in this study. Visually, body size seems to affect  $C_{tmax}$  overall, and we could hypothesize that our sample size was too limited to provide a significant relationship between the two. While polyploidy tends to increase body size, size at maturity is usually measured (Dufresne & Hebert, 1998) as opposed to the size at three days old. Adding mature organisms would provide a large order of magnitude for body size and perhaps exacerbate differences in size for both ploidy levels. Adding more diploid  $C_{tmax}$  measurements to obtain a balanced design between ploidy levels might also increase size magnitude in this experiment. Thermal tolerance could become size-dependent with a large range of sizes, as seen in recent studies (Leiva *et al.*, 2019; Verbeck *et al.*, 2013). Cell size should also be investigated in relation to thermal tolerance, as polyploidy usually increases cell size (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001).

It is still not clear if polyploid *Daphnia* are confined to higher latitudes because of lower thermal tolerance alone or if they are truly adapted to cold environments. Life-history traits suggest they are. Triploid *Daphnia* matured earlier than diploids at low temperature, while it was the opposite at high temperature (Dufresne & Hebert, 1998). Two other studies found greater cold tolerance of polyploid *Poeciliopsis* and *Artemia* compared to diploids (Schultz, 1982; Zhang & Lefcort, 1991), but the *Artemia* polyploid was also more tolerant to high temperature. Comparison of Ctmin (critical thermal minimum) between polyploid and diploid *Daphnia* is required to test this cold-adapted hypothesis.



## **CHAPITRE 2**

### **DOES SIZE MATTER? EVIDENCE OF SIZE-MEDIATED THERMAL TOLERANCE IN A POLYPLOID ECOTHERM.**

Sarah-Béatrice Bernier and France Dufresne

Non soumis

Laboratoire de Biologie Évolutive, Département de Biologie, Université du Québec à  
Rimouski,  
300 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada G5L 3A1

### Abstract

It is well known that the frequencies of polyploid increase with latitude in different plant and animal taxa. Here, we test the hypothesis that the geographic distribution of polyploidy is linked to thermal tolerance. We measured Ctmax (critical thermal maximum) in 17 triploid and diploid clones of the water flea *Daphnia pulex* in a common garden experiment at three temperatures (16°C, 20°C and 24°C). We also assessed body size, cell size and expression levels of Hsp70 and catalase to identify the mechanisms of thermal tolerance. Triploids *Daphnia* had lower thermal tolerance and larger cells than diploids. Cell size decreased with acclimation temperature for both ploidy levels. Body size was not affected by acclimation temperature nor ploidy level. Expression of Hsp70 and catalase did not differ between diploid and polyploid clones and was not correlated with Ctmax. Our results suggest that thermal tolerance could contribute to the distribution of polyploids organisms via cell size.

Keywords: *Daphnia pulex*, geographical parthenogenesis, polyploidy, body size, cell size, Ctmax, Hsp70, catalase, heat shock

## **Introduction**

The term geographical parthenogenesis designates the widely known distribution pattern of asexual organisms, in contrast to their sexual relatives (Vandel, 1928). Asexuals are frequently reported in disturbed habitats, higher altitudes and latitudes (Bell, 1982; Bierzychudek, 1985; reviewed in Hörandl, 2006). This distribution pattern is often found in many polyploid species (Beaton & Hebert, 1989; Martin & Husband, 2009; Schinkel *et al.*, 2016), since parthenogenesis is generally associated with polyploidy (Stebbins, 1980) and many polyploid animals are asexuals (reviewed in Comai, 2005; and Otto & Whitton, 2000). Both plants and animals display this geographical pattern (reviewed in Gregory & Mable, 2005; and Rice *et al.*, 2019), suggesting that polyploidy or ploidy-dependent factors provide advantages at high latitudes.

This pattern remains poorly understood despite the fact that there are many hypotheses that attempt to explain it. Adaptation to harsher, northern climates was one of the first proposed hypothesis to explain the phenomenon (Hagerup, 1931). Some authors suggested polyploidy was involved in geographical parthenogenesis (Lundmark, 2006; Vandel, 1940). Similarly, Bierzychudek (1985) suggested the inherent advantages of polyploidy as a possible explanation for geographical parthenogenesis. Some authors proposed the hybrid origin of many polyploids as a potential cause for this pattern, since genetic variability of hybrids could confer a selective advantage by providing greater tolerance to environmental factors in harsh regions (Kearney, 2005; Löve & Löve, 1957; Manton, 1950). Whole genome duplication associated with polyploidy is suspected to provide higher heterozygosity, higher genetic diversity and genome flexibility, induce genome rearrangement and differential gene expression, which could all explain the success of polyploid lineages in certain habitats (Osborn *et al.*, 2003; Parisod *et al.*, 2010; Soltis & Soltis, 2020; te Beest *et al.*, 2012). Life-history traits could affect distributional ranges of polyploids. Some polyploid species display different life-history traits compared to their diploids relatives (plants: Barringer, 2007; daphnia: Dufresne & Hebert, 1998; freshwater



snail: Larkin *et al.*, 2016; salamanders: Licht & Bogart, 1989). Differences in life-history traits between diploid and polyploidy could be caused by nucleotypic effects (defined by Bennett (1971) as conditions of the nucleus that impacts phenotype), as polyploid usually have larger cells, are larger than and reach maturity later than diploids (Dufresne & Hebert, 1998; Licht & Bogart, 1989; reviewed in Otto & Whitton, 2000). This could allow polyploids to survive, establish and propagate faster in different environments. Finally, Haag and Ebert (2004) suggested that geographical parthenogenesis may be the result of multiple factors, including genetic bottleneck, genetic drift and hybridization. While all the mutually non-exclusive proposed hypotheses provide elements that could explain geographical parthenogenesis, no consensus has been reached so far.

Studies on plants suggests that climate or temperature could be contributing factors to the geographic polyploidy pattern. Cold treatment can form unreduced pollen and cause polyploidy (Belling, 1925; De Storme *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2011). Studies on various European alpine plants show polyploids inhabit cooler thermal niches (Kirchheimer *et al.*, 2016; Schinkel *et al.*, 2016; Theodoridis *et al.*, 2013). In animals, studies investigating geographic polyploidy have shown that distribution of polyploids is associated with rainfall (Kearney *et al.*, 2003). However, the effect of temperature has yet to be directly tested in the context of geographic polyploidy in animals.

Temperature is a major environmental factor for ectotherms, affecting their metabolic rate, performance, processes and traits such as body size (Angiletta & Angiletta Jr, 2009; Atkinson, 1994). Body size generally affects thermal tolerance in ectotherms, as smaller ectotherms tolerate high temperatures better than large ectotherms (Geerts *et al.*, 2014; Geerts *et al.*, 2015; Leiva *et al.*, 2019). The link between body size and thermal tolerance in ectotherms indicates that the mechanism limiting thermal tolerance should be size-dependent.

Some authors suggested aerobic capacity as the mechanism setting thermal tolerance limits. This oxygen limitation hypothesis states that aerobic capacity is the first process to be limited by temperature (Chapelle & Peck, 1999; Forster *et al.*, 2012; Pörtner, 2001, 2002; Pörtner & Knust, 2007; Verbeck *et al.*, 2011). High temperatures increase metabolic demands for oxygen faster than diffusion rate and delivery capacity (Frazier *et al.*, 2001). In larger ectotherms, with larger cells, these oxygen delivery limits occur at lower temperature (Pörtner, 2004). Oxygen diffusion is restrained in large cells because of the lower surface to volume ratio, whereas smaller cells reduce diffusion distance (Czarnoleski *et al.*, 2014; Woods, 1999). Consequently, small cells can increase thermal tolerance (Pörtner, 2004) and smaller sizes are favored at high temperatures (Daufresne *et al.*, 2009; Malerba & Marshall, 2019).

Size responses to temperature are especially relevant for polyploids. Cell size increase with ploidy (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001). The larger cell sizes of polyploids could be a disadvantage at high temperatures in comparison to diploids because their larger cells could limit oxygen diffusion and lower their thermal tolerance. This could potentially explain their absence from temperate regions where temperatures are higher.

Thermal tolerance could also be mediated by intra-cellular traits rather than whole-organism traits such as body size, or both traits could be connected (Chown *et al.*, 2010). Since thermal tolerance limits could be set by oxygen diffusion, those cellular traits could relate to oxidative stress. In ectotherms, thermal stress generally induce protein damage and oxidative stress through production of reactive oxygen species (ROS) (Christen *et al.*, 2018; Klumpen *et al.*, 2017). Physiological acclimation to high temperatures includes up-regulating heat-shock proteins (Hsp) to limit protein denaturation (Richter *et al.*, 2010), and antioxidant pathways (Lushchak, 2011). The most studied family of Hsps is the Hsp70, expressed both constitutively and during heat-shock (Feder, 1999). Hsp70 expression during heat-shock can be heritable, can differ between populations and treatments and can be associated with thermal tolerance (Lardies *et al.*, 2014; Madeira *et al.*, 2012; Tedeschi *et al.*, 2016). This

indicates that Hsp70 expression has an adaptive potential for heat tolerance in ectotherms. Antioxidant enzymes, such as the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger catalase (CAT), are essential to limit ROS accumulation during thermal or oxidative stress (Davies, 2000; Di Giulio *et al.*, 1989; Storey, 1996). Catalase activity or expression is generally up-regulated during thermal stress (Brans *et al.*, 2018; Klumpen *et al.*, 2017). There is evidence that larger cells could accumulate ROS at a greater rate than smaller cells (Malerba & Marshall, 2019; Suzuki & Mittler, 2006). In high temperatures causing oxidative stress, polyploids would be disadvantaged compared to diploids.

In this study, we examined thermal tolerance in diploid and polyploid *Daphnia pulex*. Geographical parthenogenesis has been described in *D. pulex* (Beaton & Hebert, 1988). Body size, cell size and expression of Hsp70 and catalase were measured to help identify key factors underlying thermal tolerance. We measured the critical thermal maximum (Ct<sub>max</sub>), a broadly accepted measure of thermal tolerance in animals (Huey *et al.*, 1992; Jørgensen *et al.*, 2019). To test whether rearing temperature affect thermal tolerance and body and/or cell sizes, we reared our *Daphnia* clones at three temperatures: 16°C, 20°C and 24°C.

We hypothesized that triploid *Daphnia* have larger cells than diploid *Daphnia* and that cell size will be negatively correlated with rearing temperatures. Considering the link between oxygen transport capacity, cell size and thermal tolerance, we expect thermal tolerance to correlate with body and cell size. Consequently, we also expect triploid *Daphnia* to have lower thermal tolerance due to their larger body and cell sizes.

## **Materials and methods**

### **Animals**

We reared 17 *D. pulex* clones from temperate and subarctic North American climatic regions (Table 2). Five clones were sampled and isolated from Churchill (Manitoba, Canada)

in July 2018 while all other clones had been previously sampled and kept in controlled conditions in the lab for several generations. Two other clones were from the subarctic regions of Kuujjuarapik (Quebec, Canada) and the rest was from temperate climates: Sainte-Luce (Quebec, Canada), Bolton-Ouest (Quebec, Canada), Urbana (Illinois, USA), Webster (Indiana, USA), Danville (Illinois, USA) and Homer (Illinois, USA).

Table 2. Clone name, ploidy level, climatic zone of origin and sampling location of all 17 clones used in this experiment

<b>Clone name</b>	<b>Ploidy level</b>	<b>Climatic zone</b>	<b>Location</b>
<b>C145-01</b>	Triploid	Subarctic	Churchill, Manitoba, Canada
<b>A38-10</b>	Triploid	Subarctic	Churchill, Manitoba, Canada
<b>A5-7m</b>	Triploid	Subarctic	Churchill, Manitoba, Canada
<b>IQ12</b>	Triploid	Subarctic	Churchill, Manitoba, Canada
<b>R202</b>	Triploid	Subarctic	Kuujjuarapik, Québec, Canada
<b>R210</b>	Diploid	Subarctic	Kuujjuarapik, Québec, Canada
<b>R206</b>	Diploid	Subarctic	Kuujjuarapik, Québec, Canada
<b>B104-05</b>	Diploid	Subarctic	Churchill, Manitoba, Canada
<b>A06-06</b>	Diploid	Subarctic	Churchill, Manitoba, Canada
<b>WP2</b>	Diploid	Subarctic	Kuujjuarapik, Québec, Canada
<b>Bus15</b>	Diploid	Temperate	Urbana, Illinois, USA
<b>Bus79</b>	Diploid	Temperate	Urbana, Illinois, USA
<b>NFL68</b>	Diploid	Temperate	Webster, Indiana, USA
<b>SPS100</b>	Diploid	Temperate	Homer, Illinois, USA
<b>KAP-53</b>	Diploid	Temperate	Danville, Illinois, USA
<b>Ste-Luce</b>	Diploid	Temperate	Sainte-Luce, Québec, Canada
<b>Stukely</b>	Diploid	Temperate	Bolton-Ouest, Québec, Canada

### Clonal identification

To obtain clonal identification, five individuals from each population were isolated at the same time and reared until the first brood. The neonates from each isolated female were kept in mason jars for rearing (see below) and the mother was used for DNA extraction. Total DNA was obtained using 50µL QuickExtract™ (Epicentre Biotechnologies) for individual

*Daphnia*, as in Dionne *et al.* (2011). Four microsatellite loci were used to obtain clonal identification: DPU6, DPU30, DPU183 and DPU502 (Colbourne *et al.*, 2004). For each microsatellite, the total reaction volumes of 10  $\mu$ L with 2.5X reaction buffer with  $MgSO_4$  (New England BioLabs), 0.25mM of dNTP, 0.1  $\mu$ M of the forward primer, 0.2  $\mu$ M of the reverse primer, 1 U of *Taq* polymerase (Sigma Aldrich), 50-100ng DNA and 0.2  $\mu$ M of M13 fluorescent label, either HEX or FAM (Alpha DNA). A touchdown PCR protocol was used to amplify the markers, with the first annealing temperature of 55°C dropping one degree every cycle until the last annealing temperature of 50°C. Cycling conditions were one minute of denaturing step followed by 45 sec incubation at 94°C, annealing at the right temperature for 55 sec and extension for 60 sec at 72°C. This cycle was repeated twice with each annealing temperature. A final extension of 10 minutes at 72°C completed the amplification. Verification of the products on 3% agarose gel were done before being sent to Genome Quebec at McGill University (Montréal, Canada) for microsatellites analysis. We used PeakScanner™ Software (v.1.0, ThermoFisher) to score alleles.

We amplified the ND5 (NADH dehydrogenase subunit 5) mitochondrial gene to obtain mitochondrial lineage using DpuND5a (5'-ATAAACTCCAATCAACCTTG-3') as forward primer and DpuND5b (5'-GGGGTGTATCTATTAATTCG-3') as reverse primer (Vergilino *et al.*, 2009). PCR were performed in a final volume of 25 $\mu$ L with 1X reaction buffer with  $MgSO_4$  (New England BioLabs), 0.2 mM of dNTP, 3 mM of  $MgCl_2$ , 0.4  $\mu$ M of each primer and 1.5 U of *Taq* polymerase (Sigma Aldrich) and 50-100ng DNA template. Amplification of the ND5 genes were performed as follow: three minutes of initial denaturation at 94°C followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for one minute, annealing at 50°C for one minute and extension at 72°C for 2 minutes. A final extension of 15 minutes at 72°C completed the PCR. The products were verified on 2% agarose gel and sent to Genome Québec at McGill University (Montréal, Canada) for sequencing. A maximum-likelihood analysis was performed using MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) to obtain a phylogenetic tree and identify the clonal lineages (Figure 3).

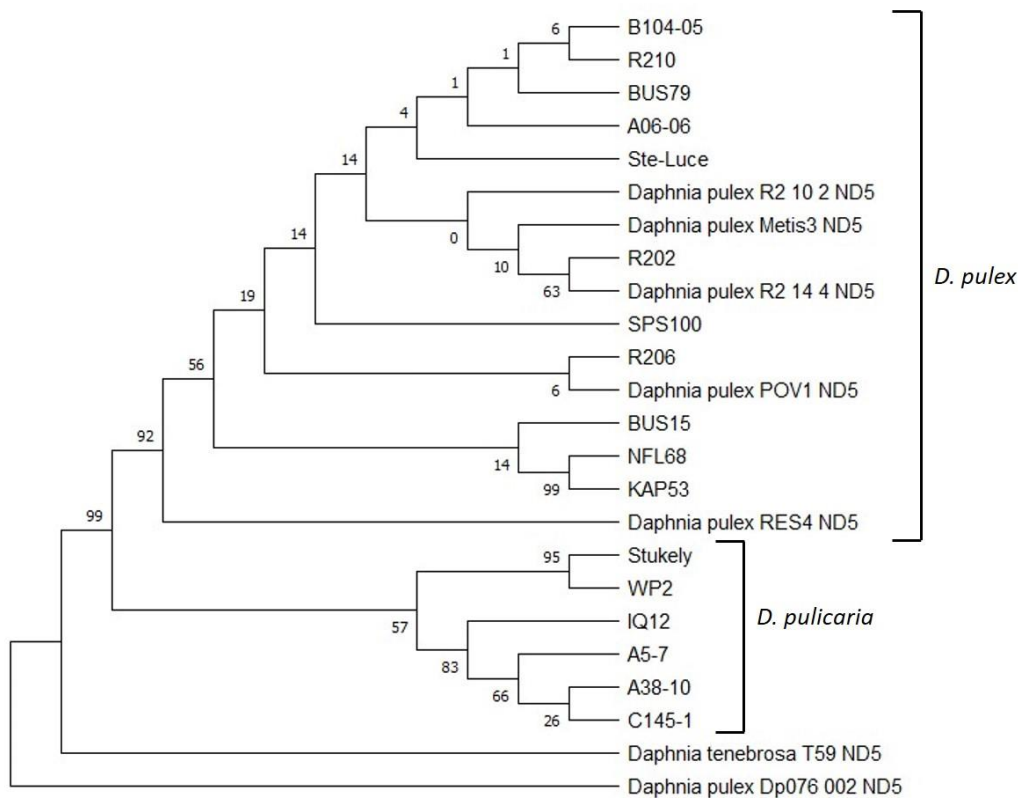


Figure 3. Maximum-likelihood reconstruction of the phylogenetic relationships between each clone used in this experiment based on mitochondrial gene ND5. Distances are shown for each branch. The tree is rooted through European *D. pulex*. All added *Daphnia* sequences (*Daphnia pulex* R2 10 2 ND5, *Daphnia pulex* Metis3 ND5, *Daphnia pulex* R2 14 4 ND5, *Daphnia pulex* POV1 ND5, *Daphnia pulex* RES4 ND5, *Daphnia tenebrosa* T59 ND5 and *Daphnia pulex* Dp076 002) are available in Genbank

### Ploidy level

The ploidy level of each clone was determined with genome size measurements in flow cytometry from a protocol adapted from Vergilino *et al.* (2009). We used a solution of isolated human white blood cells as standard. Two *Daphnia* of each clone were separately ground in a Kontes® Dounce glass tissue grinder using the “loose” pestle in 500  $\mu$ L modified Galbraith buffer (Bennett *et al.*, 2003; Galbraith *et al.*, 1983). The homogenate was filtered

through a 40  $\mu\text{m}$  mesh before adding 25  $\mu\text{L}$  of isolated human white blood cells solution and 25  $\mu\text{L}$  of propidium iodide (50 p.p.m., Sigma-Aldrich). Cell suspensions were kept 15 minutes in the dark at room temperature before measurements. Genome size was determined in an Epics Altra flow cytometer (Beckman-Coulter) with an argon laser emitting 14 mW of light at 488 nm. Fluorescent emissions were measured at 600-640 nm. An internal standard of 2  $\mu\text{L}$  of red fluorescent glass beads (Invitrogen) were added to each sample. Ploidy levels were calculated as :

$$\text{Ploidy} = \frac{\text{Sample fluorescence}}{\text{White blood cells fluorescence}} \times 7.0 \text{ pg}$$

where 7.0 pg corresponds to diploid human genome size (Tiersch *et al.*, 1989).

For *D. pulex*, 1 C is equivalent of 0.23 pg, where C is the amount of DNA in a haploid chromosome (Rasch, 1985). Since a value equal or lower than 2.5 C is considered diploid (Beaton & Hebert, 1988), all pg values equal to or less than 0.6 pg were considered diploids and clones with higher pg values were considered polyploids.

### Rearing

We reared each clone for at least three generations in standardized laboratory conditions prior to the experiments. Each generation was started from the second or third brood. *Daphnia* were raised in three environmental test chambers (Sanyo MLR-351H) at three temperatures: 16°C, 20°C and 24°C with a 12:12 photoperiod and 3000 lux of lighting. *Daphnia* were raised in 300 mL of FLAMES culture medium (Celis-Salgado *et al.*, 2008) and fed  $2.0 \times 10^5$  cells/mL of live *Raphidocelis subcapitata* (formely known as *Pseudokirchneriella subcapitata* or *Selenastrum capricornotum*) three times a week. A third of the culture medium was renewed every two weeks.

### Thermal tolerance

Thermal tolerance was assessed with the C<sub>tmax</sub> measurement (critical thermal maxima) which corresponds to the temperature at which an animal loses motor functions and faints (Huey *et al.*, 1992). C<sub>tmax</sub> were performed on non-gravid female *Daphnia* of various sizes. *Daphnia* cultures were checked every day for non-gravid adult *Daphnia*. When *Daphnia* cultures had non-gravid adults, they were put aside and individuals were randomly used for C<sub>tmax</sub> measurements until 10-15 measurements were performed for each clone at each rearing temperature. The method for measuring C<sub>tmax</sub> was modified from Geerts *et al.* (2014, 2015). C<sub>tmax</sub> were performed using a thermocycler (Biometra®) with the heating block adapted to fit 48 x 0.5 mL tubes. Individual *Daphnia* are placed in 0.5 mL tubes containing a solution of 0.75 mg/mL bovine serum albumin in FLAMES culture medium at the rearing temperature. The bovine serum albumin decreased the surface tension to keep individual adult *Daphnia* out of the surface film so they were exposed to the heating temperature. Tubes were randomly placed in the thermocycler. The C<sub>tmax</sub> protocol was fast-ramping, with temperature rising one degree per minute from the rearing temperature until 45°C. Each run was performed using *Daphnia* from the same rearing temperature. To measure the heating in real time, a temperature probe was placed in a tube containing only the solution. The design was filmed using an HD Camera (Fujifilm FinePix HS30EXR) to keep video recordings of each run (Figure 4). C<sub>tmax</sub> of individual *Daphnia* was scored watching these video recordings on a video editor software (Movavi Video Editor 14). Even though the thermocycler could fit 48 tubes, a maximum of 25 *Daphnia* could have their C<sub>tmax</sub> scored in each run because of the camera's focus and zoom. The C<sub>tmax</sub> was determined as the temperature (one decimal) at which the animals stopped swimming and sank to the bottom of the tubes.



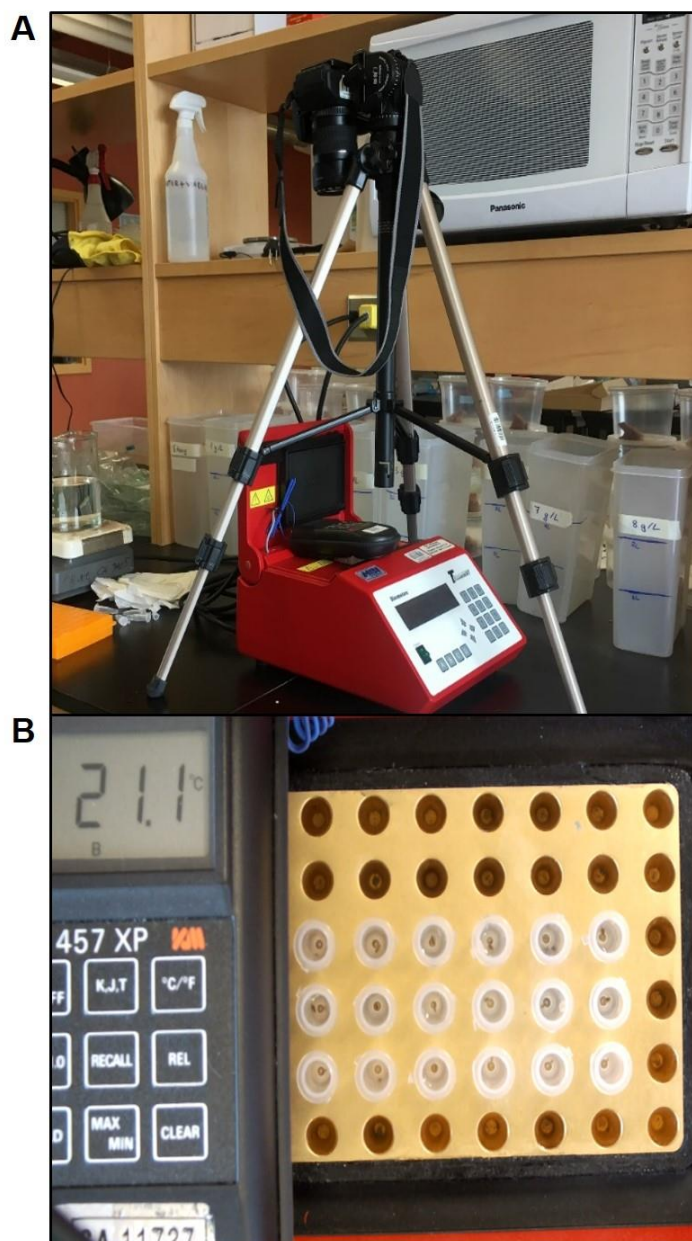


Figure 4 : Ctmax setting with the thermocycler, temperature probe and video camera (A). Recordings show temperature and individual *Daphnia* swimming in 0.5 mL tubes installed on the thermocycler's heating block (B).

### Size measurements

After  $C_{tmax}$ , body and cell sizes of individual *Daphnia* were measured using a microscope with a digital microscope camera A35100U3 (OMAX) using ToupView software (OMAX, v.3.7). Total length of *Daphnia* was measured at 2,5X from the top of the compound eye to the base of the caudal spine. Cell sizes were obtained using modified protocols of Warren (1903) and Omilian (2006). Briefly, individual *Daphnia* were placed under microscope at 10X and residual water was withdrawn with a transfer pipette and a wipe. Diamond-shaped prints on *Daphnia*'s carapace (Figure 5) were used as proxy of epidermal cell size under the carapace (Halcrow, 1978; Omilian, 2006; Warren, 1903). While no staining was performed in this study, a single nucleus is shown in each diamond-shaped print on the shell following nuclei staining, which confirms the prints as a valid proxy of epidermal cells (Figure 5D).

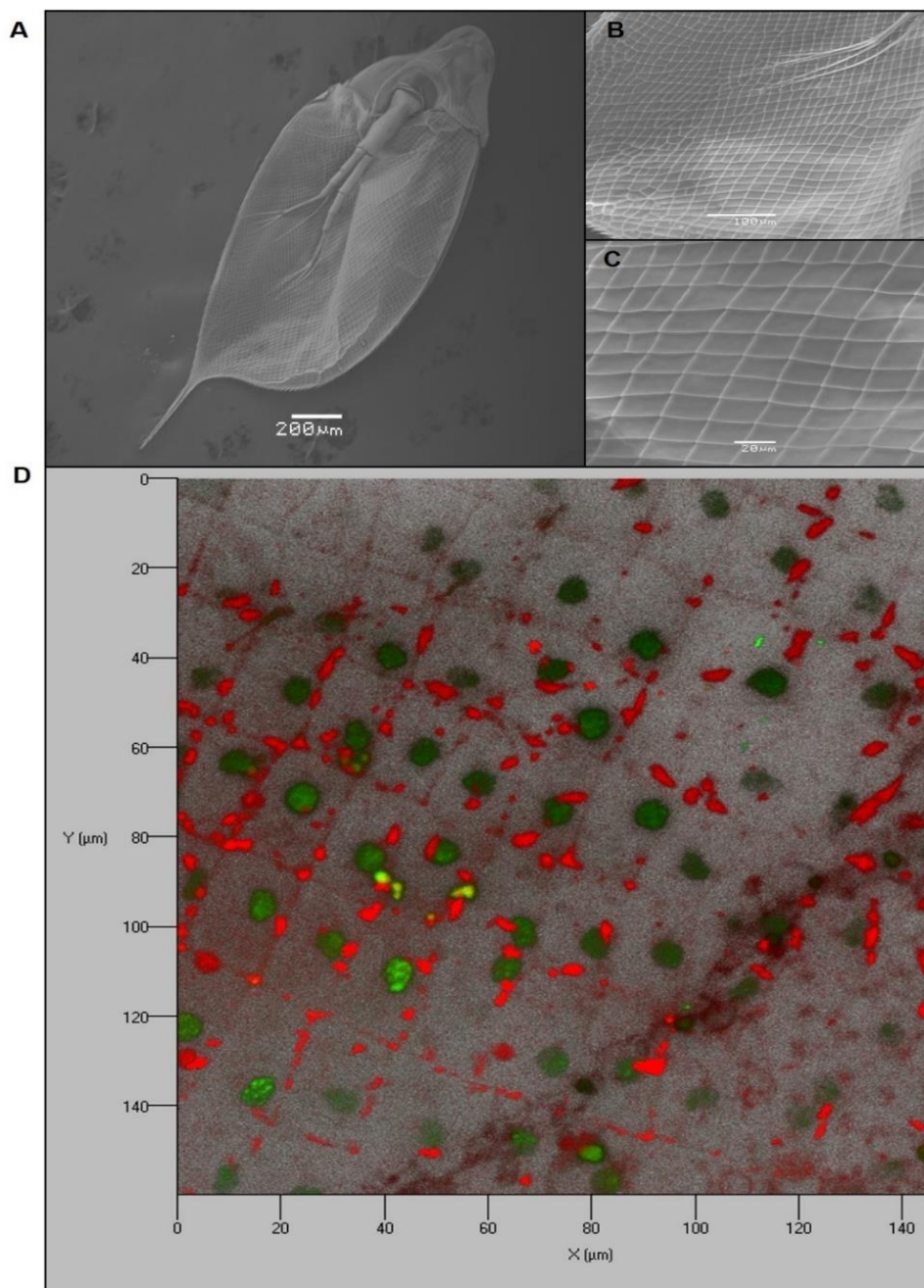


Figure 5. Scanning electron microscope images of *D. pulex* with diamond shaped-prints on the shell (A, B, C) and laser scanning microscope images showing the presence of one nucleus in each print (D). In (D), membranes were stained with Nile Red and nuclei with SYBR Green I following permeabilization in ethanol 70%. Pictures taken by Claude Belzile (ISMER-UQAR) on a JEOL 6460LV scanning electron microscope and a Carl Zeiss LSM700 confocal laser scanning microscope

In *Daphnia*, cell imprints found at the base of the caudal spine, near the labrum and directly at the margin of the shell differ in pattern and have high levels of endopolyploidy (somatic polyploid cells) (Beaton & Hebert, 1989). To avoid endopolyploid cells, the prints measured were those of the anterior region of the ventral margin. Only regular sized and shaped prints were considered. The mean vertical length of ten regular shaped prints was used as a cell size proxy for each *Daphnia* (Figure 6).

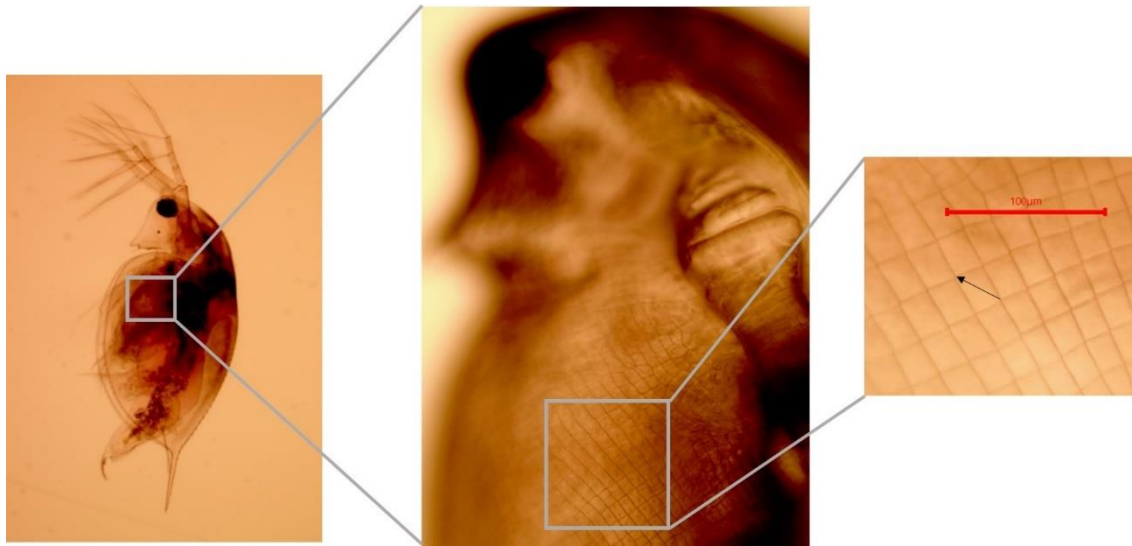


Figure 6. Cells were measured in the anterior region of the ventral margin of the carapace. Scale bar shown in red is 100  $\mu\text{m}$  in length. The direction of cell measurement is displayed by the black arrow

### Heat shock experiment

To induce the expression of Hsp70 and catalase, gravid *Daphnia* were individually placed in 10 mL tubes filled with FLAMES medium and heat-shocked in a 30°C water bath for an hour. We used three replicates of five individual gravid *Daphnia* for each clone. An untreated control group comprised of gravid *Daphnia* unexposed to the heat shock was included to measure the basal expression levels of Hsp70 and catalase. All samples were flash-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until RNA extraction (see below). For the heat shock experiment, we used only clones reared at 20°C.

### RNA extraction and RT-qPCR

RNA was extracted following modified protocols from Lopez and Bohuski (2007) and Escobar and Hunt (2017). Each replicate of five gravid flash-frozen *Daphnia* were grinded with a plastic pestle in 500  $\mu$ L Trizol® Reagent (Thermo Fischer) with an additional 500  $\mu$ L used to rinse the pestle. To separate RNA in an aqueous phase, 200  $\mu$ L of chloroform were added and the mixture was centrifuged at 11 600 x g for 15 minutes. A half-volume of ethanol 100% was added to the isolated aqueous phase. The mixture was placed in a silica column and centrifuged at 8000 x g for 30 seconds. The column was washed once with 600  $\mu$ L of Buffer B and twice with 500  $\mu$ L Buffer C (Escobar & Hunt, 2017) at 8000 x g for 30 seconds with the flow-trough discarded each time. The column was then dried at 8000 x g for 2 minutes. RNA was eluted in 30  $\mu$ L RNase-free water at 8000 x g for 30 seconds. Total RNA was quantified using Nanovue Plus (Biochrom). Following extraction, RNA was treated with DNase I (Thermo Fischer, #EN0525) by adding 1  $\mu$ L of RNA to 1  $\mu$ L of 10X reaction buffer with 1  $\mu$ L DNase. The reaction volume was adjusted to 10  $\mu$ L with DEPC-treated water before incubation at 37°C for 30 minutes. After incubation, 1  $\mu$ L of EDTA 50 mM is added to the mix and incubated once more at 65°C for 10 minutes. To obtain cDNA, DNase-treated RNA was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, cat:436614) with MultiScribe™ Reverse Transcriptase and 10X RT random primers without RNase inhibitor following the manufacturers instructions.

Quantitative real-time PCR was performed on a LightCycler 480 (Roche) using the SensiFAST™ SYBR® No-ROX mix (98020, Bioline) in the following conditions: 95°C for 10 min and 45 cycles of 95°C for 10 sec, 60°C for 10 sec, 72°C for 10 sec. Total reaction volume was 15  $\mu$ L. Target genes used were Hsp70 (forward: 5'-TGATGCCAAGCGTCTTATTG-3' ; reverse: 5'-CGGCAACCTCCTTCATTTTA-3') and catalase (forward: 5'-TCTCTTCGACCGGAAACAAC-3' ; reverse: 5'-GCCCCGATCTAAATTACGAA-3'). Target gene expressions were normalized to two reference genes: Stx16 (forward: 5'-CCTGCCACAATTGCATAAAA-3'; reverse:

5'-AACGTTCCCTCGCGTGATTTA-3') and CAPON (forward: 5'-GCACAACCATCAACATCTGG-3'; reverse: 5'-CCATTTTCATCGCGAATTTCT-3'). All primers were designed on Primer3 (v. 4.0.0) (Untergasser *et al.*, 2012). Mean normalized fold change of target gene expression between heat-shocked and untreated individuals were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method described in Livak and Schmittgen (2001), where  $\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ target} - C_T \text{ reference genes})_{\text{Treatment}} - (C_T \text{ target} - C_T \text{ reference genes})_{\text{Control}}$ . Technical duplicates were included to test the quality of manipulations and pipetting errors. A thorough analysis of the calculations are available in Supplementary Materials (Table 3).

### Statistical analyses

A total of 702 individual *Daphnia* were used for thermal tolerance measures, body size and cell size. We tested for the effect of ploidy (categorical; diploid and triploid), acclimation temperature (16°C, 20°C and 24°C) and climatic zone (temperate and subarctic) on thermal tolerance, body size and cell size using linear-mixed models. The effect of heat shock treatment and ploidy level on the normalized mean fold change expression of catalase and Hsp70 was also tested in a linear-mixed model. Clone nested in climatic zone was integrated as a random effect in all models. For regressions, marginal and conditional  $R^2$  were calculated using the package “MuMIn” (Barton, 2018), and the slopes were integrated as a random effect. All statistical analyses were performed in R 3.5.1 (R Core Team, 2018) using the package “lmerTest” (Kuznetsova *et al.*, 2017). We checked the model assumptions visually using residuals vs fitted values, Q-Q plot and histograms of residuals. Tukey *post-hoc* tests were performed using the package “emmeans” (Lenth, 2018).

## Results

### Critical thermal maximum (Ctmax)

Ploidy had a significant effect on thermal tolerance ( $F_{1, 11.66}=5.234$ ,  $p=0.042$ ) (Figure 7). There was a significant interaction between acclimation temperature and ploidy level ( $F_{2, 675.45}=3.313$ ,  $p=0.037$ ) on Ctmax response. Tukey *post-hoc* test revealed that Ctmax was significantly higher for diploids at 20°C ( $p<0.001$ ), at the limit of significance at 24°C ( $p=0.054$ ) and not significant at 16°C ( $p=0.083$ ). Ctmax significantly increased with acclimation temperature ( $F_{2, 675.99}= 161.677$ ,  $p<0,001$ ) with 16°C having the lowest Ctmax and 24°C producing the highest Ctmax values (Figure 7).

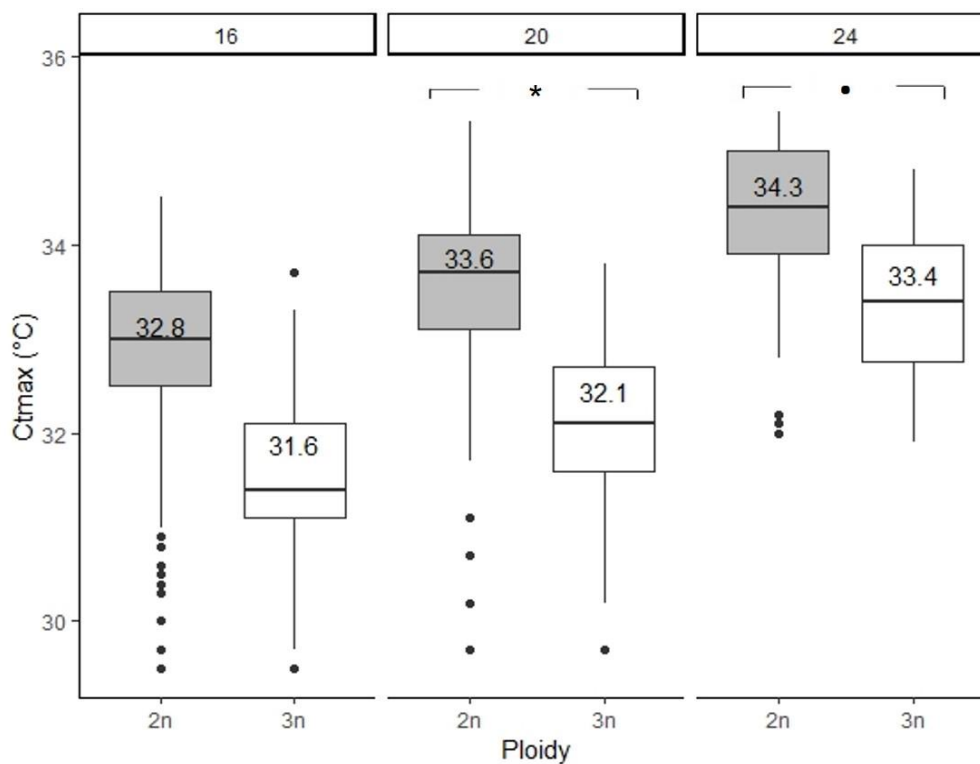


Figure 7. Ctmax measurements by ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C). Mean Ctmax values and error bars are shown. Significant values of  $p<0.05$  are shown with a star symbol (\*) and values of  $p=0.05$  are shown with a dot symbol (•)

Climatic zone had no effect on  $C_{tmax}$  ( $F_{1, 11.97}=0.143$ ,  $p=0.712$ ) but there was a significant interaction between climatic zone and acclimation temperatures on  $C_{tmax}$  ( $F_{2, 675.94}=9.636$ ,  $p<0.001$ ), as 16°C produced the lowest  $C_{tmax}$  values and 24°C, the highest (Figure 8).

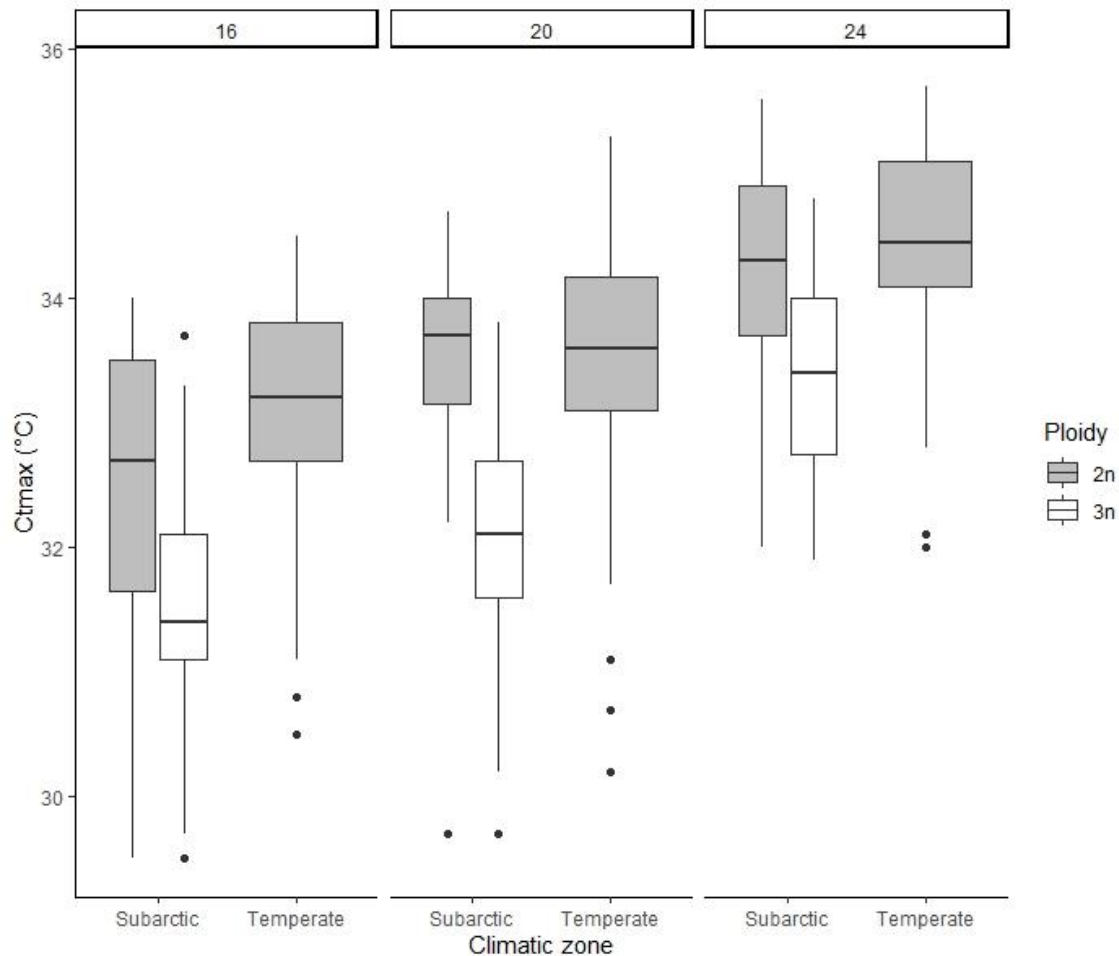


Figure 8.  $C_{tmax}$  measurements by climatic zone (subarctic and temperate), ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C). Error bars are shown

Results were similar when considering only diploid *Daphnia*, with no significant effect of climatic zone on  $C_{tmax}$  ( $F_{1, 8.19}=0.111$ ,  $p=0.747$ ) but a significant interaction between climatic zone and acclimation temperatures on  $C_{tmax}$  ( $F_{2, 479.78}=9.357$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 9).



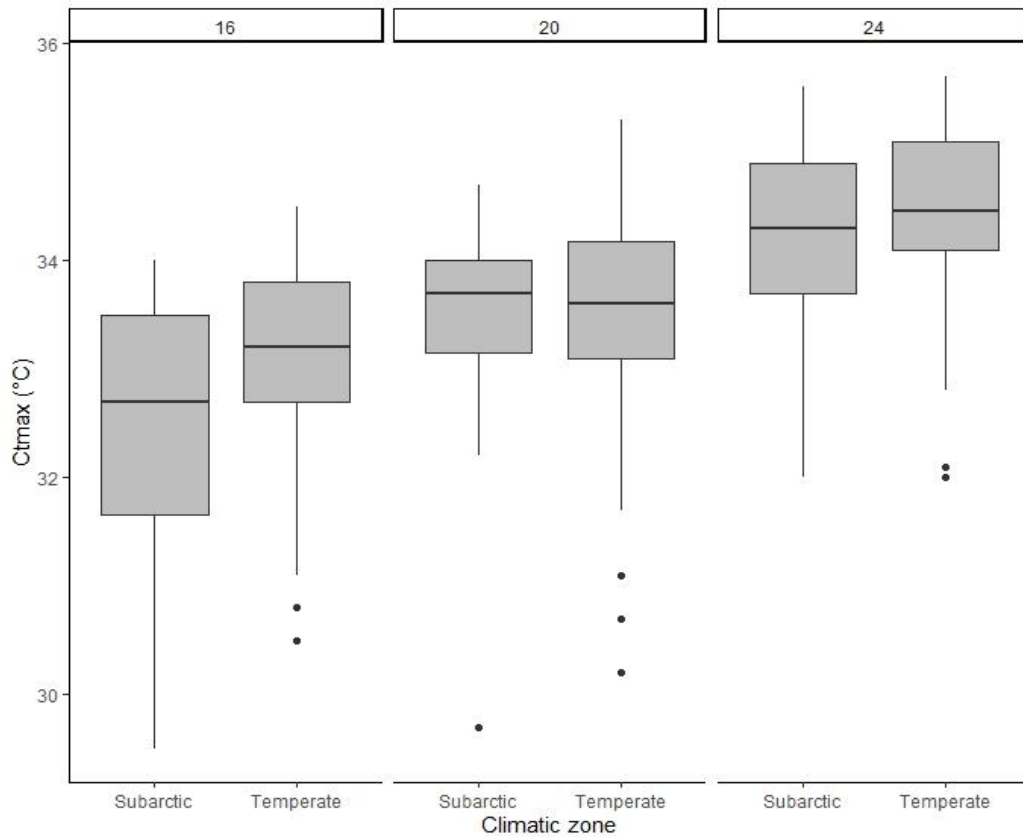


Figure 9. Ctmax measurements of diploids by climatic zone (subarctic and temperate) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C). Error bars are shown

Ctmax was negatively correlated to body size for all acclimation temperatures (Figure 10A). Ctmax was significantly affected by body size ( $F_{1, 13.68}=12.101$ ,  $p=0.004$ ) with a significant interaction between climatic zone and acclimation temperature ( $F_{2, 672.35}=4.239$ ,  $p=0.014$ ). The negative regression between Ctmax and body size was significant at 16°C ( $p<0.001$ ) and 24°C ( $p=0.012$ ) while it was not at 20°C ( $p=0.705$ ). Ctmax was also negatively and significantly correlated to cell size ( $F_{1, 17.01}=26.474$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 10B). The negative regression between Ctmax and cell size was significant at 16°C ( $p<0.001$ ) and almost significant at 24°C ( $p=0.071$ ) while it was not significant at 20°C ( $p=0.781$ ).

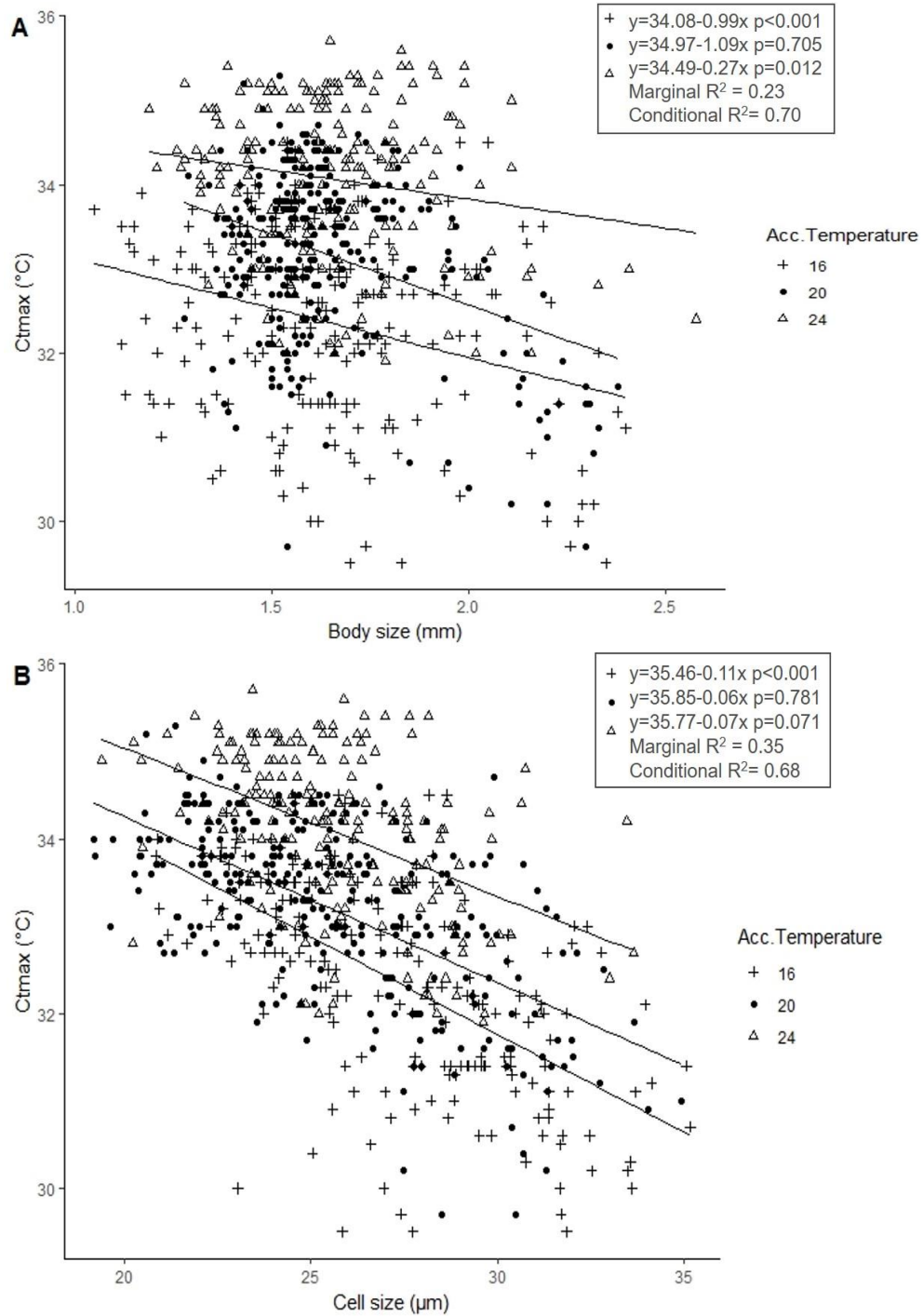


Figure 10.  $Ct_{max}$  by body size (A) or cell size (B) and acclimation temperature (+ :  $16^{\circ}C$ , • :  $20^{\circ}C$ ,  $\Delta$  :  $24^{\circ}C$ ). Equations, p values and  $R^2$  values are framed

### Size measurements

Body size was not affected by ploidy level nor acclimation temperature (Figure 11). Cell size varied significantly with acclimation temperature ( $F_{2, 667.26}=19.59$ ,  $p<0,001$ ) and ploidy levels ( $F_{1, 10.72}=8.19$ ,  $p=0.016$ ). Tukey *post-hoc* tests showed that triploids have larger cells compared to diploids at every temperature and 16°C produced significantly larger cells than 20°C or 24°C.

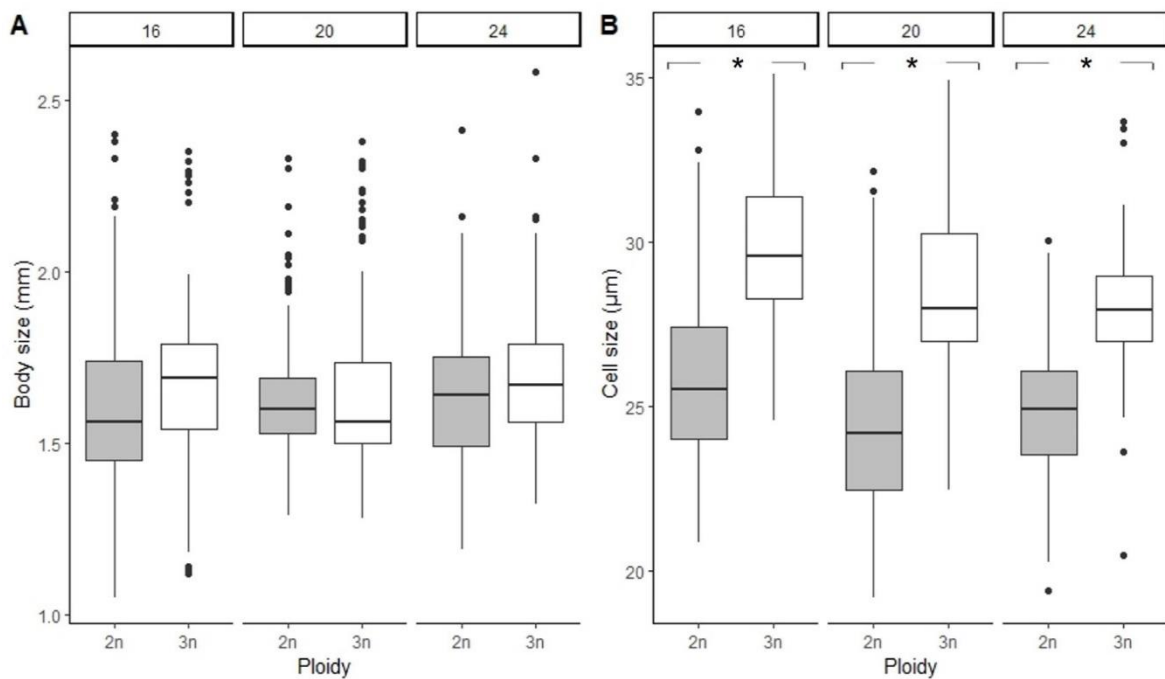


Figure 11. Body size (A) and cell size (B) by ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C) with error bars. Significant values of  $p<0.05$  are shown with a star symbol (\*)

Cell size was significantly correlated to body size at both extremes temperatures (Figure 16, Supplementary materials).

Climatic zone did not significantly affect body size ( $F_{1, 10.66}=0.561$ ,  $p=0.470$ ) nor cell size ( $F_{1, 10.98}=1.487$ ,  $p=0.248$ ). There was a significant interaction between climatic zone and acclimation temperature ( $F_{2, 674.47}=6.628$ ,  $p=0.001$ ) for cell sizes, as 16°C produced the largest cells (Figure 12B).

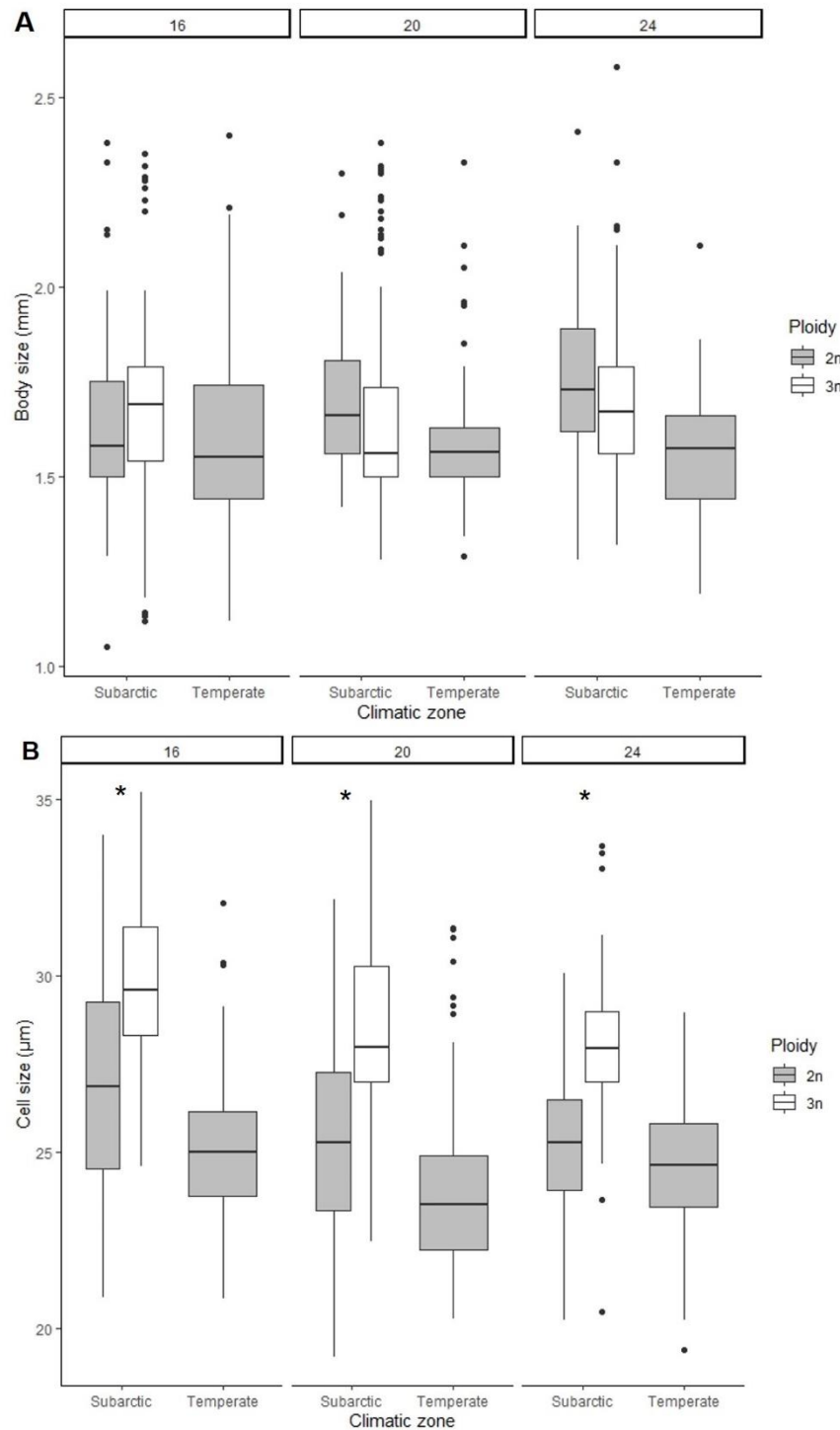


Figure 12. Body size (A) and cell size (B) by climatic zone (subarctic, temperate), ploidy levels (2n, 3n) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C) with error bars. Significant values of  $p < 0.05$  are shown with a star symbol (\*)

There was no effect of climatic zone on cell size when considering only diploid *Daphnia* ( $F_{1, 7.02}=1.381$ ,  $p=0.278$ ) (Figure 13).

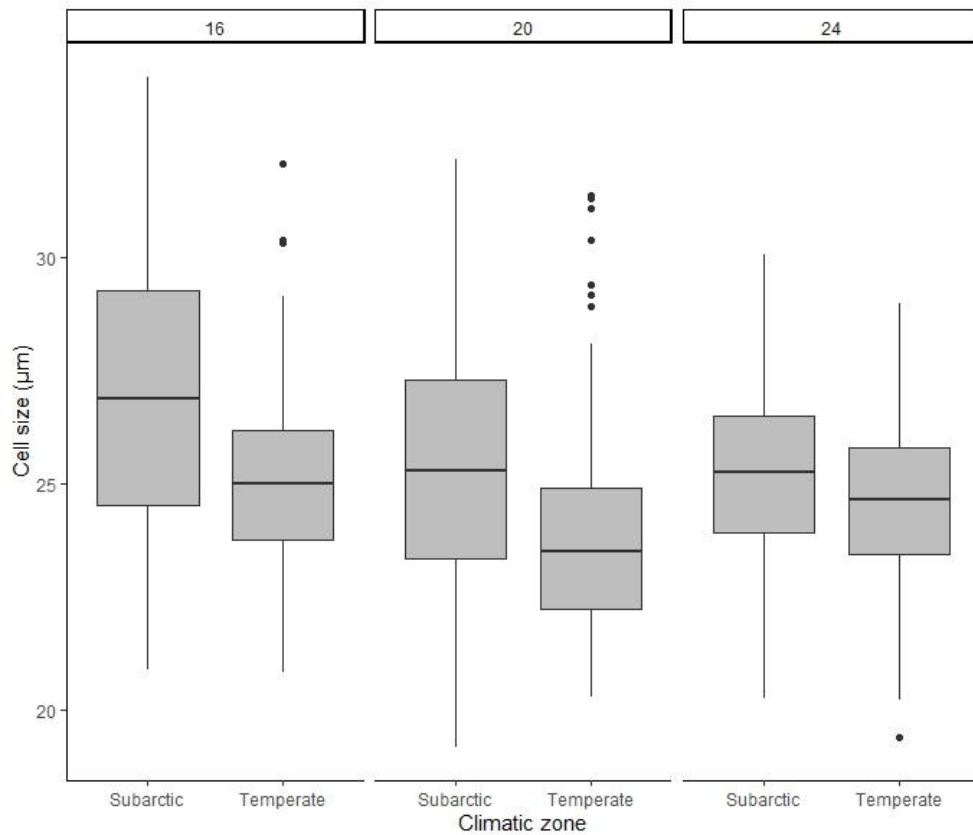


Figure 13. Cell size of diploids by climatic zone (subarctic, temperate) and acclimation temperature (16°C, 20°C, 24°C) with error bars.

### Expression of Hsp70 and catalase

Heat shock treatment significantly increased the expression level of Hsp70 ( $F_{1, 77.58}=44.112$ ,  $p<0.001$ ) and catalase ( $F_{1, 77.27}=14.166$ ,  $p<0.001$ ). Ploidy levels did not affect the constitutive expression level (untreated) or heat-shocked expression level of Hsp70 nor catalase (Figure 14).

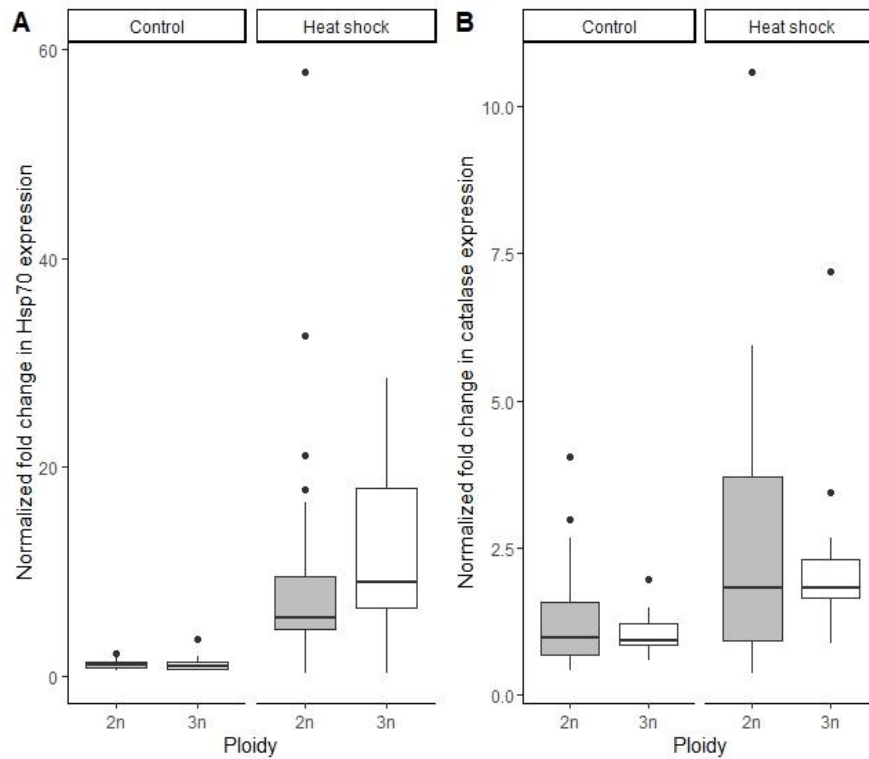


Figure 14. Mean normalized expression fold change of Hsp70 (A) and catalase (B) by ploidy levels (2n, 3n) and treatment (heat shock, control). All clones were raised at 20°C for this experiment

“Ste-Luce” had the highest induction of Hsp70 and catalase following heat shock (Figure 15). Interestingly, “Ste-Luce” also has the highest  $C_{tmax}$  from all at 20°C, with a mean  $C_{tmax}$  of 34,4°C. This seems to be an isolated case however, as mean  $C_{tmax}$  of clones raised at 20°C did not correlate with mean heat-shocked expression levels of Hsp70 nor catalase (Figure 17, Supplementary material).

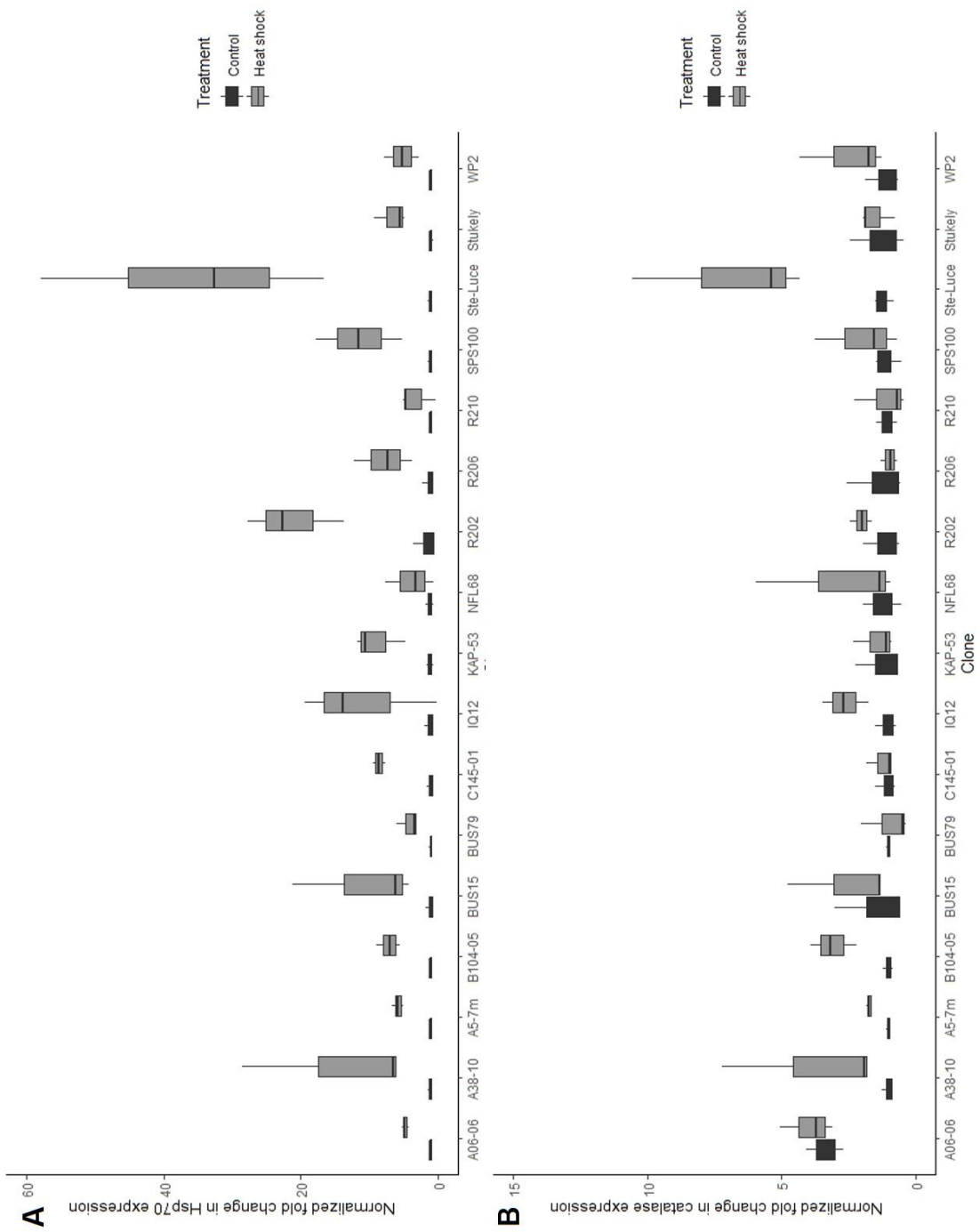


Figure 15. Mean normalized expression fold change of Hsp70 (A) and catalase (B) by clone and treatment (heat shock, control) with error bars. All clones were raised at 20°C for this experiment

## **Discussion**

### **Critical thermal maximum (Ctmax)**

The Ctmax measurements revealed an important effect of ploidy in thermal tolerance in *Daphnia*. Under moderate to high temperatures (20°C and 24°C), triploid *Daphnia* have lower thermal tolerance than diploid *Daphnia*. This suggests that triploid *Daphnia* are disadvantaged at high temperatures compared to diploids. To our knowledge, this is the first animal study showing a significant effect of ploidy on Ctmax. Our results imply that thermal tolerance could limit the distribution of polyploid *Daphnia* to higher latitudes and cooler regions, and therefore contribute to the observed geographic polyploidy pattern.

Other studies investigating thermal tolerance and ploidy in ectotherms have shown mixed results. Bowden *et al.* (2018) found no differences in Ctmax of triploid and diploid salmon. Ellis *et al.* (2013) found that triploid brook charr have lower Ctmax, but only in hypoxic conditions. A study on *Artemia parthenogenetica* found that polyploids have higher tolerance both to high and low temperatures compared to diploids (Zhang & Lefcort, 1991). By contrast, other studies on different fish species showed that triploids have lower tolerance at high temperatures than diploids (Altimiras *et al.*, 2002; Ojolick *et al.*, 1995; Schultz, 1982).

Ctmax was negatively correlated to body size and cell size. Similar results are presented in a recent meta-analysis of 500 species of ectotherms showing that thermal tolerance depends on genome size (which correlates to cell size) and body mass (Leiva *et al.*, 2019). Thermal tolerance generally decreases with larger sizes in *Daphnia* (Brans *et al.*, 2017; Burton *et al.*, 2018; Geerts *et al.*, 2014; Geerts *et al.*, 2015). Interestingly, our results show that body size and cell size affect Ctmax only under temperature extremes (16°C and 24°C), suggesting that extreme temperature exacerbates size-mediated thermal tolerance. Varying oxygen conditions could be responsible for size-induced thermal tolerance. Temperature affects ratios of oxygen demand and supply. Metabolic rate increases and oxygen solubility in water decreases in higher temperatures (Pörtner & Knust, 2007; Verbeck *et al.*, 2011). Smaller ectotherms should be better able to respond to increasing temperatures



because their size allow for efficient oxygen diffusion and transport (Forster *et al.*, 2012; Gardner *et al.*, 2011). Consequently, extreme temperatures could limit ectotherms size in order to cope with increasing demands in oxygen and reduced aerobic capacity (Leiva *et al.*, 2019; Verbeck *et al.*, 2011). Reduced size has been reported for many aquatic ectotherm species in response to global change and warming (Daufresne *et al.*, 2009). A study on eight species of crustacean found that larger animals had lower C<sub>tmax</sub> only under hypoxia conditions, and that heat-tolerant species had no differences in their C<sub>tmax</sub> in response to different oxygen conditions (Verbeck *et al.*, 2018).

Temperate *Daphnia* did not differ from subarctic *Daphnia* in thermal tolerance, even when removing ploidy as a factor (when considering only diploids). Considering that diploid clones of subarctic and temperate origins are as distantly related as they are to triploid clones, ploidy is highlighted as the most notable factor setting thermal tolerance limits, as opposed to origin. The effect of climatic regions on thermal tolerance on ectotherms are not always clear. Sørensen *et al.* (2009) studied thermal tolerance in tadpole of the frog *Rana temporaria* in Sweden and found that even though the southern population showed high tolerance to high temperatures, northern populations showed better tolerance at the highest tested temperature. A recent study on sticklebacks of northern and southern populations in Denmark found no local adaptation on C<sub>tmax</sub> or Hsp gene expression (Dammark *et al.*, 2018). In contrast, Geerts *et al.* (2014) found that northern European (Denmark and Sweden) populations of *Daphnia* had lower C<sub>tmax</sub> than southern populations from France. Although origin could affect thermal tolerance, specific local temperatures might contribute more to thermal tolerance than geographic origin. Yampolsky *et al.* (2014) found a correlation with local average high temperatures and thermal tolerance in *Daphnia* ranging from Kenya to the White Sea. Narum *et al.* (2010) show evidence for local thermal adaptation in redband trout populations from montane and desert environments in southern Idaho (USA). Trout populations adapted to the same habitat had similar allele frequencies for six genetic markers. Populations also show pattern of isolation by temperature, which suggests selection for different local environment and temperature (Narum *et al.*, 2010). Hotaling *et al.* (2019) tested C<sub>tmax</sub> on populations of

stonefly nymphs from different thermal regimes in high-elevation streams in the northern Rocky Mountains (USA). They found variations in  $C_{tmax}$  among populations, with populations who experience colder temperatures having a lower  $C_{tmax}$ . To effectively test whether  $C_{tmax}$  is affected by local temperature regimes rather than climatic zone, a thorough survey of pond temperatures at each site where our *Daphnia* clones were sampled is needed.

### Body and cell sizes

In this study, our experimental population did not vary in terms of body size with ploidy level nor with acclimation temperatures. In natural populations, polyploids tend to be larger than diploids (daphnia: Dufresne & Hebert, 1998; surfclams: Guo & Allen Jr., 1994; salamanders: Licht & Bogart, 1989; rotifers: Walsh & Zhang, 1992). However, body size does not universally correlate to ploidy levels (Gregory & Mable, 2005). Polyploidy generally produces larger cells, although cell number can be reduced so that body size remains unaffected (Felip *et al.*, 2001). Body size at maturity generally varies with temperature in ectotherms, a phenomenon called the temperature-size rule (TSR) (Atkinson, 1994). Rearing at higher temperatures causes smaller sizes at maturity (Atkinson, 1994; Forster *et al.*, 2012). This TSR was also confirmed in *Daphnia* (Hoefnagel *et al.*, 2018). We mention that our experimental design was not fit to test the TSR of *Daphnia*. Individual *Daphnia* were chosen randomly for  $C_{tmax}$  assays as long as they were non-gravid, so it is likely that they were all of varying ages. Variation in size responses has been shown for different life cycle phases (Forster *et al.*, 2011; Hoefnagel *et al.*, 2018). The fact that body size did not vary in our experiment allowed us to focus on the impact of ploidy and temperature on cell sizes instead.

Cell sizes vary with ploidy level and acclimation temperatures. Triploid *Daphnia* had larger cells at all tested temperatures. This is consistent with other findings that C-value (unreplicated gametic nuclear genome) and cell sizes are correlated (Cavalier-Smith, 1978; Gregory, 2001; Stebbins, 1971a). Our results also showed that *Daphnia* raised at low temperatures (16°C) have larger cells than *Daphnia* raised at moderate to high temperatures

(20°C and 24°C). Temperature-induced effects on cell size are reported in many different organisms (protists: Atkinson *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2002; dungflies: Blackenhorn & Llaurens, 2005; Madagascar ground gecko: Czarnoleski *et al.*, 2017; drosophila: Partridge *et al.*, 1994; nematodes: Van Voorhies, 1996). Smaller cells shorten the diffusion distance through cells and tissues (Czarnoleski *et al.*, 2014). This can be an advantage at high temperatures, where oxygen demands can exceed the supply capacity, as detailed in the oxygen limitation hypothesis (Atkinson *et al.*, 2006; Pörtner, 2002). Consequently, it has been proposed that the TSR applies also to cells, and that the observed body TSR in ectotherms might only be a result of the TSR in cells (Atkinson & Sibly, 1997; Partridge *et al.*, 1994; Van Voorhies, 1996; Woods, 1999). By contrast, Atkinson *et al.* (2006) hypothesize that TSR is variable between the levels of organisation. Different tissues, cells and ontogenetic stages can have different thermal sensitivities and responses to temperature (Atkinson *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2002; Hoefnagel *et al.*, 2018; Romero & Bagaña, 1991).

Our results on cell and body sizes do not conform to Bergmann's rule, which states that within species, body size increases with latitude and lower temperatures (Bergmann, 1847). By contrast, Geerts *et al.* (2014) found that *Daphnia* from northern populations were larger than those from southern populations, consistent with Bergmann's rule. Whether Bergmann's rule applies to cell size as it does for body size in ectotherms remains unknown, as it has rarely been studied. Van Voorhies (1996) suggested that Bergmann's rule might solely be the consequence of increase in cell size at low temperatures; similar to the concept that cell TSR creates body TSR. This was vividly criticised by Partridge and Coyne (1997), who pointed out that somatic cell and body sizes were not directly measured on the same species by Van Voorhies. They also argued that other factors such as genetic differentiation between populations could contribute to Bergmann's rule (Partridge & Coyne, 1997). In this study, Bergmann's rule does not apply to body size nor cell size in *Daphnia*, as *Daphnia* from higher latitudes did not show larger body or cell sizes, even when considering only diploid *Daphnia*. Our results show that ploidy accounts for the variability of cell size rather

than origin. The effects of climatic zone on size are rarely considered with ploidy, even though polyploids occurrence and ploidy levels increase with latitude (Brochmann *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2019). This highlights the importance of taking ploidy levels or C-values into account when examining Bergmann's clines on species with varying ploidy levels.

### Hsp70 and catalase gene expression

Heat-shock treatment significantly increased expression of Hsp70 and catalase compared to the control group, meaning that exposure to 30°C for an hour successfully induced a heat shock response in *Daphnia*. Heat-shock proteins like Hsp70 have well-known roles as cellular protectants. They prevent protein denaturation during temperature acclimation and heat stress (Richter *et al.*, 2010). They are usually up-regulated during thermal stress in numerous ectotherm species (stonefly nymphs: Hotaling *et al.*, 2019; crabs: Madeira *et al.*, 2012; common frogs: Sørensen *et al.*, 2009; sea turtle embryos: Tedeschi *et al.*, 2016), including *Daphnia* (Becker *et al.*, 2018; Bond & Bradley, 1995; Haap *et al.*, 2016). Catalase is an anti-oxidant enzyme that protects against oxidative damage when exposed to stressors such as high temperature. Higher catalase activity in response to temperature changes or to long-term acclimation to higher temperatures have been reported in daphnids (Brans *et al.*, 2018; Im *et al.*, 2019; Klumpen *et al.*, 2017), consistent with our findings.

Ploidy did not affect Hsp70 nor catalase gene expression of *Daphnia*, whether heat-shocked or untreated. This indicates there is no difference in constitutive expression levels nor in the heat-shock response in both ploidy levels. Few studies investigate differences in Hsp70 and catalase activity between different ploidy levels. Malerba and Marshall (2019) found that larger cells had more accumulation of ROS and could therefore be more susceptible to oxidative stress. In this study, we found no effect of exacerbated oxidative stress during heat-shock, even though polyploid *Daphnia* have larger cells and lower thermal tolerance. A study comparing Hsp in the erythrocytes of two species of fishes with diploid and triploid specimen found that triploids have lower Hsp70 levels than diploids (Saranyan *et al.*, 2017). Nunes *et al.* (2014) found consistent higher catalase activity in the liver of

diploid rainbow trout compared to triploids when investigating the effects of ploidy and diet on different enzymes. In plants, no difference of catalase activity between ploidy levels have been found in seven wheat species during drought (Zhang & Kirkham, 1994).

The clone with the higher normalized expression of Hsp70 and catalase when heat-shocked is also the clone with the highest Ctmax mean when raised at 20°C: “Ste-Luce”. This is only incidental however, as normalized Hsp70 and catalase gene expression did not correlate to average Ctmax for clones raised at 20°C. Here, Hsp70 and catalase gene expression cannot be associated with thermal tolerance limits. Haap *et al.* (2016) also found that higher Hsp70 expression did not confer higher thermal tolerance in *Daphnia magna*. These results suggest that the mechanism setting thermal tolerance is not linked to protein expression for heat-shock response nor oxidative damage, at least in the short term.

## **Conclusion**

Polyploid *Daphnia* had lower thermal tolerance than diploids when acclimated at moderate to high temperatures. This result indicates that high temperatures exacerbates differences in thermal tolerance between polyploids and diploids. Polyploids also have larger cells than diploids even though there was no difference in body size between both ploidy levels in our experimental groups. Body size did not vary with acclimation temperature. Higher acclimation temperatures produced smaller-sized cells for similar body sizes. Ctmax negatively correlated with body size and cell size of *Daphnia* at both temperature extremes. This suggests that extreme temperatures exacerbates size-mediated thermal tolerance. When heat-shocked, *Daphnia* expressed higher content of Hsp70 and catalase RNA, but there was no difference in expression levels between both ploidy levels. Overall, our results suggest that thermal tolerance in *Daphnia* is mediated mainly through cell size and indirectly, ploidy level. Polyploid *Daphnia* with larger cells have lower tolerance and could be disadvantaged in high temperature compared to diploids. This could potentially explain their absence from temperate regions. Our results imply that cell size-mediated thermal tolerance could be a contributing factor to the geographic polyploidy pattern.

Polyploid *Daphnia* may be disadvantaged in temperate climates because of their larger cells and lower thermal tolerance, but whether they are truly adapted to arctic climates remains unknown. Larger cells can provide better fitness, if fitness depends on cellular processes related to cell volume, such as enzymes quantity (Weiss *et al.*, 1975). More enzymes could provide better metabolic activity in the cold and enable polyploids or larger cell-sized organisms to be active at low temperatures. Larger cell sizes could have a selective advantage in high latitudes (Partridge & Coyne, 1997), via genome size. Grime and Mowforth (1982) found a positive correlation between growth at low temperatures and DNA content in a plant. Some polyploid ectotherms grow faster than diploids at lower temperatures (daphnia: Dufresne & Hebert, 1998; tadpoles: Hermaniuk *et al.*, 2016). In these cases, larger genomes might promote higher growth under cold temperatures. Limits in cold tolerance are likely to be set from composition of membrane phospholipids, freeze tolerance and depolarization of cell membranes (reviewed in Overgaard & MacMillan, 2016). Maintaining the polarisation of membranes with trans-membrane gradients takes up a substantial amount of energy (Hulbert & Else, 2005). This process could be more costly for smaller cells because of larger surface to volume ratio, so larger genomes and cells could be more cost-efficient in colder temperatures and display better cold tolerance (Leiva *et al.*, 2019). Thus, it is possible that there is an advantage of polyploidy in northern latitudes due to cell sizes. Comparison of Ctmin (critical thermal lower limit) from diploid and polyploid *Daphnia* are needed to test whether polyploids *Daphnia* are truly adapted to northern environments.

### **Acknowledgments**

This work was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) and by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FRQNT). We thank Julia Kerouac for her help in C<sub>t</sub>max measurements and Marie-Pomme Poissant for her help in daphnia rearing. We thank Claude Belzile for his help in flow cytometry and his microscope *Daphnia* pictures

### Supplementary material

Table 3. Sample spreadsheet of gene  $C_T$  (cycle threshold) fold expression change data analysis of Hsp70 according to the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method by Livak and Schmittgen (2001)

Clone	Treatment	Replicate	Tech_Rep	Hsp70_CT	Capon_CT	Stx_CT	Mean_Ref_CT	Mean_CT_Hsp70	Mean_CT_Ref	Fold_change ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )
1	Control	1	1	19.59	24.66	27.44	26.05	19.32	26.04	0.91
1	Control	1	2	19.50	24.69	27.70	26.20			
1	Control	2	1	19.30	24.88	27.96	26.42			1.34
1	Control	2	2	19.22	24.93	27.84	26.39	$2^{-((19.55-26.12)-(19.32-26.04))}$		
1	Control	3	1	19.19	24.77	26.52	25.65			0.82
1	Control	3	2	19.13	24.80	26.26	25.53			
1	Heat shock	1	1	17.28	25.04	27.55	26.30			4.72
1	Heat shock	1	2	17.46	25.04	27.67	26.36			
1	Heat shock	2	1	17.28	25.94	28.92	27.43			9.25
1	Heat shock	2	2	17.71	26.00	28.82	27.41			
1	Heat shock	3	1	16.01	25.52	27.84	26.68			15.45
1	Heat shock	3	2	16.11	25.72	27.82	26.77			

This example shows every replicates for one clone of Hsp70 gene expression and two reference genes, Capon and Stx. There are three replicates of each treatment, and technical duplicates, where the same replicate is amplified twice in different wells to check for pipetting errors. First, in green, all reference genes  $C_T$  of the control group are averaged for each clone. The same is done for each gene of interest, in orange. These two mean values are then used to normalize the expression of the heat-shocked group according to  $\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ target} - C_T \text{ reference genes})_{\text{Treatment}} - (C_T \text{ target} - C_T \text{ reference genes})_{\text{Control}}$ . To calculate  $\Delta\Delta C_T$ , the mean  $C_T$  of Hsp70 and the mean  $C_T$  of both references genes are calculated, for each replicate. This is shown with the blue and purple outline for the first replicate. Finally, the fold change in expression, or  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , can be calculated. The same calculations are performed for each clone and for the other gene of interest, catalase.

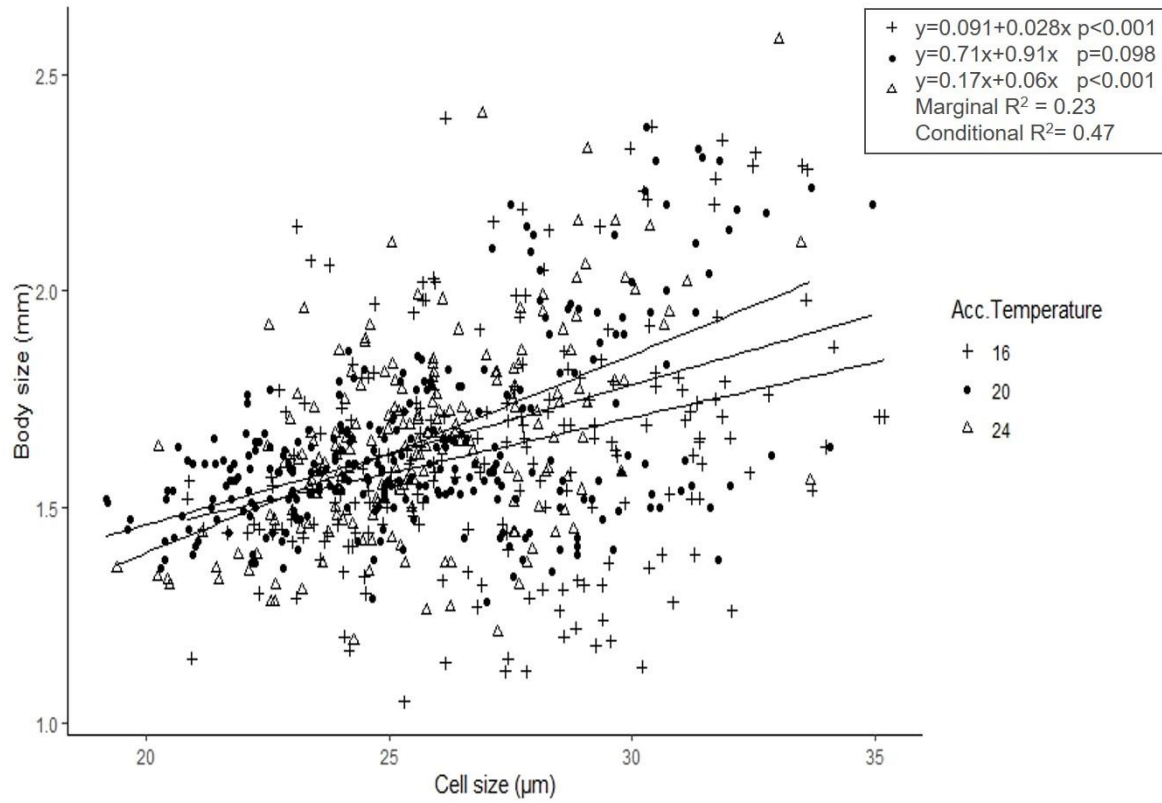


Figure 16. Body size by cell size and acclimation temperature (+ : 16°C, • : 20°C, Δ : 24°C). Equations, p values and  $R^2$  values are framed



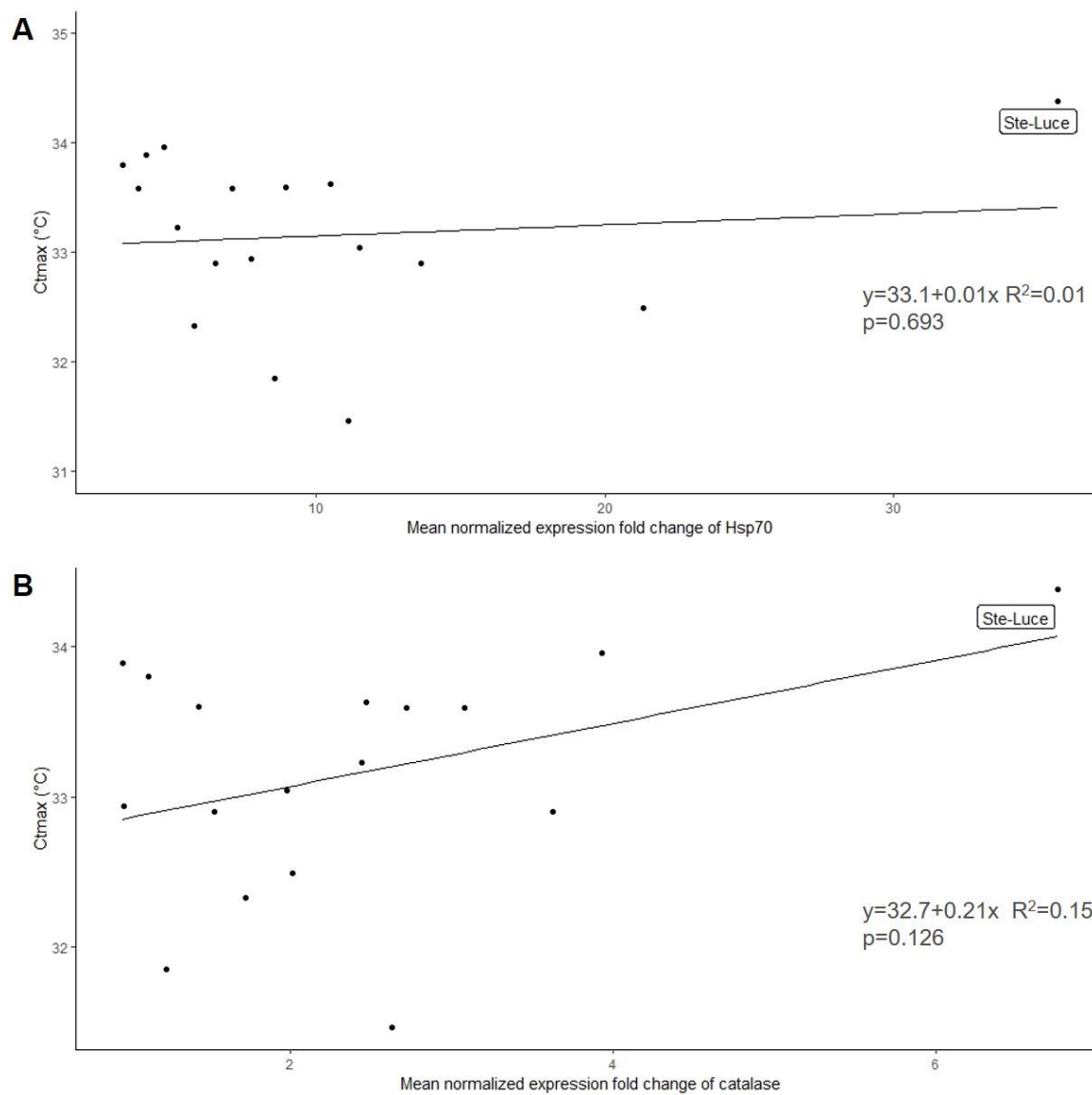


Figure 17. Mean Ctrmax (°C) of *Daphnia* raised at 20°C by normalized expression fold change of Hsp70 (A) and catalase (B). Equations,  $R^2$  values and p values are shown for each graph. A label for the “Ste-Luce” clone is shown in each graph.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif principal de cette étude était de contraster la tolérance thermique des daphnies triploïdes et diploïdes, afin de vérifier quel niveau de ploïdie tolérait mieux les hautes températures. Les objectifs secondaires de ce projet de maîtrise étaient de valider si les différences potentielles de tolérance thermique selon le niveau de ploïdie étaient associées à certains déterminants de la tolérance thermique, soit 1) la taille corporelle, 2) la taille cellulaire, 3) un changement dans l'expression relative du gène de Hsp70 et/ou 4) un changement dans l'expression relative du gène de la catalase.

La première partie de ma maîtrise a été de mesurer la tolérance thermique des daphnies diploïdes et triploïdes subarctiques de Churchill (Manitoba). Leur taille corporelle a été mesurée et leur tolérance thermique a été déterminée par la mesure du C<sub>tmax</sub>. Ce dernier a été mesuré avec une méthode novatrice et originale utilisant un thermocycleur et une caméra vidéo (Geerts *et al.*, 2014). Ces résultats ont montré que les daphnies diploïdes ont une meilleure tolérance thermique et sont plus petites que les triploïdes. Pourtant, les résultats de cette première partie n'ont pas démontré de relation entre la taille corporelle et la tolérance thermique, comme c'est généralement le cas dans la littérature chez les daphnies et les ectothermes en général (Geerts *et al.*, 2014; Geerts *et al.*, 2015; Leiva *et al.*, 2019). L'âge des daphnies était contrôlé dans cette étude, ce qui a créé une gamme de taille corporelle restreinte qui pourrait expliquer l'absence de relation significative entre la taille et la tolérance thermique. Les différences observées entre les triploïdes et les diploïdes ont permis de soulever la question de la tolérance thermique comme fonction de la distribution géographique de la polyploïdie.

Une approche expérimentale contrôlée a par la suite été entreprise pour la deuxième partie de ma maîtrise. L'utilisation de clones sur un plus grand gradient latitudinal et la vérification d'autres traits de tolérance thermique ont été privilégiées dans la deuxième partie du projet pour explorer cette question. La deuxième partie de cette étude consistait d'abord

en l'élevage de daphnies triploïdes et diploïdes de régions subarctiques et tempérées en conditions standards de laboratoire. L'élevage s'est fait à trois températures (16°C, 20°C et 24°C) afin de vérifier le lien entre la température d'acclimatation, la tolérance thermique et la taille. Le  $C_{tmax}$ , les tailles corporelles et cellulaires ont été mesurés. Les autres déterminants de la tolérance thermique, soient l'expression des gènes de Hsp70 et de la catalase, ont été mesurés par RT-qPCR pour les daphnies élevées à 20°C. Les résultats de cette deuxième partie montrent encore une fois des différences de tolérance thermique en fonction du niveau de ploïdie. Aucune différence entre les niveaux de ploïdie n'a été relevée pour la taille corporelle et les niveaux d'expression de Hsp70 et de catalase. La température d'élevage a eu des effets importants sur les résultats : les daphnies élevées aux hautes températures ont une meilleure tolérance thermique et des tailles cellulaires plus petites.

Les tailles cellulaires plus petites chez les diploïdes semblent être responsable de leur meilleure tolérance thermique, ce qui soulève une nouvelle piste dans l'explication de la distribution de la polyploïdie. L'absence de différences de tailles corporelles selon la température d'acclimatation semble renforcer l'hypothèse que la taille de cellule est un facteur déterminant dans l'établissement du seuil de tolérance thermique. Il est intéressant de noter que la zone climatique d'origine des clones n'explique pas les différences de tolérance thermique. L'origine géographique semble être un facteur moindre par rapport à la ploïdie et la taille de cellules pour expliquer la tolérance aux hautes températures. Il en va de même pour l'expression des gènes de Hsp70 et de catalase, qui varient trop d'un clone à l'autre pour que des différences entre les niveaux de ploïdie soient détectées. L'hypothèse selon laquelle les capacités aérobies définissent les limites de tolérance thermique et que la taille, particulièrement cellulaire, affecte ces capacités est donc appuyée, et ce, pour les deux parties de cette étude.

Il serait très intéressant d'obtenir des données de tolérance thermique, taille corporelle et taille cellulaire avec des clones de daphnies triploïdes provenant du haut Arctique. Certaines tendances qui ne sont pas apparentes en comparant seulement les daphnies

subarctiques et tempérées pourraient être mises en évidence avec des daphnies de cet environnement extrême. Par exemple, l'ajout de triploïdes arctiques permettrait une meilleure compréhension de l'effet de la zone climatique d'origine sur la tolérance thermique. Il aurait été intéressant de comparer les mesures de tailles corporelles et de tolérance thermique entre des clones triploïdes de l'Arctique et les clones diploïdes des milieux tempérés. L'ajout de clones triploïdes arctiques aurait également balancé le design expérimental au niveau de la ploïdie. Bien que le nombre de clones par combinaison de régions climatiques et niveau de ploïdie soit similaire (cinq clones triploïdes du subarctique, cinq clones diploïdes du subarctique et sept clones diploïdes tempérés), le design est débalancé en faveur des diploïdes. La surreprésentation des daphnies diploïdes est une des limites les plus apparentes de l'étude et aurait pu être remédiée avec l'ajout de quelques clones triploïdes arctiques.

Une autre limite de l'étude est l'absence de données d'expression des gènes de Hsp70 et de catalase à 16°C et à 24°C. Les résultats RT-qPCR aux autres températures auraient permis de voir comment les clones réagissent au stress thermique, lorsqu'acclimaté à des températures plus extrêmes. Il aurait alors été possible de vérifier si l'expression suit le  $C_{tmax}$  en fonction de la température d'acclimatation et si les changements d'expression relatifs pourraient expliquer un meilleur  $C_{tmax}$  chez un certain clone à une certaine température. Il aurait été particulièrement intéressant de voir si le clone possédant le plus haut  $C_{tmax}$  aurait également eu ayant le plus grand changement relatif d'expression, comme c'était le cas pour « Ste-Luce » à 20°C.

Les résultats de cette étude montrent que les triploïdes ont une tolérance thermique plus faible, mais il reste également à vérifier si leur tolérance thermique réduite explique leur distribution, ou si elles ont développé des adaptations aux hautes latitudes. Les traits d'histoire de vie entre les diploïdes et triploïdes suggèrent que les triploïdes auraient effectivement une « adaptation au froid ». Il est également possible que les deux hypothèses ne soient pas mutuellement exclusives. Les traits d'histoire de vie suggèrent que les

températures froides avantagent les triploïdes par rapport aux diploïdes (Dufresne & Hebert, 1998). L'hypothèse d'un avantage compétitif selon certaines conditions environnementales mérite d'être approfondie. Une étude en milieu naturel qui suit les daphnies triploïdes et diploïdes cohabitant dans les étangs subarctiques au fil d'une saison pourrait éclairer la question de la compétition. De même, une expérience de laboratoire avec des conditions contrôlées de température, de quantité d'algues et de luminosité et où il est question de compétition entre les deux niveaux de ploïdie pourrait être la prochaine étape pour tester cette hypothèse. Il serait également très intéressant d'obtenir des données de  $C_{tmin}$  pour les clones triploïdes et diploïdes et les comparer entre elles et avec les données de  $C_{tmax}$ . Si l'hypothèse selon laquelle les triploïdes ont un avantage au froid tient, ceux-ci devraient avoir des  $C_{tmin}$  plus faibles et donc être tolérant/résistant à des températures plus froides. Ces résultats pourraient être comparés avec ceux de Zhang and Lefcort (1991), qui montrent que les polyploïdes d'une espèce préfèrent les extrêmes de température par rapport aux diploïdes, qui sont alors qualifiés de sténothermes.

En conclusion, ce projet contribue à l'avancement des connaissances sur la distribution de la polyploïdie, avec des résultats et des conclusions qui ne se limitent pas au modèle d'étude *Daphnia pulex*. Ces deux études font parties des seules à ce jour qui vérifient l'influence de la tolérance thermique dans un contexte de parthénogenèse géographique. Seulement quelques études sur des plantes alpines existent à ce sujet, et encore moins d'études ont été réalisées chez les animaux. Cette étude est également la première à confirmer des différences de tolérance thermique en fonction de la ploïdie chez les daphnies, ce qui est d'une portée considérable. Après les travaux sur la parthénogenèse géographique chez *Daphnia pulex* de Ratté (2011) sur le métabolisme et de Martin (2018) sur les gènes de protection des UV, il semble que la tolérance thermique et la taille de cellules pourraient être des éléments clés de la parthénogenèse géographique chez les daphnies, et chez les ectothermes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Op. Plant Biol.*, **8**: 135-141.
- Adolfsson, S., Michalakakis, Y., Paczesniak, D., Bode, S. N. S., Butlin, R. K., Lamatsch, D. K., Martins, M. J. F., Schmit, O., Vandekerkhove, J., & J.Jokela. (2010). Evaluation of elevated ploidy and asexual reproduction as alternative explanations for geographic parthenogenesis in *Eucypris virens* ostracods. *Evolution*, **64**: 986-997.
- Ahura, R. (2005). Polyploidy in gymnosperms: revisited. *Silvae Gen.*, **54**: 59-69.
- Altimiras, J., Axelsson, M., Claireaux, G., Lefrançois, C., Mercier, C., & Farrell, A. P. (2002). Cardiorespiratory status of triploid brown trout during swimming at two acclimation temperatures. *J. Fish Biol.*, **60**: 102-116.
- Anderson, E., & Stebbins, G. L. (1954). Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*, **8**: 378-388.
- Angiletta, M. J., & Angiletta Jr, M. J. (2009). *Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**: 373-399.
- Arnold, M. L., & Bennett, B. D. (1993). Natural hybridization in Louisiana Irises: a genetic variation and ecological determinants. In R. G. Harrison (Ed.), *Hybrid zones and the evolutionary process* (pp. 115-139). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Atkinson, D. (1994). Temperature and organism size: a biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.*, **25**: 1-58.
- Atkinson, D., Ciotti, B. J., & Montagnes, D. J. S. (2003). Protists decrease in size linearly with temperature: *ca.* 2.5% °C<sup>-1</sup>. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **270**: 2605-2611.
- Atkinson, D., Morley, S. A., & Hughes, R. N. (2006). From cells to colonies: at what levels of body organization does the 'temperature-size rule' apply? *Evol. Dev.*, **8**(2): 202-214.
- Atkinson, D., & Sibly, R. M. (1997). Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *TREE*, **12**(6): 235-239.
- Azevedo, R. B. R., French, V., & Partridge, L. (2002). Temperature modulates epidermal cell size in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, **48**: 231-237.
- Barber, H. N. (1970). Hybridization and the evolution of plants. *Taxon*, **19**(2): 154-160.
- Barrett, S. C. H., Harder, L. D., & Worley, A. C. (1996). The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **351**: 1271-1280.
- Barringer, B. C. (2007). Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *Am. J. Bot.*, **94**: 1527-1533.
- Barton, K. (2018). MuMIn: Multi-model inference [R package version 1.4.2.1]. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Barton, N. H. (2001). The role of hybridization in evolution. *Mol. Ecol.*, **10**(3): 551-568.
- Beaton, M. J., & Hebert, P. D. N. (1988). Geographical parthenogenesis and polyploidy in *Daphnia pulex*. *Amer. Nat.*, **132**(6): 837-845.

- Beaton, M. J., & Hebert, P. D. N. (1989). Miniature genomes and endopolyploidy in cladoceran crustaceans. *Genome*, **32**: 1048-1053.
- Becker, D., Brinkmann, B. F., Zeis, B., & Paul, R. J. (2011). Acute changes in temperature or oxygen availability induce ROS fluctuations in *Daphnia magna* linked with fluctuations of reduced and oxidized glutathione, catalase activity and gene (haemoglobin) expression. *Biol. Cell.*, **103**: 351-363.
- Becker, D., Reydelet, Y., Lopez, J. A., Jackson, C., Colbourne, J. K., Hawat, S., Hiippler, M., Zeis, B., & Paul, R. J. (2018). The transcriptomic and proteomic responses of *Daphnia pulex* to changes in temperature and food supply comprise environment-specific and clone-specific elements. *BMC Genomics*, **19**(376). doi:10.1186/s12864-018-4742-6
- Bell, G. (1982). *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. Berkeley: University of California Press.
- Belling, J. (1925). The origin of chromosomal mutations in *Uvularia*. *J. Genet.*, **15**: 245-266.
- Bennett, M. D. (1971). The duration of meiosis. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.*, **178**: 277-299.
- Bennett, M. D. (1972). DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. R. Soc. B.*, **181**: 109-135.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J., & Johnston, J. S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~200 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of ~125 Mb. *Ann. Bot.*, **91**: 547-557.
- Bentley, B. P., Haas, B. J., Tedeschi, J. N., & Berry, O. (2017). Loggerhead sea turtle embryos (*Caretta caretta*) regulate expression of stress response and developmental genes when exposed to a biologically realistic heat stress. *Mol. Ecol.*, **26**: 2978-2992.
- Bergmann, C. (1847). About the relationship between heat conservation and body size of animals. *Goett Stud*, **1**: 595-708.
- Bier, K., & Muller, W. (1969). DNS-Messungen bei Insekten und eine Hypothese uber retardierte Evolution und besonderen DNS-Reichtum in Tierreich. *Biol. Zentralbl.*, **88**: 425-449.
- Bierzchudek, P. (1985). Patterns in plant parthenogenesis. *Experientia*, **41**: 1255-1264.
- Birchler, J. A., Yao, H., Chudalayandi, S., Vaiman, D., & Veitia, R. A. (2010). Heterosis. *The Plant Cell*: tpc-110. doi:10.1105/tpc.110.076133
- Blackenhorn, W. U., & Llaurens, V. (2005). Effects of temperature on cell size and number in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. *J. Thermal Biol.*, **30**: 213-219.
- Bond, J.-A., & Bradley, B. P. (1995). Heat-shock reduced the toxicity of malathion in *Daphnia magna*. *Mar. Env. Res.*, **39**: 209-212.
- Borgen, L., & Hultgård, U.-M. (2003). *Parnassia palustris*: a genetically diverse species in Scandinavia *Bot. J.*, **142**: 347-372.
- Bowden, A. J., Andrewartha, S. J., Elliot, N. G., Frappell, P. B., & Clark, T. D. (2018). Negligible differences in metabolism and thermal tolerance between diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Exp. Biol.*, **221**: 1-9.

- Brans, K. I., Stoks, R., & De Meester, L. (2018). Urbanization drives genetic differentiation in physiology and structures the evolution of pace-of-life syndromes in the water flea *Daphnia magna*. *Proc. R. Soc. B.*, **285**: 20180169.
- Brans, K. L., Jansen, M., Vanoverbeke, J., Tüzün, N., Stoks, R., & Meester, L. D. (2017). The heat is on: genetic adaptation to urbanization mediated by thermal tolerance and body size. *Glob. Change Biol.*, **23**: 5218-5227.
- Brochmann, C., Brysting, A. K., Alsos, I. G., Borgen, L., Grundt, H. H., Scheen, A. C., & Elven, R. (2004). Polyploidy in arctic plants. *Biol. J. Linn. Soc.*, **82**: 521-536.
- Brown, T. L., Lemay Jr., H. E., & Bursten, B. E. (1991). *Chemistry: the central science* (5th ed.). London: Prentice Hall.
- Burton, T., Zeis, B., & Einum, S. (2018). Automated measurement of upper thermal limits in small aquatic animals. *J. Exp. Biol.*, **221**(17): jeb182386. doi:10.1242/jeb.182386
- Carman, J. G. (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biol. J. Linn. Soc.*, **61**: 51-94.
- Cavalier-Smith, T. (1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.*, **34**: 247-278.
- Celis-Salgado, M. P., Cairns, A., Kim, N., & Yan, N. D. (2008). The FLAMES medium: a new, soft-water culture and bioassay medium for Cladocera. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **30**: 265-271.
- Chapelle, G., & Peck, L. S. (1999). Polar gigantism dictated by oxygen availability. *Nature*, **399**: 114-115.
- Chen, Z. J. (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci.*, **15**(2): 57-71.
- Chown, S. L., Hoffmann, A. A., Kristensen, T. N., Angilletta Jr., M. J., Stenseth, N. C., & Pertoldi, C. (2010). Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Clim. Res.*, **43**: 3-15.
- Christen, F., Desrosiers, V., Dupont-Cyr, B. A., Vandenberg, G. W., François, N. R. L., Tardif, J.-C., Dufresne, F., Lamarre, S. G., & Blier, P. U. (2018). Thermal tolerance and thermal sensitivity of heart mitochondria: Mitochondrial integrity and ROS production. *Free Radical Bio. Med.*, **116**: 11-18.
- Christensen, B. (1980). *Animal cytogenetics* (Vol. 2: Annelida). Berlin, Germany: Gebrüder Borntraeger.
- Coggins, B. L., Collins, J. W., Holbrook, K. J., & Yampolsky, L. Y. (2017). Antioxidant capacity, lipid peroxidation, and lipid composition changes during long-term and short-term thermal acclimation in *Daphnia*. *J. Comp. Physiol. B.*, **187**: 1091-1106.
- Colbourne, J. K., Crease, T. J., Weider, L. J., Hebert, P. D. N., Dufresne, F., & Hobaek, A. (1998). Phylogenetics and evolution of a circumpolar species complex (Cladocera: *Daphnia pulex*). *Biol. J. Linn. Soc.*, **65**: 347-365.
- Colbourne, J. K., & Hebert, P. D. N. (1996). The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philos. T. Roy. Soc. B.*, **351**: 349-360.



- Colbourne, J. K., Robinson, B., Bogart, K., & Lynch, M. (2004). Five hundred and twenty-eight microsatellite markers for ecological genomic investigations using *Daphnia*. *Mol. Ecol. Notes*, **4**: 485-490.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature*, **6**: 836-846.
- Comai, L., Tyagi, A. P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S. H., Stevens, Y., & Byers, B. (2000). Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. *The Plant Cell*, **12**: 1551-1567.
- Costantini, D. (2014). *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology: a marriage between mechanistic and evolutionary approaches*. Berlin, Germany: Springer.
- Czarnoleski, M., Dragosz-Kluska, D., & Angiletta Jr., M. J. (2014). Flies developed smaller cells when temperature fluctuated more frequently. *J. Thermal Biol.* doi:10.1016/j.jtherbio.2014.09.010i
- Czarnoleski, M., Labecka, A. M., Starostová, Z., Sikorska, A., Bonda-Ostaszewska, E., Woch, K., Kubicka, L., & Kozłowski, J. (2017). Not all cells are equal: effects of temperature and sex on the size of different cell types in the Madagascar ground gecko *Paroedura picta*. *Biol Open*, **6**: 1149-1154.
- Dammark, K. B., Ferchaud, A.-L., Hansen, M. M., & Sørensen, J. G. (2018). Heat tolerance and gene expression responses to heat stress in threespine sticklebacks from ecologically divergent environments. *J. Thermal Biol.*, **75**: 88-96.
- Daufresne, M., Lengfellner, K., & Sommer, U. (2009). Global warming benefits the small in aquatic ectotherms. *PNAS*, **106**(31): 12788-12793.
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Life*, **50**: 279-289.
- De Storme, N., Copenhaver, G. P., & Geelen, D. (2012). Production of diploid male gametes in Arabidopsis by cold-induced destabilization of postmeiotic radial microtubule arrays. *Plant Physiol.*, **160**: 1808-1826.
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., & Wenning, R. J. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**: 1103-1123.
- Dionne, K., Jose, C., Caron, A., & Dufresne, F. (2017). Association between clonal diversity and species diversity in subarctic zooplankton communities. *J. Plankton Res.*, **39**(2): 232-245.
- Dionne, K., Vergilino, R., Dufresne, F., Charles, F., & Nozais, C. (2011). No evidence for temporal variation in a cryptic species community of freshwater amphipods of the *Hyaella azteca* species complex. *Diversity*, **3**: 390-404.
- Dufresne, F., & Hebert, P. D. N. (1994). Hybridization and origins of polyploidy. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **258**: 141-146.
- Dufresne, F., & Hebert, P. D. N. (1995). Polyploidy and clonal diversity in an arctic cladoceran. *Heredity*, **75**: 45-53.
- Dufresne, F., & Hebert, P. D. N. (1997). Pleistocene glaciations and polyphyletic origins of polyploidy in an arctic cladoceran. *P. Roy. Soc. Lond. B.*, **264**: 201-206.

- Dufresne, F., & Hebert, P. D. N. (1998). Temperature-related differences in life-history characteristics between diploid and polyploid clones of the *Daphnia pulex* complex. *Écoscience*, **5**: 433-437.
- Dufresne, F., Markova, S., Vergilino, R., Ventura, M., & Kotlik, P. (2011). Diversity in the reproductive modes of European *Daphnia pulicaria* deviates from the geographical parthenogenesis. *PLoS ONE*, **6**(5): e20049. doi:10.1371/journal.pone.0020049
- Ellis, L. E., Sacobie, C. F. D., Kieffer, J. D., & Benfey, T. J. (2013). The effects of dissolved oxygen and triploidy on critical thermal maximum in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Comp. Biochem. Phys. A*, **166**: 426-433.
- Escobar, M. D., & Hunt, J. L. (2017). A cost-effective RNA extraction technique from animal cells and tissue using silica columns. *J. Biol. Meth.*, **4**(2): e72. doi:10.14440/jbm.2017.184
- Fankhauser, G. (1945). The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Quat. Rev. Biol.*, **20**: 20-78.
- Feder, M. E. (1999). Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *Amer. Zool.*, **39**: 857-864.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., & Piferrer, F. (2001). Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*, **111**: 175-195.
- Forster, J., Hirst, A. G., & Atkinson, D. (2011). How do organisms change size with changing temperature? The importance of reproductive method and ontogenetic timing. *Funct. Ecol.*, **25**: 1024-1031.
- Forster, J., Hirst, A. G., & Atkinson, D. (2012). Warming-induced reductions in body size are greater in aquatic than terrestrial species. *PNAS*, **109**(47): 19310-19314.
- Frazier, M. R., Woods, H. A., & Harrison, J. F. (2001). Interactive effects of rearing temperature and oxygen on the development of *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Biochem. Zool.*, **74**: 641-650.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, **220**: 1049-1051.
- Gallardo, M. H., Kausel, G., Jiménez, A., Bacquet, C., González, C., Figueroa, J., Köhler, N., & Ojeda, R. (2004). Whole-genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, **82**: 443-451.
- Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, M. R., Joseph, L., & Heinsohn, R. (2011). Declining body size: a third universal response to warming? *TRENDS Ecol. Evol.*, **26**(6): 285-291.
- Geerts, A. N., Meester, L. D., & Stoks, R. (2014). Heat tolerance and its evolutionary potential along a latitudinal gradient in *Daphnia magna*. *Evol. Ecol. Res.*, **16**: 517-528.
- Geerts, A. N., Vanoverbeke, J., Vanschoenwinkel, B., Doorslaer, W. V., Feuchtmayr, H., Atkinson, D., Moss, B., Davidson, T. A., Sayer, C. D., & Meester, L. D. (2015). Rapid evolution of thermal tolerance in the water flea *Daphnia*. *Nat. Clim. Change*, **5**: 665-670.

- Glesener, R. R., & Tilman, D. (1978). Sexuality and the components of environmental uncertainty: clues from geographic parthenogenesis in terrestrial animals. *Am. Nat.*, **112**: 659-673.
- Goin, O. B., Goin, C. J., & Bachmann, K. (1968). DNA and amphibian life history. *Copeia*, **1968**(3): 532-540.
- Gregory, T. R. (2001). The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **27**(5): 830-843.
- Gregory, T. R., & Mable, B. (2005). Chapter 8: Polyploidy in animals. In *The Evolution of the Genome* (pp. 427-517): Elsevier.
- Grime, J. P., & Mowforth, M. A. (1982). Variation in genome size- an ecological interpretation. *Nature*, **299**: 151-153.
- Guo, X., & Allen Jr., S. K. (1994). Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). *Genetics*, **138**: 1199-1206.
- Haag, C. R., & Ebert, D. (2004). A new hypothesis to explain geographic parthenogenesis. *Ann. Zool. Fennici*, **41**: 539-544.
- Haap, T., Schwarz, S., & Köhler, H.-R. (2016). Metallothionein and Hsp70 trade-off against one another in *Daphnia magna* cross-tolerance to cadmium and heat stress. *Aquat. Toxicol.*, **170**: 112-119.
- Hagerup, O. (1931). Über Polyploidie in Beziehung zu Klima, Ökologie und Phylogenie. *Hereditas*, **16**: 19-40.
- Halcrow, K. (1978). Cell division in the carapace epidermis of *Daphnia magna* Straus (Cladocera). *Crustaceana*, **35**(1): 55-63.
- Hamilton, W. D. (1980). Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos*, **35**: 282-290.
- Hamilton, W. D., Axelrod, R., & Tanese, R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **87**: 3566-3573.
- Hebert, P. D. N., & Crease, T. (1983). Clonal diversity in populations of *Daphnia pulex* reproducing by obligate parthenogenesis. *Heredity*, **51**: 353-369.
- Hebert, P. D. N., Ward, R. D., & Weider, L. J. (1988). Clonal-diversity patterns and breeding-systems variation in *Daphnia pulex*, asexual-sexual complex. *Evolution*, **42**(1): 147-159.
- Hermaniuk, A., Rybacki, M., & Taylor, J. R. E. (2016). Low temperature and polyploidy result in larger cell and body size in an ectothermic vertebrate. *Physiol. Biochem. Zool.*, **89**(2): 118-129.
- Hoefnagel, K. N., de Vries, E. H. J. L., Jongejans, E., & Verberk, W. C. E. P. (2018). The temperature-size rule in *Daphnia magna* across different genetic lines and ontogenetic stages: Multiple patterns and mechanisms. *Ecol. Evol.*, **8**: 3828-3841.
- Hörandl, E. (2006). The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytol.*, **171**(1): 525-538.
- Horne, C. R., Hirst, A. G., & Atkinson, D. (2015). Temperature-size responses match latitudinal-size clines in arthropods, revealing critical differences between aquatic and terrestrial species. *Ecol. Lett.*, **18**: 327-335.
- Hotaling, S., Shah, A. A., McGowan, K. L., Tronstad, L. M., Giersch, J. J., Finn, D. S., Woods, H. A., Dillon, M. E., & Kelley, J. L. (2019). Mountain stoneflies may tolerate

- warming streams: evidence from organismal physiology and gene expression. *BioRxiv*. doi:10.1111/GCB.15294
- Huey, R. B., Crill, W. D., Kingsolver, J. G., & Weber, K. E. (1992). A method for rapid measurement of heat or cold resistance of small insects. *Funct. Ecol.*, **6**: 489-494.
- Hulbert, A. J., & Else, P. L. (2005). Membranes and the setting of energy demand. *J. Exp. Biol.*, **208**: 1593-1599.
- Im, H., Samanta, P., Na, J., & Jung, J. (2019). Time-dependent responses of oxidative stress, growth, and reproduction of *Daphnia magna* under thermal stress. *B. Environ. Contam. Tox.*, **10**: 817-821.
- Innes, D. J., & Dufresne, F. (2020). Parthenogenesis. In R. D. Cothran & M. Thiel (Eds.), *Reproductive Biology* (pp. 246-273). Oxford, UK.: Oxford University Press.
- Innes, D. J., & Hebert, P. D. N. (1988). The origin and genetic basis of obligate parthenogenesis in *Daphnia pulex*. *Evolution*, **42**: 1024-1035.
- Johnson, G. B. (1974). Enzyme polymorphism and metabolism. *Science*, **184**: 28-37.
- Jørgensen, L. B., Malte, H., & Overgaard, J. (2019). How to assess *Drosophila* heat tolerance: unifying static and dynamic tolerance assays to predict heat distribution limits. *Funct. Ecol.*, **33**: 629-642.
- Kearney, M. (2005). Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. *TRENDS Ecol. Evol.*, **20**(9). doi:10.1016/j.tree.2005.06.005
- Kearney, M., Moussalli, A., Strasburg, J., Lindenmayer, D., & Moritz, C. (2003). Geographic parthenogenesis in the Australian arid zone: I. A climatic analysis of the *Heteronotia binoei* complex (Gekkonidae). *Evol. Ecol. Res.*, **5**: 953-976.
- Kirchheimer, B., Schinkel, C. C. F., Dellinger, A. S., Klatt, S., Moser, D., Winkler, M., Lenoir, J., Caccianiga, M., Guisan, A., Nieto-Lugilde, D., Svenning, J. C., Thuiller, W., Vittoz, P., Willner, W., Zimmermann, N. E., Hörandl, E., & Dullinger, S. (2016). A matter of scale: apparent niche differentiation of diploid and tetraploid plants may depend on extent and grain of analysis. *J. Biogeogr.*, **43**: 716-726.
- Klinner, U., & Bottcher, F. (1992). Mitotically unstable polyploids in the yeast *Pichia guilliermondii*. *J. Basic Microbiol.*(32): 331-338.
- Klumpen, E., Hoffschroer, N., Zeis, B., Gigengack, U., Dohmen, E., & Paul, R. J. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and the heat stress response of *Daphnia pulex*: ROS-mediated activation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and heat shock factor 1 (HSF-1) and the clustered expression of stress genes. *Biol. Cell.*, **109**(109): 39-64.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, **35**: 1547-1549.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Soft.*, **82**(13). doi:10.18637/jss.v082.i13
- Lardies, M. A., Arias, M. B., Poupin, M. J., & Bacigalupe, L. D. (2014). Heritability of *hsp70* expression in the beetle *Tenebrio molitor*: ontogenetic and environmental effects. *J. Insect Physiol.*, **67**: 70-75.
- Larkin, K., Tucci, C., & Neiman, M. (2016). Effects of polyploidy and reproductive mode on life history trait expression. *Ecol. Evol.*, **6**(3): 765-778.

- Leiva, F. P., Calosi, P., & Verbeck, W. C. E. P. (2019). Scaling of thermal tolerance with body mass and genome size in ectotherms: a comparison between water- and air-breathers. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **374**: 20190035.
- Lenth, R. (2018). emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means [R package version 1.3.0]. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Letey, J., Stolzy, L. H., Valoras, N., & Szuskiewick, T. E. (1962). Influence of oxygen diffusion rate on sunflower growth at various soil and air temperatures. *Agro. J.*, **54**(4): 316-319.
- Levin, D. A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. *Am. Nat.*, **122**(1): 1-25.
- Levin, D. A. (2019). Why polyploid exceptionalism is not accompanied by reduced extinction rates. *Plant Syst. Evol.*, **305**: 1-11.
- Lewis, W. H. (1980). *Polyploidy: Biological Relevance*. New York, USA: Springer.
- Licht, L. E., & Bogart, J. P. (1989). Growth and sexual maturation in diploid and polyploid salamanders (genus *Ambystoma*). *Can. J. Zool.*, **67**: 812-818.
- Licht, L. E., & Lowcock, L. A. (1991). Genome size and metabolic rate in salamanders. *Comp. Biochem. Phys. A*, **100**: 83-92.
- Little, T. J., Demelo, R., Taylor, D. J., & Hebert, P. D. N. (1997). Genetic characterization of an arctic zooplankter: insights into geographic polyploidy. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **264**: 1363-1370.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Lokki, J., & Saura, A. (1980). Polyploidy in Insect Evolution. In W. H. Lewis (Ed.), *Polyploidy* (Vol. 13). Boston, USA: Springer.
- Lopez, J. A., & Bohuski, E. (2007). *RNA extraction and purification protocol*. University of Indiana.
- Löve, A., & Löve, D. (1957). Arctic polyploidy. *P. Gen. Soc. Can*, **2**: 23-27.
- Lundmark, M. (2006). Polyploidization, hybridation and geographical parthenogenesis. *TRENDS Ecol. Evol.*, **21**: 9.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, **101**: 13-30.
- Mable, B. K. (2004). 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms. *Biol. J. Linn. Soc*, **82**: 453-466.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. S., & Vinagre, C. (2012). Thermal tolerance of the crab *Pachygrapsus marmoratus*: intraspecific differences at a physiological (CTMax) and molecular level (Hsp70). *Cell Stress Chaperon.*, **17**: 707-716.
- Madlung, A., Tyagi, A. P., Watson, B., Jiang, H., Kagochi, T., Doerge, R. W., Martienssen, R., & Comai, L. (2005). Genomic changes in synthetic Arabidopsis polyploids. *Plant. J.*, **41**: 221-230.
- Malerba, M. E., & Marshall, D. J. (2019). Testing the drivers of the temperature-size covariance using artificial selection. *Evolution*, **74**(1): 169-178.
- Manton, I. (1950). *Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Martin, J. M. (2018). *Impacts de la polyploïdie sur la gestion des dommages induits à l'ADN par rayonnement ultraviolet en hautes latitudes*. (Mémoire de maîtrise), Université du Québec à Rimouski, Rimouski.
- Martin, S. L., & Husband, B. C. (2009). Influence of phylogeny and ploidy on species ranges of North American angiosperms. *J. Ecol.*, **97**: 913-922.
- Mason, A. S., Nelson, M. N., Yan, G., & Cowling, W. A. (2011). Production of viable male unreduced gametes in Brassica interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. *BMC Plant. Biol.*, **11**: 103.
- Masterson, J. (1994). Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, **264**: 421-423.
- Matzke, M. A., Mette, M. F., Kanno, T., & Matzke, J. M. (2003). Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal role in cancer? *Trends Genet.*, **19**(5): 253-256.
- May, R. M., & Anderson, R. M. (1983). Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **219**(1216): 281-313.
- Mayer, V. W., & Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.*, **231**: 177-186.
- Maynard Smith, J. (1978). *The Evolution of Sex*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Mayrose, T., Zhan, S. H., Rothfels, C. J., Magnuson-Ford, K., Barker, M. S., Rieseberg, L. H., & Otto, S. P. (2011). Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science*, **333**: 1257.
- McDonald, M. J., Rice, D. P., & Desai, M. M. (2016). Sex speeds adaptation by altering the dynamics of molecular evolution. *Nature*, **531**: 233-236.
- Meirmans, S., Skorpung, A., Løyning, M. K., & Kirkendall, L. R. (2006). On the track of the Red Queen: bark beetles, their nematodes, local climate and geographic parthenogenesis. *J. Evol. Biol.*, **19**: 1939-1947.
- Muller, H. J. (1925). Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Am. Nat.*, **59**(663): 346-353.
- Narum, S. R., Campbell, N. R., Kozfkay, C. C., & Meyer, K. A. (2010). Adaptation of redband trout in desert and montane environments. *Mol. Ecol.*, **19**: 4622-4637.
- Nunes, B., Miranda, A. F., Ozorio, R. O. A., Gonçalves, F., Gonçalves, J. F. M., & Correia, A. T. (2014). Modulation of neuronal activity and hepatic metabolism by ploidy and L-carnitine supplement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Nut.*, **20**: 242-252.
- Oberprieler, C., Talianova, M., & Griesenbeck, J. (2019). Effects of polyploidy on the coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes in *Leucanthemum* Mill. (Compositae, Anthemideae). *Ecol. Evol.*(9): 9100-9110.
- Ojolick, E. J., Cusack, R., Benfey, T. J., & Kerr, S. R. (1995). Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*, **131**: 177-187.
- Omilian, A. R. (2006). *Features of Daphnia genome evolution*. (Doctoral thesis), Indiana University,

- Osborn, T. C., Pires, J. C., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colot, V., & Martienssen, R. A. (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.*, **19**: 141-147.
- Otto, S. P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, **131**: 452-462.
- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.*, **34**: 401-437.
- Overgaard, J., & MacMillan, H. A. (2016). The integrative physiology of insect chill tolerance. *Annu. Rev. Physiol.*, **79**(8): 8.1-8.22. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034142
- Paquin, C., & Adams, J. (1983). Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations. *Nature*, **302**: 495-500.
- Parisod, C., Holderegger, R., & Brochmann, C. (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol.*, **186**: 5-17.
- Partridge, L., Barrie, B., Fowler, K., & French, V. (1994). Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution*, **48**(4): 1269-1276.
- Partridge, L., & Coyne, J. A. (1997). Bergmann's rule in ectotherms: is it adaptive? *Evolution*, **51**: 632-635.
- Pörtner, H. O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, **88**: 137-146.
- Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependant biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Phys. A*, **132**: 739-761.
- Pörtner, H. O. (2004). Climate variability and the energetic pathways of evolution: the origin of endothermy in mammals and birds. *Physiol. Biochem. Zool.*, **77**: 959-981.
- Pörtner, H. O. (2009). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.*, **213**: 881-893.
- Pörtner, H. O., & Farrell, A. P. (2008). Physiology and climate change. *Science*, **322**: 690-692.
- Pörtner, H. O., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, **315**: 95-97.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
- Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*(29): 467-501.
- Rasch, E. M. (1985). DNA "standards" and the range of accurate DNA estimates by Feulgen absorption microspectrophotometry. In R. R. C. a. S. H. Harrison (Ed.), *Advances in microscopy*. New York.
- Ratté, T. (2011). *Effet de la polyploidie sur les capacités métaboliques de clones subarctiques du complexe Daphnia pulex*. (Mémoire de maîtrise), Université du Québec à Rimouski, Rimouski.

- Renny-Byfield, S., & Wendel, J. F. (2014). Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. *Am. J. Bot.*, **101**(10): 1711-1725.
- Rice, A., Šmarda, P., Novosolov, M., Drori, M., Glick, L., Sabath, N., Meiri, S., Belmaker, J., & Mayrose, I. (2019). The global biogeography of polyploid plants. *Nat. Ecol. Evol.*, **3**: 265-273.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell*, **40**: 253-266.
- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., Durphy, J., Schwarzbach, A. E., Donovan, L. A., & Lexer, C. (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, **301**: 1211-1216.
- Rieseberg, L. H., & Wendel, J. F. (1993). Introgression and its consequences in plants. In R. G. Harrison (Ed.), *Hybrid zones and the evolutionary process* (pp. 70-109). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Romero, R., & Baguña, J. (1991). Quantitative cellular analysis of growth and reproduction in freshwater planarians (Turbellaria; Tricladida). I. A cellular description of the intact organism. *Inver. Rep. Dev.*, **19**(2): 157-165.
- Roughgarden, J. (1972). The evolution of niche width. *Am. Nat.*, **106**: 683-718.
- Saranyan, P. V., Ross, N. W., & Benfey, T. J. (2017). Erythrocyte heat shock protein responses to chronic (*in vivo*) and acute (*in vitro*) temperature challenge in diploid and triploid salmonids. *Comp. Biochem. Phys. A*, **206**: 95-104.
- Schinkel, C. C. F., Kirchheimer, B., Dellinger, A. S., Klatt, S., Winkler, M., Dullinger, S., & Hörandl, E. (2016). Correlations of polyploidy and apomixis with elevation and associated environmental gradients in an alpine plant. *AoB PLANTS*, **8**: plw064. doi:10.1093/aobpla/plw064
- Schulte, P. M., Healy, T. M., & Fanguie, N. A. (2011). Thermal performance curves, phenotypic plasticity and the time scales of temperature exposure. *Int. Comp. Biol.*, **51**(5): 691-702.
- Schultz, R. J. (1982). Competition and adaptation among diploid and polyploid clones of unisexual fishes. . In *Evolution and genetics of life histories* (pp. 103-119). New York, USA: Springer.
- Seymour, R. S. (1994). Oxygen diffusion through the jelly capsules of amphibian eggs. *Israel J. Zool.*, **40**: 493-506.
- Soltis, D. E., Segovia-Salcedo, M. C., Jordon-Thagen, I., Majure, L., Miles, N. M., Mavrodiev, E. V., Mei, W., Cortez, M. B., Soltis, P. S., & Gitzendanner, M. A. (2014). Are polyploids really evolutionary dead-ends (again)? A critical reappraisal of Mayrose et al. (2011). *New Phytol.*, **202**: 1102-1117.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Tate, J. A. (2003). Advances in the study of polyploidy since *Plant speciation*. *New Phytol.*, **161**: 173-191.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2020). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**(13): 7051-7057.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine « winners » and « losers ». *J. Exp. Biol.*, **126**(1): 45-51.



- Sørensen, J. G., Pekkonen, M., Lindgren, B., Loeschcke, V., Laurila, A., & Merilä, H. (2009). Complex patterns of geographic variation in heat tolerance and Hsp70 expression levels in the common frog *Rana temporaria*. *J. Thermal Biol.*, **34**: 49-54.
- Stace, C. (1976). *Hybridization and the flora of the British Islands*. New York, USA.: Academic Press.
- Stebbins, G. L. (1950). *Variation and evolution in plants*. New York, USA: Colombia University Press.
- Stebbins, G. L. (1971a). *Chromosomal evolution in higher plants*. London, UK.: Edward Arnold Ltd.
- Stebbins, G. L. (1971b). *Processes of organic evolution*. Englewood Cliffs, USA: Prentice-Hall.
- Stebbins, G. L. (1980). Polyploidy in plants: unsolved problems and prospects. In *Polyploidy* (pp. 495-520). Boston, USA.: Springer.
- Stebbins, G. L. (1985). Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Ann. Mis. Bot. Gar.*, **72**(4): 824-832.
- Storchova, Z., & Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Mol. Cell Biol.*, **5**: 45-54.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29**: 1715-1733.
- Suzuki, N., & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Phys. Plant.*, **126**: 45-51.
- Taylor, D. J., Crease, T. J., & Brown, W. M. (1999). Phylogenetic evidence for a single long-lived clade of crustacean cyclic parthenogens and its implications for the evolution of sex. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **266**: 791-797.
- te Beest, M., Roux, J. J. L., Richardson, D. M., Brysting, A. K., Suda, J., Kubessova, M., & Pysek, P. (2012). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann. Bot.*, **109**: 19-45.
- Tedeschi, J. N., Kennington, W. J., Tomkins, J. L., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M. G., & Mitchell, N. J. (2016). Heritable variation in heat shock gene expression: a potential mechanism for adaptation to thermal stress in embryos of sea turtles. *Proc. R. Soc. B.*, **283**: 20152320. doi:10.1098/rspb.2015.2320
- Theodoridis, S., Randin, C., Broennimann, O., Patsiou, T., & Conti, E. (2013). Divergent and narrower climatic niches characterize polyploid species of European primroses in *Primula* sect. *Aleuritia*. *J. Biogeogr.*, **40**: 1278-1289.
- Thompson, J. D., & Lumaret, R. (1992). The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *TREE*, **7**(9): 302-307.
- Tiersch, T. R., Chandler, R. W., Wachtel, S. S., & Elias, S. (1989). Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry*, **10**: 706-710.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3 - new capacities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, **40**(15): e115. doi:10.1093/nar/gks596

- Van Drunen, W. E., & Husband, B. C. (2019). Evolutionary associations between polyploidy, clonal reproduction, and perenniality in the angiosperms. *New Phytol.*, **224**(3): 1266-1277.
- Van Voorhies, W. A. (1996). Bergmann size clines: a simple explanation for their occurrence in ectotherms. *Evolution*, **50**(3): 1259-1264.
- Vandel, A. (1928). La parthénogenèse géographique: Contribution à l'étude biologique et cytologique de la parthénogenèse naturelle. *Bull. Biol. France Belg.*(62): 164-2481.
- Vandel, A. (1940). La parthénogenèse géographique. *Bull. Biol. France Belg.*, **74**: 94-100.
- Verbeck, W. C. E. P., Bilton, D. T., Calosi, P., & Spicer, J. I. (2011). Oxygen supply in aquatic ectotherms: Partial pressure and solubility together explain biodiversity and size patterns. *Ecology*, **92**(8): 1565-1572.
- Verbeck, W. C. E. P., Leuren, R. S. E. W., van der Velde, G., & Gabriel, F. (2018). Thermal limits in native and alien freshwater peracarid Crustacea: The role of habitat use and oxygen limitation. *Funct. Ecol.*, **32**: 926-936.
- Verbeck, W. C. E. P., Sommer, U., Davidson, R. L., & Viant, M. R. (2013). Anaerobic metabolism at thermal extremes: a metabolomic test of the oxygen limitation hypothesis in an aquatic insect. *Int. Comp. Biol.*, **53**(4): 609-619.
- Vergilino, R., Belzile, C., & Dufresne, F. (2009). Genome size evolution and polyploidy in the *Daphnia pulex* complex (Cladocera: Daphniidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, **97**: 68-79.
- Walsh, E. J., & Zhang, L. (1992). Polyploidy and body size variation in a natural population of the rotifer *Euchlanis dilatata*. *J. Evol. Biol.*, **5**: 345-353.
- Wang, Y., Jha, A. K., Doonan, J. H., & Yang, M. (2010). Polyploidy-associated genomic instability in *Arabidopsis thaliana*. *Genesis*, **48**: 254-263.
- Warren, E. (1903). A preliminary attempt to ascertain the relationship between the size of cell and the size of body in *Daphnia Magna* straus. *Biometrika*, **2**(3): 255-259.
- Weiss, L. R., Kukora, J. R., & Adams, J. (1975). The relationship between enzyme activity, cell geometry, and fitness in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**(3): 794-798.
- Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.*, **42**: 225-249.
- Woods, H. A. (1999). Egg-mass and cell size: effects of temperature on oxygen distribution. *Amer. Zool.*, **39**: 244-252.
- Xu, S., Innes, D. J., Lynch, M., & Cristescu, M. E. (2013). The role of hybridization in the origin and spread of asexuality in *Daphnia*. *Mol. Ecol.*, **22**: 4549-4561.
- Xu, S., Spitze, K., Ackerman, M. S., Ye, Z. Q., Bright, L., Keith, N., Jackson, C. E., Shaw, J. R., & Lynch, M. (2015). Hybridization and the origin of contagious asexuality in *Daphnia pulex*. *Mol. Biol. Evol.*, **32**: 3215-3225.
- Yamane, K., Yasui, Y., & Ohnishi, O. (2003). Intraspecific CPDNA variations of diploid and tetraploid perennial buckwheat, *Fagopyrum cymosum* (Polygonaceae). *Am. J. Bot.*, **90**: 339-346.
- Yampolsky, L. Y., Schaer, T. M., & Ebert, D. (2014). Adaptive phenotypic plasticity and local adaptation for temperature tolerance in freshwater zooplankton. *Proc. R. Soc. B.*, **281**: 20132744. doi:10.1098/rspb.2013.2744

- Zhang, J., & Kirkham, M. B. (1994). Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.*, **35**(5): 785-791.
- Zhang, L., & Lefcort, H. (1991). The effects of ploidy level on the thermal distributions of brine shrimp *Artemia parthenogenetica* and its ecological implications. *Heredity*, **66**: 445-452.

