

Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского –
природный заповедник РАН – филиал Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского
центра "Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН"

На правах рукописи

Подунай Юлия Александровна

**ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ, СИСТЕМА СКРЕЩИВАНИЯ
И БИОГЕОГРАФИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ULNARIA* (KÜTZING)
COMPÈRE (BACILLARIOPHYTA)**

Специальность 1.5.16 – гидробиология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
Давидович Николай Александрович

Севастополь – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Общая биология диатомовых водорослей.....	12
1.2 Жизненный цикл и половое воспроизведение бесшовных пеннатных диатомовых водорослей	20
1.3 История изучения представителей рода <i>Ulnaria</i>	23
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	31
2.1 Места отбора проб	31
2.2.Отбор проб и выделение клонов	32
2.3 Культивирование.....	33
2.4 Постановка экспериментов по скрещиванию	35
2.5 Микроскопия	37
2.6 Постановка экспериментов по изучению влияния метаболитов и биогенов	38
2.7 Молекулярные методы	39
2.8 Статистическая обработка	40
ГЛАВА 3 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
3.1 <i>Ulnaria acus</i> (Kützinger) M. Aboal.....	42
3.2 Комплекс видов <i>Ulnaria</i> cf. <i>ulna</i>	45
3.3 Рост в культуре представителей рода <i>Ulnaria</i> в зависимости от содержания в среде некоторых элементов	58
Глава 4 ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>ULNARIA</i>	64
4.1 Жизненный цикл и изменение размеров клеток.....	64

4.2 Особенности полового воспроизведения <i>Ulnaria acus</i> и комплекса видов <i>Ulnaria</i> cf. <i>ulna</i>	72
4.3 Движение гамет.....	83
4.4 Системы скрещивания изученных видов рода <i>Ulnaria</i>	90
4.5 Генотипическое определение пола	98
ГЛАВА 5 БИОГЕОГРАФИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ ИЗОЛЯЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>ULNARIA</i> НА ЕВРАЗИЙСКОМ КОНТИНЕНТЕ.....	102
5.1 Распространение вида и репродуктивная совместимость популяций <i>Ulnaria acus</i>	102
5.2 Репродуктивная изоляция и расхождение видов <i>Ulnaria</i> cf. <i>ulna</i> ..	105
5.3 Репродуктивные границы и филогения рода <i>Ulnaria</i>	113
5.4 Космополитизм, эндемизм и видообразование	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ.....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В современной диатомологии существует ряд проблем, широко обсуждаемых в научной литературе. В первую очередь это проблема идентификации видов и определения видовых границ. Относительно небольшое количество признаков, традиционно используемых для морфологического анализа, оказывается недостаточным для разграничения криптических видов [44, 46, 171]. В свою очередь на генетическом уровне выбор необходимого процента различий между генами также субъективен и неоднозначен для делимитации видов и порой противоречит морфологическим данным. На больших пространственных масштабах отсутствие точной таксономической идентификации может затруднить правильную оценку биогеографических аспектов [227]. Таким образом, второй проблемой, определяющей актуальность представленной работы, является изучение распространения диатомовых водорослей, их космополитизма или эндемизма [141]. Симпатрическое обитание криптических видов ставит вопрос о возможности межвидовой гибридизации у диатомовых, которая была изучена всего у нескольких видов [45, 247]. Зачастую решить эти вопросы без применения методов и подходов репродуктивной биологии не представляется возможным.

Род *Ulnaria* (Kützing) Compère был предложен для группы пресноводных видов диатомей, которые ранее были отнесены к большому и гетерогенному роду *Synedra* Ehrenberg. В настоящее время известно 45 видов рода *Ulnaria* с типовым видом *U. ulna* (Nitzsch) Compère. Пресноводная бесшовная диатомовая водоросль *U. acus* (Kützing) M. Aboal является одним из доминирующих видов фитопланктона и фитобентоса многих пресных водоемов, одним из доминантных видов фитопланктона оз. Байкал [30], который вносит существенный вклад в пищевые цепи и круговорот кремния, а также является

биостратиграфическим маркером байкальской палеолетописи плейстоцена и голоцена [115].

В настоящее время многие авторы подвергают род *Ulnaria* тщательной ревизии с типификацией видов [148], с выделением новых видов, как например, *U. ferefusiformis* Kulikovskiy, Lange-Bertalot, *U. pilum* Kulikovskiy, Lange-Bertalot [145], *U. verhaegeniana* Van de Vijver, M. de Haan, Mertens & Cocquyt [242], с перемещениями видов между родами *Ulnaria* и *Fragilaria* Lyngbye [240]. Однако описание новых видов нередко проходит только на основании небольших отличий по морфологическим признакам, или даже по одному признаку. При выделении таких морфовидов не берется во внимание ни достаточно широкий диапазон варьирования морфологических признаков [27], ни политипичность видов, что приводит к возникновению трудностей в определении видовых границ. Широкое распространение *U. ulna* и *U. acus* несомненно ставит вопрос о том, действительно ли эти виды являются космополитами, или под одним и тем же названием может скрываться целый комплекс видов.

Степень разработанности темы исследования. Этапы полового воспроизведения и жизненные циклы водорослей остаются слабоизученными, особенно на фоне большого количества описанных видов диатомей. Актуальным остается вопрос изучения систем скрещивания видов, сочетания гомо- и гетероталлического путей воспроизведения у диатомовых водорослей. Генотипическое определение пола у пеннатных диатомей, в отличие от эпигенетического у центрических, показано на сравнительно небольшом количестве видов. Проблема разграничения и распространения видов в диатомологии широко обсуждается в научной литературе. Космополитическое распространение одних видов противопоставляется эндемизму других. При этом молекулярно-генетические методы исследования далеко не всегда способны решить вопросы таксономии и порой противоречат данным морфологического анализа. В таких случаях для определения видовых границ

целесообразно обратиться к методам репродуктивной биологии, которые применяются немногими исследователями из-за необходимости выделять клетки в культуру и трудностей содержания диатомовых водорослей. Вопросы межвидовой гибридизации у диатомовых водорослей посвящено всего несколько работ.

Цель работы. Изучить биологию полового воспроизведения повсеместно встречающихся на Евразийском континенте представителей рода *Ulnaria*, оценить границы распространения отдельных видов.

Задачи работы. 1. Исследовать схему полового воспроизведения представителей рода *Ulnaria*.

2. Описать жизненный цикл и систему скрещивания изучаемых видов.

3. Определить способ детерминации пола у изученных представителей бесшовных пеннатных диатомей.

4. Определить способ доставки гамет к месту сингамии у видов рода *Ulnaria*.

5. Изучить репродуктивную совместимость/изоляцию представителей географически удаленных популяций видов рода *Ulnaria*.

Научная новизна. Впервые изучен половой процесс, жизненный цикл и система скрещивания у бесшовных пеннатных диатомовых *Ulnaria acus* и *U. danica*. Выявлены видоспецифические размеры и кардинальные пункты для изученных видов. Показана схема детерминации пола у *U. ulna* и *U. danica*, предполагающая диплогенотипический характер наследования, при котором мужские организмы являются гетерогаметными, а женские – гомогаметными в отношении половых факторов. Установлено, что сближение гамет для сингамии у видов рода *Ulnaria* осуществляется за счет особого типа движения мужских гамет с помощью временных цитоплазматических выростов.

Впервые с использованием принципов и положений репродуктивной биологии изучено распространение видов рода *Ulnaria* на Евразийском

континенте. Установлена репродуктивная совместимость изученных популяций *U. acis* и повсеместное распространение вида на территории Евразии. Показана репродуктивная изоляция и пределы распространения видов *U. ulna* и *U. danica*. Отмечено, что в зоне перекрытия ареалов этих видов наблюдается межвидовая гибридизация.

Теоретическая и практическая значимость. Для большинства диатомовых водорослей половое воспроизведение является обязательной частью жизненного цикла, во время которой происходит восстановление размеров. Описание схемы полового процесса, жизненного цикла, системы скрещивания, принципов детерминации пола относятся к фундаментальным знаниям в диатомологии. Доказательство генотипического распределения полов, гетерогаметности мужского и гомогаметности женского пола у видов *Ulnaria* дополняют и подтверждают ранее полученные аналогичные данные для пеннатных диатомей. Примененный в работе критерий определения репродуктивной совместимости/изоляции популяций объективный инструмент для разграничения криптических видов, которые сложно, а иногда и невозможно, разделить по морфологическим критериям.

Практическая значимость работы заключается в том, что диатомовые водоросли используются в биотехнологических процессах, в связи со способностью синтезировать полезные для человека вещества, включая жиры, мукополисахариды, необычные пигменты, наноразмерные кремнеземные структуры. Например, был отработан метод культивирования *U. acis* в больших емкостях, для получения биогенного кремнезема, белков и липидов, в том числе эйкозапентаеновой кислоты [4]. Описана микрофлора, ассоциированная с клетками вида, которая может приводить к их гибели в культуре [18]. Слабая изученность жизненных циклов водорослей и биологии их воспроизведения приводит к возникновению трудностей в их содержании. Знание особенностей полового воспроизведения и системы скрещивания может позволить сохранять в культуре генетические линии штаммов, необходимых в биотехнологии.

Методы исследования. Эксперименты проводились с клоновыми культурами, изолированными из природных популяций микропипеточным методом. Культуры содержали на среде, близкой по составу к Dm при естественном освещении в термостабилизированном боксе. Для проведения экспериментов по скрещиванию клоны поддерживали в экспоненциальной стадии роста. Потомство первого поколения выделяли для проверки репродуктивной совместимости/изоляции географически удаленных популяций. Использовали методы световой и сканирующей электронной микроскопии и молекулярно-генетические методы.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Для всех изученных представителей рода *Ulnaria* характерен один тип полового процесса.
2. Доставка гамет к месту сингамии у бесшовных пеннатных диатомовых из рода *Ulnaria* осуществляется за счет особого типа движения, связанного с формированием на поверхности мужских гамет временных цитоплазматических выростов.
3. Пол у видов рода *Ulnaria* детерминирован диплогенотипически и у мужских клонов является гетерогаметным, а у женских — гомогаметным в отношении половых факторов.
4. Западная часть Евразийского континента заселена *Ulnaria ulna*, восточная — *U. danica*. Популяции *U. ulna* способны к межвидовой гибридизации с популяциями *U. danica*, находящимися в районе Западно-Сибирской низменности и к востоку от нее вплоть до оз. Байкал.
5. *Ulnaria acus*, в отличие от *Ulnaria ulna* и *U. danica*, является видом, распространенным по всей территории Евразии.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.16 — гидробиология, в частности пункту 2: "Исследование экологических основ жизнедеятельности гидробионтов — их питания, водно-солевого и энергетического обмена,

закономерностей роста и развития, особенностей жизненных циклов", а также пункту 6 паспорта: "Изучение биogeографических аспектов распределения гидробионтов в водоемах разных типов на континентах (биолиmnология) ..."

Степень достоверности результатов обеспечена значительным объемом собранного и обработанного материала (всего 137 клонов из 19 локальных популяций), проведением многочисленных повторных экспериментов и повторяемостью результатов. Использованы стандартные методы отбора проб, культивирования и описанные в литературе способы и методы, позволяющие инициировать половое воспроизведение. Проведена статистическая обработка количественных экспериментальных данных.

Апробация результатов работы. Материалы диссертационной работы были представлены на следующих симпозиумах, съездах и конференциях: IV Международная конференция "Актуальные проблемы современной альгологии" (Киев, Украина, 2012), XIII Международная научная конференция альгологов "Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований" (Борок, Россия 2013), 9-th Central European Diatom Meeting (Bremerhaven, Germany, 2015), IX Международная научно-практическая конференция молодых ученых по проблемам водных экосистем "Понт Эвксинский – 2015", посвященной 100-летию со дня рождения д.б.н. проф., чл.-кор. АН УССР В.Н. Грезе (Севастополь, Россия, 2015), Международная конференция "Проблемы систематики и географии водных растений" (Ярославль, Россия, 2015), 11-th International Philological Congress (Szczecin, Poland, 2017), XV Международная научная конференция (XV Диатомовая школа) "Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований" (Ярославль, Россия, 2017), 25th International Diatom Symposium (Berlin, 2018), IV Всероссийская научная конференция с международным участием "Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге" (Санкт-Петербург, 2018), Всероссийская научно-практическая конференция "Водные биоресурсы и аквакультура юга России", приуроченная к

20-летию открытия в Кубанском государственном университете направления подготовки "Водные биоресурсы и аквакультура" (Краснодар, 2018), Всероссийская конференция с международным участием "Микология и альгология в России. XX – XXI век: смена парадигм", посвященная 100-летию кафедры микологии и альгологии, 110-летию со дня рождения Михаила Владимировича Горленко и памяти Юрия Таричановича Дьякова (Москва, 2018), XI Всероссийская научно-практическая конференция для молодых учёных по проблемам водных экосистем "Понт Эвксинский – 2019", посвященная памяти д.б.н., проф. С.Б. Гулина (г. Севастополь, 2019), II Международная научно-практическая конференция "Биологическое разнообразие: изучение, сохранение, восстановление, рациональное использование" (Керчь, 2020), II Всероссийская научно-практическая школа-конференция "Наземные и морские экосистемы причерноморья и их охрана" (Курортное, 2020).

Личный вклад автора. В основу диссертации положены материалы исследования, полученные автором, начиная с 2010 года. Осуществлен отбор проб, выделение клонов и введение их в культуру, подобраны условия для содержания и получения полового воспроизведения; проведены экспериментальные работы по скрещиванию клоновых культур, изучены стадии их полового процесса, система скрещивания и биогеография видов. Молекулярно-генетические исследования проведены автором совместно с коллегами. Автор принимал непосредственное участие в обработке экспериментальных данных, самостоятельно обобщал и выполнял научную интерпретацию полученных данных и участвовал в подготовке всех публикаций. Диссертационная работа написана лично соискателем.

Публикации. Всего опубликовано 78 научных работ, по теме диссертации – 23, в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и Украины (вышедшие из печати до января 2015 г.) – 8, в журналах, индексируемых Scopus и WoS – 4. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит

в обсуждении и постановке задач, выборе и разработке методов исследования, выполнении экспериментов и участии в написании текста статьи. Права соавторов публикаций не нарушены.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 257 источников, из них 218 иностранных. Текст содержит 11 таблиц и 32 рисунка.

Благодарности. Автор выражает особую благодарность научному руководителю, д.б.н. Н.А. Давидовичу за помощь и консультации при постановке цели и задач исследования, обсуждении полученных результатов и изложении текста диссертации; к.б.н. О.И. Давидович за всестороннюю помощь в проведении экспериментальных работ и в процессе работы над рукописью; К.И. Шоренко за помощь в проведении морфологического анализа и всем соавторам за совместные публикации. Соискатель выражает глубокую признательность д.б.н. М.С. Куликовскому, к.б.н. Е.С. Гусеву, к.б.н. Е.И. Мальцеву (ИФР РАН) и С.А. Андреевой (СПбГУ) за многолетнее сотрудничество и помощь в проведении молекулярного и морфологического анализа, к.б.н. А.М. Глущенко (ИФР РАН) за обсуждение текста диссертации, а также всем коллегам, любезно предоставившим для работы пробы из разных водоемов Евразийского континента и клоны представителей рода *Ulnaria*. Автор благодарен администрации Карадагской научной станции за предоставленные условия для выполнения лабораторных работ. Часть данных, использованных в работе, получена при поддержке грантов РФФИ (№14-04-90427, № 15-04-00237, 16-34-00790) и РНФ (№ 14-14-00555).

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая биология диатомовых водорослей

Диатомовые водоросли – широко распространенные микроорганизмы, которых можно найти в любой водной среде, например, в каналах, реках, прудах, водохранилищах, морях и океанах, а также во влажной почве, на растениях и на антропогенных конструкциях. Диатомеи успешно населяют как морские, так и пресные водоемы, и являются доминирующей группой водных организмов в фитопланктоне и перифитоне [41]. Хотя они составляют всего около 1 % фотосинтетической биомассы Земли, диатомовые производят около 45 % от общего объема первичной продукции в океане и имеют большое значение в производстве кислорода (20 %) [97, 118]. Диатомовые водоросли считаются хорошими индикаторами состояния окружающей среды, их высокая производительность и короткий жизненный цикл позволяет обнаруживать кратковременные загрязнения или другие экологические изменения [129]. Панцири отмерших клеток диатомовых могут накапливаться на дне водоемов, играя важную роль как биостратиграфические маркеры палеолетописи [115], а также используются в разработках нефти и газа, и археологических работах [226]. Возможность синтезировать и накапливать в клетках биологически активные вещества делает диатомеи перспективным объектом для массового биотехнологического культивирования, они обладают всеми качествами, чтобы стать альтернативным сырьем для фармацевтики, нанотехнологии, энергетики, биомедицины и экологических технологий [60, 219].

Первые диатомовые, появившиеся на Земле порядка 200 млн. лет тому назад от общего предка *Bolidophyceae* [116], были радиально-центрическими (*Coscinodiscophyceae*). Спустя приблизительно 25 млн. лет процесс эволюции привел к появлению полярности в строении панциря. Для всех современных

радиальных и полярных центрических характерна оогамия. Исключение составляют представители токсариид, например, *Ardissonea crystallina* (С.А. Agardh) Grunow, у которой обнаружен неоогамный тип полового процесса [78]. Пока это единственный установленный случай конвергентной эволюции типов полового процесса у центрических и пеннатных [13]. Первые бесшовные пеннатные диатомеи известны из отложений позднего мела (кампан). Предполагается, что они произошли от биполярных центрических диатомовых [222]. Основной признак бесшовных пеннатных – осевое поле, на апикальных концах которого присутствуют лабиатные выросты. Часто на одном или обоих концах створки присутствует поровое поле. От планктонного образа жизни, характерного для большинства центрических, бесшовные пеннатные перешли к субстратно-связанному. Произошли кардинальные изменения в способе полового воспроизведения: для всех современных пеннатных характерна размерная изогамия [13]. Гаметы у пеннатных диатомовых, в отличие от мужских гамет центрических, лишены жгутиков. Встреча гамет у бесшовных возможна только в том случае, если родительские клетки оказываются на достаточно близком расстоянии.

Приблизительно 135 млн. лет тому назад от бесшовных пеннатных отделилась линия, приведшая к образованию группы шовных пеннатных. У последних проблема доставки гамет к месту сингамии решается самими родительскими клетками – так называемая гаметангиогамия [67].

Считается, что диатомовые водоросли произошли в результате нескольких последовательных актов эндосимбиоза изначально гетеротрофного организма с другими водорослями [52, 181]. В результате в геноме диатомовых, помимо генов гетеротрофного эукариота, внедрены гены симбионтов — зеленых, красных микроводорослей, а также цианобактерий и эукариот [59, 128, 136, 193]. Происхождение диатомей привело к уникальности их биохимического состава [55]: они содержат высокие концентрации фукоксантина [199] и полиненасыщенных омега-3 жирных кислот [40], различные микроэлементы [98].

Хлоропласты диатомовых водорослей характеризуются наличием хлорофиллов *a* и *c* и основных дополнительных пигментов, β -каротин и фукоксантин [243]. Количество и расположение хлоропластов различаются для разных таксонов. Несмотря на то, что количество и форма хлоропластов могут варьироваться на разных стадиях клеточного цикла, Э. Кокс [74] дает ключ к определению пресноводных диатомовых на основе хлоропластов и других органелл клетки, видимых в световой микроскоп. Большинство центрических диатомовых водорослей и некоторые бесшовные пеннатные диатомеи обладают многочисленными небольшими дискообразными хлоропластами. Хлоропласты у большинства пеннатных таксонов большие по размеру и немногочисленные, чаще всего один или два в клетке.

В основу систематики Bacillariophyta изначально были положены морфологические признаки строения кремниевых панцирей [210] – уникальной особенности диатомовых водорослей. Согласно предложенной Раундом с соавторами классификации [210], диатомеи делятся на три класса: центрические (Coccinodiscophyceae), бесшовные пеннатные (Fragilariophyceae) и шовные пеннатные (Bacillariophyceae). В различных филогенетических исследованиях была показана монофилитичность шовных пеннатных диатомей и парафилитичность центрических и бесшовных пеннатных бесшовных [43, 183, 187].

Однако набор морфологических признаков, на которых основана систематика диатомей, относительно небольшой, поэтому были предложены классификации диатомовых водорослей, в основу которых были положены результаты молекулярно-генетического анализа.

Л. Медлин и И. Качмарска в 2004 году [186] предложили классификацию диатомовых водорослей на основе молекулярной филогении, некоторых особенностях цитологии клеток, типах полового процесса, и строения перизониума ауксоспор. В этой системе отдел Bacillariophyta подразделяется на два подотдела: Coccinodiscophytina и Bacillariophytina. Подотдел Coccinodiscophytina с единственным классом Coccinodiscophyceae объединяет

центрических диатомей с радиально-симметричными створками. Подотдел Bacillariophytina включает классы Mediophyceae и Bacillariophyceae. Створки клеток Mediophyceae радиально центрические (у представителей Talassiosirales), би- или мультиполярные.

СМВ-гипотеза (Coccinodiscophyceae/Mediophyceae/Bacillariophyceae) поддерживается не всеми учеными [232, 233]. Возник альтернативный взгляд на систематику диатомовых водорослей, основанный на результатах молекулярно-генетических исследований, а именно, постепенное развитие от центрической к пеннатной симметрии, которое предполагает, что радиально-центрические диатомеи дают начало полярно-центрическим представителям, которые, переходят в бесшовные пеннатные, а те в шовные пеннатные диатомовые водоросли. Существование четырех главных линий эволюции, включая бесшовных пеннатных, поддерживается и другими авторами [42, 52, 195, 253].

Морфологическая, генетическая и экологическая гетерогенности диатомовых водорослей приводят к тому, что по последним оценкам количество их видов может составить около 100 тысяч видов, и они являются одной из самых разнообразных групп среди всех водорослей [156, 171]. При этом наибольшее количество видов содержит группа шовных пеннатных диатомей (около 70 % от всех современных видов диатомей), которая смогла заселить всевозможные экологические ниши. Приобретенная способность к движению и переход к гетероталлическому жизненному циклу рассматриваются как основные эволюционные тренды, способствующие впечатляющему разнообразию шовных пеннатных [194]. При этом группа бесшовных пеннатных содержит всего около 10 % от всех известных видов диатомей. Субстратно-связанный образ жизни, проблема с доставкой гамет к месту сингамии и необходимость наращивать достаточную плотность для успешного полового процесса, очевидно, не позволила им достичь такого разнообразия видов как у шовных пеннатных.

Практическая идентификация диатомовых водорослей на видовом и родовом уровнях основана на морфологии створок. Структуры створки в теории считаются стабильными, тем не менее, морфологическая изменчивость встречается внутри и между клеточными линиями, а также внутри популяций и между ними [142]. Различия в экологических условиях, например, при разной солености или концентрации кремнезема в среде, могут привести к изменению структуры и формы створок [236, 237]. Эта изменчивость может привести к ошибочному заключению о видовом разнообразии диатомей. Например, одними исследователями [217] была показана конспецифичность центрических диатомовых *Cyclotella meneghiniana* Kützinger и *C. cryptica* Reimann, J.C. Lewin & Guillard и сделан вывод о том, что нынешняя таксономическая система переоценивает количество видов (а некоторые текущие таксономические образования представляют экоморфотипы одного вида). Другие исследователи [58] использовали ДНК хлоропластов для анализа образцов из ряда географических пунктов и выявили несколько различных генетических групп, которые можно интерпретировать как отдельные виды, хотя изначально все выделенные клоны были идентифицированы как *C. meneghiniana*. Подобные данные предполагают существование множества неописанных видов.

Различия между центрическими и пеннатными диатомовыми состоят в способе детерминации пола, типах полового процесса и системах скрещивания. Пеннатные диатомовые водоросли являются раздельнополыми организмами, пол у них детерминирован генетическими факторами. Доминирует гетероталлический путь полового воспроизведения с редкими проявлениями гомоталлизма у некоторых видов. У центрических водорослей ввиду эпигенетической детерминации пола система скрещивания допускает гомоталлизм, хотя в природных популяциях, по-видимому, происходит перекрестное оплодотворение [14].

Жизненный цикл диатомовых водорослей включает в себя две основные фазы: длительную вегетативную фазу, длящуюся от нескольких месяцев до нескольких лет, в течение которой клетки делятся митотически, и сравнительно

короткую фазу, которая включает в себя половое воспроизведение (гаметогенез и оплодотворение), за ним следует процесс формирования ауксоспор и инициальных клеток, приводящий к появлению новых поколений вегетативных клеток (рисунок 1.1).

Диатомовые являются диплоидными гапобионтами. В течение вегетативной фазы клетки диатомовых диплоидны, редукция числа хромосом происходит в процессе формирования гамет в результате мейотического деления, как было установлено основополагающими исследованиями Карстена [133, 134], а также подтверждено другими исследователями [72, 106, 110, 113, 134]. Гаметы существуют сравнительно короткое время, по сравнению с общей

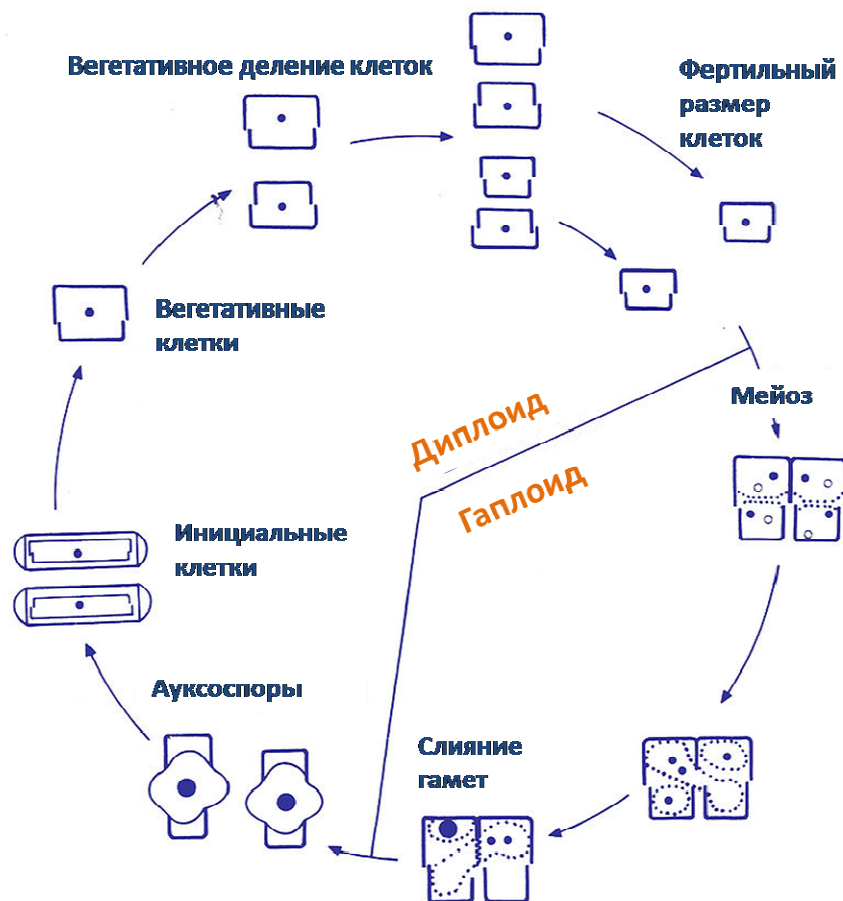


Рисунок 1.1 — Жизненный цикл пеннатных диатомовых водорослей [88]

продолжительностью жизненного цикла. Переход из вегетативной в генеративную фазу жизненного цикла у диатомовых обусловлен достижением клетками критических размеров, которые Л. Гайтлер [107, 111] назвал кардинальными пунктами в жизненном цикле (минимальные и максимальные размеры клеток и размеры, соответствующие верхней и нижней границам диапазона ауксоспорообразования). Размер клеток (апикальная длина у пеннатных и диаметр панциря у центрических диатомей) является внутренним негенетическим фактором, контролирующим смену фаз жизненного цикла [90]. При этом переход к половому воспроизведению для большинства диатомовых является обязательным в связи с необходимостью восстановления размеров клеток, уменьшающихся в процессе вегетативных делений [67, 91, 210]. В период вегетативной фазы жизненного цикла клетки диатомовых водорослей делятся надвое, и, поскольку они несут защитный кремнеземный панцирь, состоящий из двух створок, одна из которых накрывает другую как крышка в коробке ("коробочная" модель), – каждой из дочерних клеток достается одна половинка. Вторая недостающая часть достраивается, причем происходит это внутри уже имеющейся створки. Как следствие, после деления одна клетка имеет такой же размер, что и родительская, а вторая оказывается немного меньшей [15]. Такое явление наблюдается за редкими исключениями [209] у подавляющего числа видов диатомовых. Однако, у некоторых видов, например, у центрической *Thalassiosira pseudonana* (Hustedt) Hasle & Heimdal и пеннатной *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, для которых впервые был полностью отсекут геном [51, 59], несмотря на длительное изучение, не наблюдали проявлений сексуальности [15]. Таким образом, по прошествии многих делений клетки становятся критически маленькими. Избежать продолжающегося уменьшения размеров клетки диатомеи могут путем формирования в процессе полового воспроизведения инициальных клеток, имеющих максимальные видоспецифические размеры. Изложенная схема уменьшения и восстановления размеров в жизненном цикле была описана в конце 19 века [155, 200] и носит название правила МакДональда-Пфитцера.

Половое воспроизведение у диатомовых водорослей имеет несколько преимуществ: 1) благоприятствует генетической рекомбинации, что позволяет избежать накопления вредных мутаций и благоприятствует сохранению полезных мутаций; 2) повышает гетерозиготность популяций; 3) восстанавливает максимальный размер клеток [210].

Существует несколько типов полового процесса. Оогамия обычно противопоставляется неоогамным типам [90]. В наиболее полной классификации, представленной Л. Гайтлером [105], у пеннатных диатомей в зависимости от количества родительских клеток (гаметангиев), участвующих в процессе, и количества продуцируемых каждым из них гамет, были выделены: 1) нормальный тип (в процессе участвуют два гаметангия, каждый производит по две гаметы), 2) редуцированный тип (два гаметангия, в каждом формируется по одной гамете, в то время как вторая дегенерирует), 3) аутомиксис (все происходит в пределах одного гаметангия, при этом формируются две гаметы, затем они сливаются – педогамия; либо процесс касается только ядерных превращений без деления протопласта – аутогамия), 4) апомиксис – фактически бесполое воспроизведение, однако приводящее к формированию ауксоспоры [15]. Оогенез у центрических бывает трех типов: тип 1, когда формируются две яйцеклетки, в каждой одно функциональное и одно пикнотическое ядро; тип 2 – формируются яйцеклетка, несущая функциональное и пикнотическое ядро, и остаточное тело; тип 3 – только одна яйцеклетка с одним функциональным и двумя пикнотическими ядрами. При сперматогенезе вначале следует серия дифференцирующих митозов, превращающая мужские клетки в сперматогонии. После финального митоза сперматогоний становится сперматоцитом, а затем начинается собственно сперматогенез, который может быть гологенным или мерогенным [15, 90].

Ключевыми факторами, способствующими инициации полового процесса, выступают, помимо размера клеток, наличие полового партнера (при гетероталлическом воспроизведении), плотность клеток и условия среды: температура, условия освещения (интенсивность, фотопериод, спектр

излучения) [15, 16, 192]. Если вести речь о стимуляции воспроизведения в лабораторных условиях, то она может быть достигнута действием одного фактора или совокупности нескольких факторов. В культурах половое воспроизведение наблюдается только в том случае, если клетки находятся в экспоненциальной фазе роста.

1.2 Жизненный цикл и половое воспроизведение бесшовных пеннатных диатомовых водорослей

Представители бесшовных пеннатных диатомовых встречаются в виде одиночных клеток или в колониях (лентовидных, звездчатых, зигзагообразных, часто прикрепленных к поверхности с помощью слизистой подушечки на одном конце клеток). Обитают в перифитоне, эпипсаммоне, эпифитоне, эпипелоне, эпидендроне и, реже, планктоне [140].

Большинство бесшовных диатомовых водорослей гетероталлические, но у многих из них гетероталлизм совмещается с гомоталлизмом. Например, у *Grammatophora marina* (Lyngbye) Kützing аукоспорообразование может происходить в результате как гетероталлического, так и гомоталлического полового процесса без копуляции гамет [212]. Исключительный гомоталлизм описан, например, для *Synedra vaucheriae* (Kützing) Kützing (= *Fragilaria vaucheriae* (Kützing) J.B. Petersen) [67].

При гетероталлическом воспроизведении у большинства бесшовных пеннатных в гаметангиях образуется по две гаметы как, например, у представителей родов *Licmophora* C.A. Agardh [32, 34, 66], *Striatella* C.A. Agardh [34], *Rhabdonema* Kützing [228, 230]. Исключение составляет, например, *Grammatophora marina* (Lyngbye) Kützing, для которой показано образование по одной гамете и остаточному телу в гаметангии [67]. Гаметангии не образуют пару, поэтому располагаться могут по-разному: как параллельно, так и перпендикулярно, так и под углом друг к другу. У субстратно-связанных

диатомей гаметогенез происходит в пучках, в которых может находиться от нескольких до десятков клеток. В отличие от многих шовных пеннатных, гаметангии бесшовных диатомовых не образуют копуляционных трубок и в большинстве случаев не покрываются слизистой капсулой.

Бесшовные диатомовые водоросли проявляют анизогамию: сливающиеся гаметы различаются морфологически и/или поведенчески, как, например, у *Tabularia tabulata* (C.A. Agardh) Snoeijis [83], *Striatella unipunctata* (Lyngbye) C.A. Agardh и *Licmophora abbreviata* C.A. Agardh [34]. В основном у бесшовных диатомовых можно наблюдать цис-анизогамию, при которой в одном из гаметангиев образуются неподвижные (пассивные, "женские") гаметы, в другом – активные (мигрирующие, "мужские") гаметы, которые покидают родительские панцири и перемещаются к пассивным гаметам для слияния.

Механизмы движения активных гамет различны. Фон Штош [228] отмечал амебоидоподобное движение мужских гамет *Rh. adriaticum* (Lyngbye) Kützing. У некоторых видов бесшовных диатомей родительским клеткам необходимо очень близко примыкать друг к другу, в этом случае гаметы могут достигать места сингамии, как, например, у *L. communis* (Heiberg) Grunow [34, 66]. В своей работе А.М. Рощин [34] показал, что половой процесс *L. communis* начинался только в том случае, если расстояние между створками гаметангиев было достаточно мало для того, чтобы его смогла преодолеть гамета. Если же расстояние между створками было больше суммарной длины гаметангиальных клеток, то они продолжали вегетативное деление. У *Pseudostaurosira trainorii* Е.А. Morales, *T. tabulata* отмечено образование псевдоподиальных выростов, обеспечивающих движение гамет [81, 214].

У пеннатных диатомовых водорослей было показано выделение клетками феромонов, которые стимулируют гаметогенез у репродуктивно совместимых клонов [138, 214]. У бесшовной пеннатной диатомеи *P. trainorii* происходит ступенчатая стимуляция гаметогенеза [214].

После сингамии, если произошло слияние гамет из двух близкорасположенных гаметангиев, образуется по две зиготы. Ауксоспора –

"прорастающая спора" – растущая клетка на этапе от момента, когда зигота трогается в рост, до момента, когда внутри нее заканчивается формирование инициальной клетки. Обычно ауксоспоры являются результатом полового процесса [12]. Ауксоспоры у бесшовных пеннатных обычно не имеют тесной связи с теками материнской гаметангиальной клетки и могут располагаться по-разному (параллельно друг другу, между гаметангиями, перпендикулярно к гаметангиям). Формирование ауксоспоры связано с разрывом оболочки зиготы и построением специфического кремнеземного "скелета" – перизониума. У пеннатных он устроен наиболее сложно состоит из поперечных и продольных, или только поперечных или же продольных кремниевых элементов, придающих ауккоспоре видохарактерную форму [210]. Рост ауккоспоры начинается с образования композитной кремний-органической стенки, состоящий из органической матрицы, в которую встроены чешуйки кремнезема. Удлинение происходит за счет прогрессивного формирования поперечного перизониума, который представляет собой серию колец кремнезема, откладывающихся по обеим сторонам первичного кольца. После образования поперечного перизониума образуется серия продольных полос (продольный перизониум), как, например, у *Rh. arcuatum* [228], хотя они не были найдены у *Rh. adriaticum* Kützing [229]. У *Gephyria media* Walker-Arnott образуется структура перизониума несколько иная, авторы описали ее как "удлиненную раскидистую структуру", по функциям схожую с продольными полосами [212]. Продольный перизониум *Rh. arcuatum* – неразветвленная структура, удлиненная раскидистая структура *G. media* состоит из множества силикатных фрагментов. Продольный перизониум шовных пеннатных часто больше по ширине по сравнению с бесшовными (например, *Navicula ulvacea* (Berkeley ex Kützing) Cleve [157] и сильно силикатизирован (например, *Diploneis papula* (Schmidt) Cleve [126] и *Rh. curvata* [168]). Функция этих полос неясна, возможно, они облегчают выход инициальной клетки и играют важную роль в укреплении стенки ауккоспоры в продольном направлении. После окончания процесса роста внутри ауккоспоры образуется эпитека и гипотека

инициальной клетки, размеры которой обычно приближаются к максимальным видоспецифическим. Формирование тек инициальной клетки сопровождается ацетокинетическим митозом. Инициальная клетка приступает к вегетативному делению и дает начало новому клону с уникальной генетической комбинацией.

1.3 История изучения представителей рода *Ulnaria*

Род *Ulnaria* относится к семейству Ulnariaceae порядка Licmophorales, подкласса Fragilariophycidae, класса Bacillariophyceae, отдела Bacillariophyta [117]. Род *Ulnaria* (Kützinger) Compère был выделен из большого и гетерогенного рода *Synedra* Ehrenberg [73]. При изначальном описании рода *Synedra* не был выбран типовой вид [94], поэтому возникла неоднозначность таксономической интерпретации истории рода и его современной ревизии [21]. Позже к этому роду были отнесены четыре вида (*Synedra fasciculata* Ehrenberg, *S. lunaris* Ehrenberg, *S. bilunaris* Ehrenberg, *S. balthica* Ehrenberg) [95]. *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg был описан как *Bacillaria ulna* Nitzsch (рисунок 1.2) и переведен из рода *Bacillaria* J.F. Gmelin [95]. Из них один вид должен был стать типовым видом для рода *Synedra* [73, 95]. *Bacillaria ulna* Nitzsch была выбрана в качестве лектотипа рода *Synedra* [57], однако в первой статье с описанием рода *Synedra* этот вид был переведен Х. Эренбергом [94] в род *Navicula* Bory как *Navicula ulna* (Nitzsch) Ehrenberg. Это, по мнению П. Компера, не позволяет рассматривать этот вид в качестве составляющей протолога рода *Synedra*. Поэтому *Bacillaria ulna* не может быть типом, поскольку вид не может одновременно принадлежать двум родам — *Navicula* и *Synedra*. Среди других четырех видов *S. fasciculata* был перекомбинирован Ф. Кютцингом в *S. dissipata* Kützinger и позже переведен Grunow в род *Nitzschia* Hassall [73]. *S. lunaris* и *S. bilunaris* переведены Grunow (1865) в род *Ceratoneis*, а позже — в род *Eunotia* Ehrenberg. *S. balthica* была синонимизирована Ehrenberg (в качестве таксономического синонима) с *S. gaillonii* (Bory) Ehrenberg и только этот вид

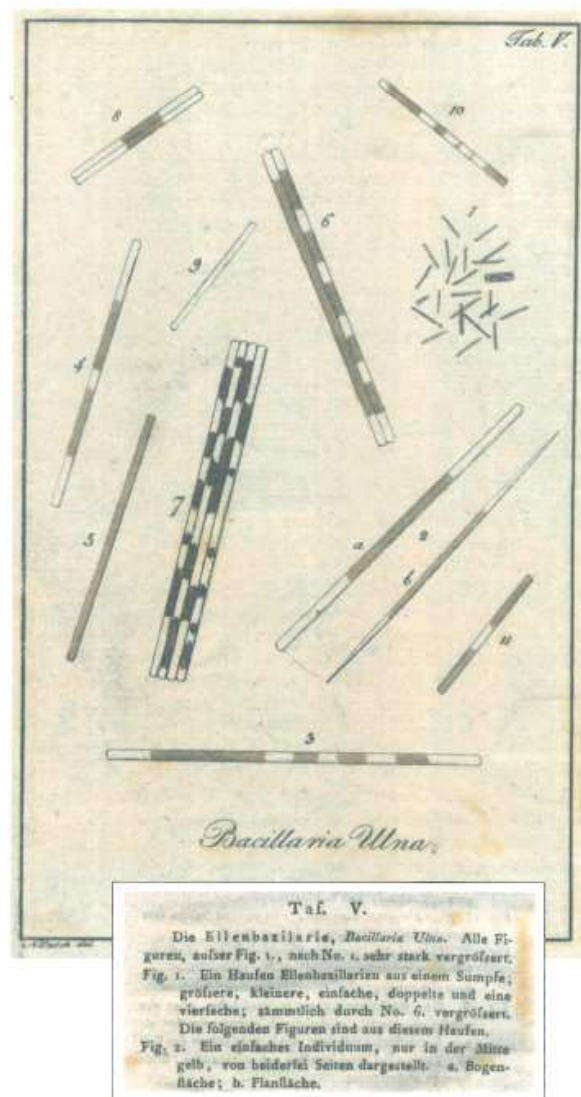


Рисунок 1.2 — *Bacillaria ulna* [148]

может быть использован в качестве лектотипа для рода *Synedra* [73]. Д. Вильямс [254] указал на то, что использование *Synedra*, за исключением *S. gaillonii*, как родового названия для группы видов, включающих *S. ulna*, требует консервации. Однако, это не было выполнено, и род *Synedra* типифицирован *S. balthica* [73].

В конце восьмидесятих годов прошлого века Д. Вильямсом и Ф. Раундом были проведены ревизии родов *Fragilaria* и *Synedra*, основанные на данных электронной микроскопии [210, 254, 255]. Результаты этих исследований были включены в фундаментальную сводку по родам диатомей [210] и дополнены впоследствии другими исследователями. В системе Ф. Раунда с соавторами

[210] бесшовные диатомеи рассматриваются как класс *Fragilariophyceae*, включающий 1 подкласс и 12 порядков, при этом пресноводные роды относятся только к 2 порядкам: *Fragilariales* и *Tabellariales*, в каждом из которых выделяют по 1 семейству – *Fragilariaceae* и *Tabellariaceae* соответственно. Наиболее существенному пересмотру подверглись таксоны родового ранга. Раньше объем рода *Synedra* понимали широко: к нему относили морские, солоноватоводные и пресноводные виды с линейными или ланцетными створками, структура которых представлена поперечными параллельными штрихами. Главным отличием рода *Synedra* от *Fragilaria* считалось то, что клетки *Synedra* никогда не бывают собраны в лентовидные колонии.

Для большинства видов рода *Synedra sensu stricto* характерно отсутствие краевых соединительных шипов (у некоторых видов над апикальными поровыми полями располагается по два коротких рога). Один вид (*Synedra ungeriana* (Grunow) D.M. Williams, syn. *Fragilaria pseudogaillonii* Kobayasi & Idei) формирует лентовидные колонии при помощи шипов [139, 254]. Штрихи однорядные или многорядные, оппозитные, состоят из простых округлых или удлинённых ареол, апикальные поровые поля очень хорошо развитые. Римопортулы располагаются на концах створки, их всегда два на створке. Элементы пояса перфорированные, закрытые. Данный род включает только пресноводные виды [210, 223]. Поскольку Х. Эренберг, впервые описавший род *Synedra*, не указал типового вида, единственно правильным с точки зрения Международного Кодекса Ботанической Номенклатуры [180] является выбор *Synedra balthica* Ehrenberg (морской вид с альвеолированными штрихами) в качестве лектотипа [144, 191]. Однако Д. Вильямс и Ф. Раунд [210, 254] при проведении ревизии придерживались неправильного выбора *S. ulna* (Nitzsch) Ehrenberg в качестве лектотипа рода *Synedra* и описали новый род *Catacombas*, типифицировав его видом *Navicula gaillonii* Bory (= *Synedra balthica* Ehrenberg). Таким образом, два родовых названия оказались основанными на одном типе. Эту проблему разрешил П. Компер [73], повысив до родового ранга название *Synedra* subgen. *ulnaria* Kützinger и выбрав вид *Synedra ulna* в качестве типа

нового рода. Следовательно, правильным родовым названием для *Synedra* sensu D.M. Williams & Round является *Ulnaria* (Kützing) Compère, а для *Catacombas* D.M. Williams & Round – *Synedra* Ehrenberg.

Номенклатурная история *Fragilaria* / *Synedra-Ulnaria* характеризовалась долгими и "застойными спорами" [256]. Образование колоний очень распространено среди бесшовных диатомовых водорослей и обычно встречающиеся у видов, наблюдаемых в планктоне рек и озер [143, 210]. Эти колонии могут иметь разные формы: от звезд до длинных лент, пучков или зигзагов [210]. Отдельные клетки в эти колонии соединяются друг с другом через слизевые подушечки, сформированные на апикальных поровых полях или путем соединительных шипов. Последние обычно образуют очень длинные колонии. Ленточные колонии, часто состоящие из сотен клеток, и в основном наблюдаются у родов *Staurosira* Ehrenberg, *Staurosirella* D.M. Williams & Round и *Fragilaria* Lyngbye [240]. Типичные колониобразующие виды *Fragilaria* включают *Fragilaria rumpens* (Kützing) G.W.F. Carlson, *F. crotonensis* Kitton, *F. capucina* Desmazières, а также *F. mesolepta* Rabenhorst [122, 148, 238]. Предполагалось, что способность образовывать лентообразные колонии является главным отличием рода *Fragilaria* sensu stricto от *Ulnaria*. В прошлом таксоны, образующие ленточные колонии были отнесены к *Fragilaria*, тогда как одиночные таксоны были включены в *Synedra* [254]. Однако, как показывают современные исследования, несколько видов *Ulnaria* также имеют соединительные шипы: *U. ungeriana* (Grunow) Compère, *U. pseudogailloni*, *U. cochabambina*, *U. sinensis* [63].

Признаком, который все еще работает без исключений для дифференциации указанных родов, является наличие закрытых поясных полос у *Ulnaria*, по сравнению с открытыми поясными полосами у *Fragilaria* [152, 153]. Своеобразная структура зрелых вирг, соединенных виминами, также типична для *Ulnaria* (хотя это относится только к видам с однорядными штрихами) [241, 242].

Краткое изложение морфологических признаков видов рода *Ulnaria* включает: створки формой от линейных до ланцетных с однорядными, реже – двухрядными штрихами, два апикальных поровых поля и римопортулами (двугубыми выростами), множественные закрытые поясковые полосы и пластинчатые пластиды, прижатые к поясу [239].

Молекулярные филогении с использованием четырех генов показывает слабую разницу между родами *Fragilaria* и *Ulnaria* (2,5 %), что может как показывать, что они являются сестринскими таксонами, так и являться недостаточным для обоснования морфологического разделения на основе известных характеристик [184]. Нет логической причины, по которой какая-либо процентная разница, большая или маленькая, является значимой мерой для разделения таксонов, процентные различия не имеют никакого отношения к природе конкретной морфологической синапоморфии. Отношения родов *Synedra* + *Tabularia*, *Ulnaria* + *Fragilaria* и *Thalassionemataceae*, взятые вместе по последним данным могут быть более точно определены как *Ulnariaceae* [257].

В настоящее время известно 45 видов рода *Ulnaria* [117], типовым видом является *U. ulna* (Nitzsch) Compère. Род *Ulnaria* включает широко распространенные и многочисленные экологически значимые виды.

Состояние таксономии *Ulnaria ulna* sensu lato (Nitzsch) Compère 2001 (синонимы: *Bacillaria ulna* Nitzsch 1817; *Navicula ulna* (Nitzsch) Ehrenberg 1830; *Frustulia ulna* (Nitzsch) C.A. Agardh 1831; *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg 1832; *Exilaria ulna* (Nitzsch) Jenner 1845; *Fragilaria ulna* (Nitzsch) Lange-Bertalot 1980) остается неудовлетворительным для практикующих исследователей и в настоящее время. Основная масса форм *U. ulna* представляет собой очень разнородную группу с плохо описанной и трудно различимой морфологией. Произведена эпитипификация вида, которая является значительным вкладом в распутывание видового комплекса и разделения его на более точно определенные виды и, может быть, даже роды [148].

Вид *Ulnaria ulna* широко распространен в пресных и солоноватых водоемах Европы (Андорра, Великобритания, Германия, Европейская часть России, Ирландия, Исландия, Испания, Португалия, Польша, Румыния, Франция, Швеция), Азии (Азиатская часть России, Израиль, Индия, Ирак, Иран, Китай, Корея, Непал, Пенджаб, Сингапур, Таджикистан, Тайвань, Турция), Северной Америки (Мексика, Канада, США), Южной Америки (Аргентина, Бразилия, Колумбия), Африки (Гана, Египет), Австралии, Новой Зеландии, Гавайских островов, а также в Адриатическом и Балтийском морях [117].

"Истинная природа" *U. danica* Compère & Bukhtiyarova 2006 (синонимы: *Synedra danica* Kützing 1844; *S. ulna* var. *danica* (Kützing) Grunow 1885; *S. ulna* f. *danica* (Kützing) Hustedt 1957; *S. ulna* subsp. *danica* (Kützing) Skabichevskij 1959; *Fragilaria ulna* var. *danica* (Kützing) Kalinsky 1982; *F. ulna danica* (Kützing) Lange-Bertalot 1996) еще не совсем ясна, и в литературе существуют различные концепции "вторых рук", когда предпринимаются попытки выполнить типификацию вида по имеющимся неполным описаниям [149, 198, 244]. Независимо от отсутствующей фотографической документации типа *Synedra danica* и, следовательно, недостающих знаний его морфологии, была дана следующая характеристика вида: длина – 170 мкм, ширина створки 5 мкм, частота штрихов 9 в 10 мкм, похож на *U. delicatissima* (W. Smith) M. Aboal & P.C. Silva [148]. *U. danica*, как и *U. ulna*, некоторыми авторами считается видом-космополитом [22].

Название *Ulnaria acus* Kützing 1844 (синонимы: *Synedra acus* Kützing 1844; *S. oxyrhynchus* var. *acus* (Kützing) Kirchner 1878; *S. affinis* var. *acus* (Kützing) Grunow 1881; *S. gouldardi* var. *acus* (Kützing) Frenguelli 1925; *Fragilaria ulna* var. *acus* (Kützing) Lange-Bertalot 1980; *F. ulna* f. *acus* (Kützing) Krammer & Lange-Bertalot 1991; *F. acus* (Kützing) Lange-Bertalot 2000; *U. ulna* var. *acus* (Kützing) Compère) обычно относится к широко-распространенным пресноводным видам, и, если исходить из многочисленных публикаций, встречается почти везде при соответствующих условиях [148, 63, 64]. Однако

недавно было отмечено что, несмотря на очевидную повсеместность, общее понимание вида было "в значительной степени непоследовательным и на самом деле слишком широким" [148, с. 59.] Х. Ланге-Берталот и С. Ульрих [148] предложили более узкое определение *U. acus*, основанное на неотипификации вида. При первом описании Ф. Кютцинг поместил *S. acus* (рисунок 1.3) в подгруппу ("подрод") *Tabularia* Kützing, наряду с *S. barbatula* Kützing и десятью другими таксонами [147]. Большинство видов *Tabularia* обитают в морских или солоноватых водах [147]. *S. acus*, который в соленой воде не встречался, в этой связи, а также по номенклатурным причинам был перенесен в полностью пресноводный род *Ulnaria* (2001).

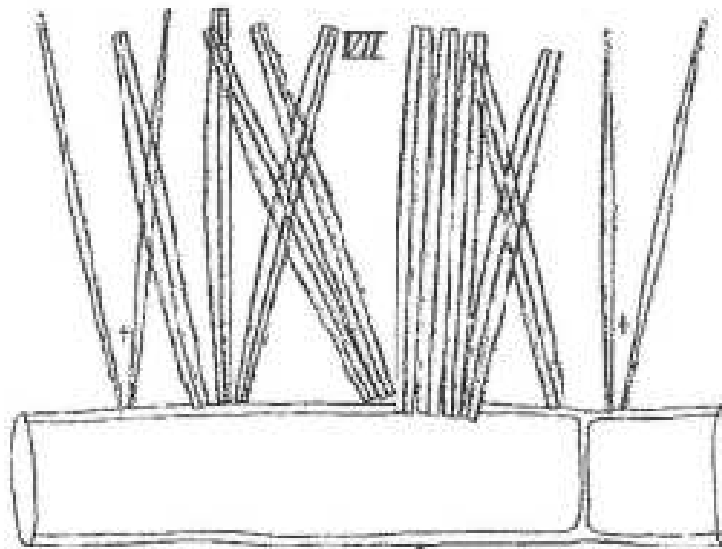


Рисунок 1.3 — *Ulnaria acus*, оригинальный рисунок [147]

Половое воспроизведение было изучено Л. Гайтлером только у одного представителя рода – *U. ulna* на живом и фиксированном материале, собранном в природной популяции [107, 108]. Было показано, что образование ауксоспор происходит в очевидной связи с внешними условиями. По описанию Л. Гайтлера каждая материнская клетка образовывала две гаметы, в которых наблюдались полярно расположенные сократительные вакуоли. В типичном случае гаметы отделялись от материнских створок и перемещались к гаметам

партнерской клетки, в которой впоследствии образовывались зиготы. В отличие от других, изученных к тому времени видов, в одной материнской клетке формировались либо блуждающие гаметы, либо покоящиеся. В случае аутомиктической копуляции гаметы вели себя физиологически изогамно. Зиготы были прикреплены к материнским створкам посредством слизи.

Другие детали процесса полового воспроизведения, механизм перемещения гамет, а также система скрещивания и закономерности определения пола у видов рода *Ulnaria* остались неизученными.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Места отбора проб

В настоящей работе был использован материал, собранный из пресноводных водоемов, расположенных на территории Евразийского и северной части Африканского континентов (Рисунок 2.1).

Клетки, относящиеся к морфотипу *U. ulna* были изолированы из проб,

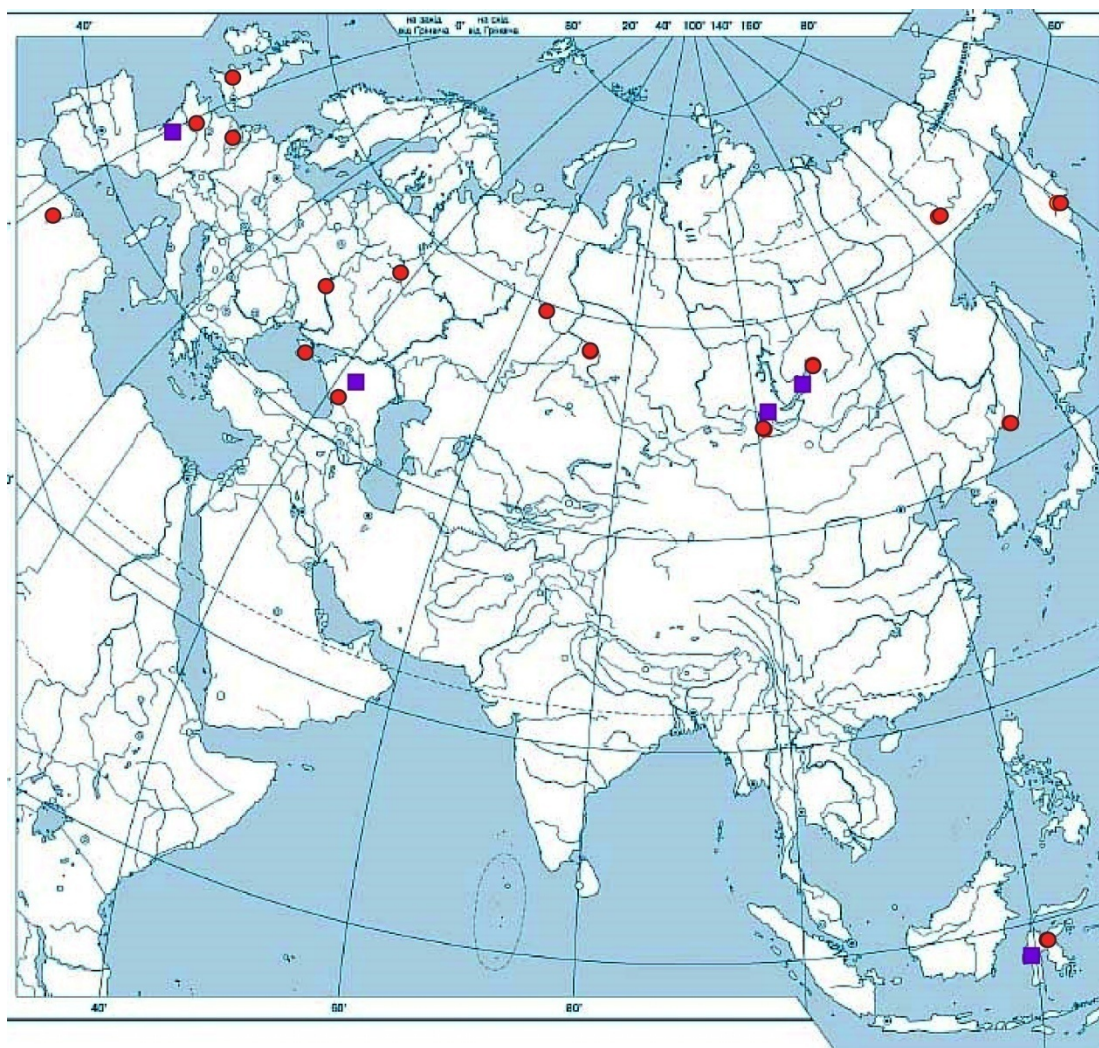


Рисунок 2.1 — Карта отбора проб. Красными кружками отмечены виды из комплекса *Ulnaria* cf. *ulna*; фиолетовыми квадратами – *U. acus*

отобранных с 2009 по 2020 года в следующих водоемах: маленькой речке в г. Кардифф (Великобритания), канале г. Гент (Бельгия), р. Сарт (La Sarthe), г. Ле-Ман (Франция), р. Днепр, г. Киев (Украина), горном ручье в Крыму, Москvereке, г. Звенигород, р. Адуй, Обь, Бия, Суходол, Артемовка, оз. Байкал, Фролиха и Лабынқыр, горячих источниках на полуострове Камчатка (Россия), оз. Матано (Индонезия) и водоемах провинции Айн-Сефра (Aïn Séfra, Алжир, Африка).

Клоны *U. acus* были выделены из проб, отобранных в р. Эрдр (L'Erdre), г. Нант (Франция), оз. Рица (Абхазия), оз. Байкал и Фролиха (Россия), оз. Матано (Индонезия) с 2015 по 2020 годы.

2.2 Отбор проб и выделение клонов

Отбор планктонных проб производили малой планктонной сетью Джеди (диаметр входного отверстия сети 32 см, ячей газ-сита 74 мкм, изготовленного из синтетических нитей, ГОСТ 4403-91, ЗАО "Рахмановский шелковый комбинат", Россия). Сбор обрастаний с различных субстратов (гальки, камней, ветвей растений и т.п.) осуществляли в виде соскоба, а также прямого забора макрофитов и донных осадков в пластиковые пробирки. Пробы заливали водой из изучаемого водоема для доставки в лабораторию в живом виде.

Клетки для клоновых культур выделяли микропипеточным методом [48]. Для этого использовали микропипетки Пастера, которые нагревали в пламени спиртовки и вытягивали до получения микрокапилляра. Одиночную клетку, захваченную микропипеткой из пробы, многократно перемещали из капли в каплю чистой среды, таким образом очищая от сопутствующих организмов. Для переноса в каждую следующую каплю использовали новую микропипетку. В итоге получали "чистый" клон, которому давали название. Для наименования клонов нами принято следующее обозначение [10]:

Gs (Loc) Y.MMDD-Z,

где G – первая буква в названии рода (Genus, например, U - *Ulnaria*), s – первая буква видового названия (species, например, a – *acus*), Loc – сокращенное обозначение места отбора проб (locality, например, LB – Lake Baikal), Y – последняя цифра года создания клона (в некоторых случаях может отсутствовать), MM – номер месяца, DD – дата, Z – буквенное обозначение, представляющее собой собственное имя клона. Название вида и/или место отбора проб из обозначения могут опускаться, если не требуется или из контекста понятна принадлежность клона.

Принятый порядок обозначений обеспечивает уникальность имени клонов, единообразие в системе обозначений, хронологический порядок, возможность автоматической сортировки имен.

2.3 Культивирование

Культуры содержали в среде, близкой по составу к среде Dm [53, 174]. Рецепт среды, используемой нами, приведен в таблице 2.1. Тиосульфат натрия добавлен нами в среду после проведения серии экспериментов по его влиянию на вегетативное деление и половое воспроизведение разных видов диатомовых водорослей [29]. Модификация среды заключалась также в увеличении концентрации силиката натрия и добавляемых витаминов B₁ и B₁₂.

Приготовленную среду разливали в герметично закрываемые емкости и подвергали тиндализации (трехкратной с суточным интервалом пастеризации) при температуре 64 °С. Такая среда может храниться в герметично закрытых сосудах в течение нескольких месяцев.

Культивирование проводили в стеклянных чашках Петри диаметром 5–9 см, высотой 0,9–1,4 см при наполнении средой от 8 до 45 мл соответственно размеру чашки или в колбах емкостью 100 мл. Экспоненциальную фазу роста в

Таблица 2.1 — Состав среды Dm

	Состав среды	Количество по прописи, мг/л	Имеющийся раствор, г/л	Для 10 л, мл
1	$\text{Ca}(\text{NO})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20,00	57,56	3,0
2	KH_2PO_4	12,40	10,4	9,0
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25,00	37	6,8
4	NaHCO_3	15,90	12,6	12,6
5	Na_2EDTA	2,25	2,25	8,0
6	H_3BO_3	2,48	2,3	10,0
7	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,39	1,39	10,0
8	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,00	1,48	1,0
9	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	57,00	15	30,0
10	FeCl_3	1,60	1,77	9,0
11	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	-	400,00	10,0
12	Цианокобаламин (витамин B_{12})	0,04	Амп. 0,05 %/100 мл	10,0
13	Тиамин гидрохлорид (витамин B_1)	0,04	Амп. 5 %/100 мл	2,0

чашках Петри поддерживали еженедельным пересевом в свежую питательную среду.

Чашки и колбы с культурами содержали в лаборатории водорослей и микробиоты [10] в изолированной комнате с постоянной температурой $20 \pm 2^\circ\text{C}$ на полках у окон, обращенных на север, – таким образом, обеспечивали естественное освещение. Эксперименты по скрещиванию клонов, изолированных из водоемов, расположенных на севере Евразийского континента, ввиду их относительной холодолюбивости, проводили при температуре $14\text{--}16^\circ\text{C}$.

При пересевах моноклоновые культуры постоянно просматривали под микроскопом на предмет обнаружения случаев гомоталлического воспроизведения.

2.4 Постановка экспериментов по скрещиванию

Для скрещивания использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста. Скрещивание проводили в чашках Петри диаметром 5 см. Результаты оценивали на 2–6 сутки после скрещивания. При скрещивании двух клонов смешанный посев обозначается квадратными скобками и знаком "+", например, [Y.MMDD-A + Y.MMDD-B]. Клон, полученный в результате гетероталлического воспроизведения в смеси пары клонов, обозначается как [Y.MMDD-A + Y.MMDD-B] = Y.MMDD-C, или кратко [A + B] = Y.MMDD-C. Клон, полученный в результате внутриклонового (гомоталлического) воспроизведения, обозначается как [Y.MMDD-A + intra] = Y.MMDD-C. Обильность воспроизведения оценивали в баллах: 0 – воспроизведения не было, 1 – единичные случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования, 2 – случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования встречаются часто, но их нельзя назвать массовыми, 3 – массовое ауксоспорообразование.

Было проверено взаимодействие клеток – половых партнеров, посеянных на удалении друг от друга. Для этого в чашки диаметром 7 см клоны противоположного пола и разного размера помещали диаметрально противоположно (рисунок 2.2 А) так, чтобы нараставшие клетки через несколько дней приходили в соприкосновение по середине чашки (рисунок 2.2 Б). Подсчет относительного количества генеративных клеток проводили по диаметральной трансекте чашки с шагом в 5 мм (рисунок 2.2 В). На каждом шаге на отрезке 30 мм поперек трансекты просчитывались клетки на 10–15 полях зрения.

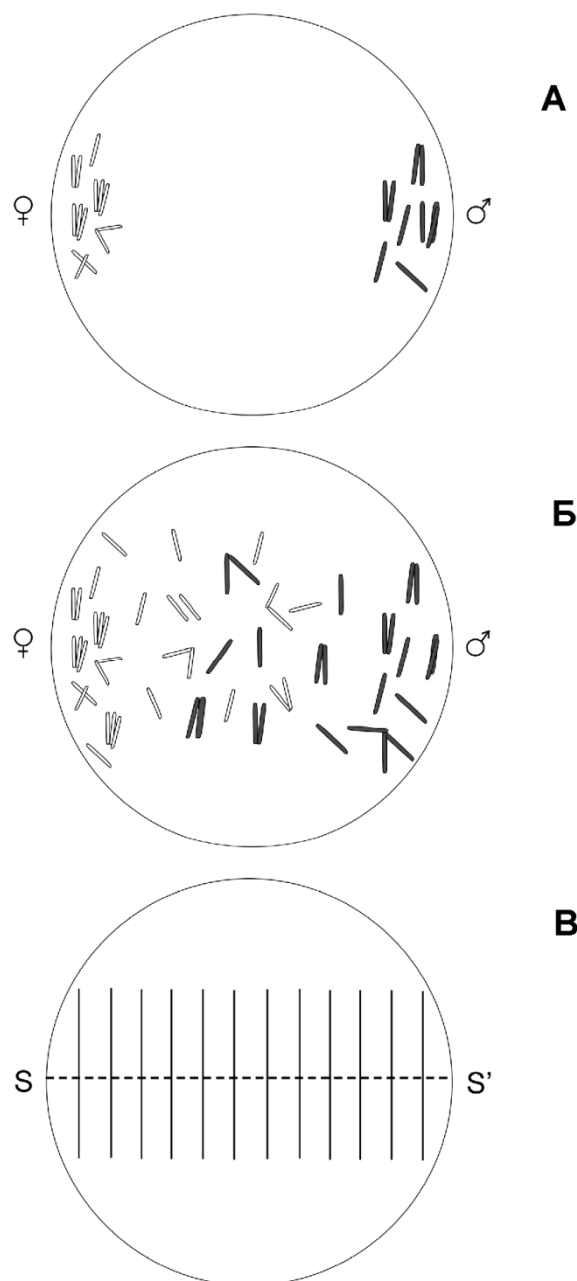


Рисунок 2.2 — Схема эксперимента, проводимого для проверки возможности взаимодействия клеток – половых партнеров, посеянных на удалении друг от друга: А – клетки мужского и женского пола посеяны напротив друг друга, не допуская их смешивания; Б – через 5–6 суток вегетативно размножившиеся клетки обоих полов пришли в соприкосновение друг с другом; В – схема подсчета клеток: S–S' – диаметральная транссекта вдоль которой происходил подсчет вегетативных и генеративных клеток в 10 полях зрения (Р) на поперечных отрезках (на рисунке поля показаны только для одного из отрезков) [202]

Для определения активности полового воспроизведения подсчитывали количество половых клеток по отношению к общему количеству клеток в поле зрения. К половым или генеративным клеткам относили гаметы, зиготы, ауксоспоры, инициальные клетки. Результат выражали в процентах. Данные получены на основании трех повторных экспериментов.

2.5 Микроскопия

Подготовка для микроскопии (СМ, СЭМ) заключалась в очистке панцирей диатомовых от органического вещества, для чего суспензию клеток вываривали в 30 % перекиси водорода на электроплитке в химических стаканах в течение 6–8 часов. После этого полученный материал заливали дистиллированной водой, осаждали посредством центрифугирования или отстаивания (более 6 часов) и декантировали. Процедуру промывки повторяли не менее семи раз.

Для наблюдения использовали микроскоп МБС-9 (Россия), инвертированные микроскопы Nib-100 (Китай), БиОптик (Китай), и прямой микроскоп Biolar PI (PZO, Польша). В последнем случае применяли водоиммерсионный объектив х40, числовая апертура 0,65. Микроскопы настраивались по методу светлого поля или дифференциально-интерференционного контраста и освещении по Келеру [37]. Фотографии выполнены с помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot A640. Для измерений объектов на фотографиях использовали программное обеспечение Carl Zeiss Imaging Systems, Release 4.7 и программу ImageJ v.1.43d (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). В ряде случаев для измерения клеток использовали окулярную линейку, калиброванную по объект-микрометру.

Для приготовления препаратов для сканирующей электронной микроскопии несколько капель суспензии очищенных от органического вещества панцирей водорослей наносили на отполированную поверхность

металлического столика. После полного испарения воды столик помещали в ионную напылительную установку Eiko IB 3, для напыления тонкого проводящего слоя золота (50 нм). Изображения панцирей получали в центре коллективного пользования Института биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина Российской академии наук на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6510LV (Япония).

2.6 Постановка экспериментов по изучению влияния метаболитов и биогенов

Клоны *U. ulna* (А 3.0904-G, А 3.0904-A) и *U. acus* (Мп 5.0903-F) содержали в течение двух месяцев в больших кристаллизаторах (объем 3 л) без добавления свежей среды или ее отдельных компонентов с целью накопления в среде метаболитов и истощения биогенных элементов. После чего содержимое кристаллизаторов фильтровали для получения среды без клеток (далее – фильтрат среды). Фильтрат среды использовали в экспериментах с клонами *U. ulna* (А 3.0904-A, А 3.0904-B, М 2.0929-D, М 2.0929-F) и *U. acus* (Мп 5.0903-A, Мп 5.0903-C), находившимися в экспоненциальной стадии роста.

В первом эксперименте клетки клона, находившегося в экспоненциальной фазе роста, помещали в три чашки Петри. В одну (контрольную) добавляли среду Dm, во вторую – такое же количество фильтрата, в третью – среду Dm и фильтрат в пропорции 1:1 (объем среды в каждой чашке составлял 15 мл). Подсчитывали количество клеток в площади поле зрения на первый, третий, пятый, седьмой и десятый день эксперимента. На десятый день в экспериментальные чашки добавляли силикат натрия и далее подсчитывали количество клеток на 13, 15 и 17 дни эксперимента.

Во втором эксперименте клетки клона, находившегося в экспоненциальной фазе роста, помещали в 5 чашек Петри. В контрольную чашку добавляли среду Dm, во вторую – фильтрат среды, в третью – фильтрат

+ силикат натрия, в четвертую – фильтрат + витамины, в пятую – фильтрат + дистиллированная вода в соотношении 1:1.

В качестве элементов среды, влияние которых оценивали, были выбраны силикат натрия (Na_2SiO_3) и комплекс витаминов B_{12} и B_1 , добавлявшихся в концентрациях, рассчитанных с учетом их содержания в среде Dm.

2.7 Молекулярные методы

ДНК была выделена из моноклональных штаммов с помощью раствора для выделения ДНК InstaGene фирмы BioRad (USA), согласно методике производителя. Амплификацию фрагментов хлоропластного гена *rbcL* (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы большой субъединицы рРНК) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (далее ПЦР). Реакционная смесь для проведения ПЦР была подготовлена с помощью набора для ПЦР ScreenMix («Евроген», Россия). Фрагмент хлоропластного гена *psbA* был амплифицирован с помощью праймеров *rbcL66 F* и *rbcL1255 R* (Alverson et al. 2007) и включала следующие стадии: начальная денатурация при 94 °C (2 мин), за которой следовали 40 циклов, включающих денатурацию при 94 °C (1 мин), отжиг праймеров при 52,8 °C (45 с) и элонгацию при 72 °C (1,5 мин), и затем финальная элонгация при 72 °C (10 мин).

Контроль результатов ПЦР осуществляли путем горизонтального электрофореза продуктов ПЦР в 1,5% агарозном геле в 1,5x TAE буфере (Tris-acetate-EDTA), окрашивания SYBR Safe («Bio-Rad», USA) и фотографирования в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гель-документации GelDoc XR («Bio-Rad», USA). Очистка фрагментов ДНК была подготовлена с помощью ExoSAP-IT kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) согласно протоколу производителя. Для реакции секвенирования применяли набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», USA), в качестве праймеров использованы сначала прямая, а затем обратная последовательности, указанные для ПЦР. Очистку продуктов реакции секвенирования от

непрореагировавших меченых нуклеотидов осуществляли с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit («Applied Biosystems», USA). Определение нуклеотидных последовательностей проводилась методом Сэнжера (Sanger) с двух сторон нуклеотидной последовательности при помощи прямого и обратного праймеров, указанных для ПЦР с последующим электрофорезом с использованием секвенатора Genetic Analyzer 3500 («Applied Biosystems», USA).

Построение деревьев. Редактирование и сборку консенсусной последовательности проводили путем визуального сопоставления прямой и обратной хроматограмм при помощи программы FinchTV (ver. 1.4.0) и Mega 6 [231]. В дополнение к данным фрагментам в последующем анализе использовали последовательности ДНК различных представителей диатомей доступных через базу данных GenBank, и видов диатомей, взятых в качестве внешней группы. Выравнивали нуклеотидные последовательности с помощью программы Mafft v6.952, используя модель E-INS-I [135]. Филогенетические деревья строили методом Байеса (BI) с использованием модели GTR+G+I. BI анализ проводили с помощью программы MrBayes-3.2.5 [208]. Запускали в двух повторностях три "горячих" и одну "холодную" марковские цепи в течение 10^6 циклов с отбором каждого сотого генерированного дерева. Из полученных деревьев первые 25 % были отброшены; на основе остальных получено филогенетическое древо и апостериорные вероятности его ветвления. На приведенном в работе рисунке представлено Байесовское древо, визуализированное в программе FigTree (ver. 1.4.2), укорененное по внешней группе.

2.8 Статистическая обработка

Статистическая обработка материала производилась в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководствах [17, 31]. Средние значения

представлены в виде "среднее $\pm$ ошибка среднего". Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая средние арифметические значения и ошибки среднего, вычисляя коэффициенты уравнений регрессий, которыми аппроксимировали экспериментальные данные. Достоверность результатов обеспечена значительным объемом собранного и обработанного материала (всего 137 клонов из 19 локальных популяций), проведением многочисленных повторных экспериментов и повторяемостью результатов.

Скорость вегетативного размножения (темп деления) оценивали, рассчитывая по методу наименьших квадратов коэффициенты уравнений, описывающих динамику численности клеток, приведенных к линейному виду. В частности, для модели экспоненциального роста численности скорость вегетативного размножения (v , делений·сут⁻¹) рассчитывали по формуле

$$v = (\ln N_2 - \ln N_1) / (\ln 2 \Delta t),$$

где N_1 и N_2 – численность клеток в культуре в моменты времени t_1 и t_2 , Δt – промежуток времени между t_1 и t_2 , $\ln 2$ – коэффициент, позволяющий привести расчеты к единицам "делений/сутки".

Терминология принята в соответствии со словарями [7, 12, 132].

ГЛАВА 3 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 *Ulnaria acus* (Kützinger) M. Aboal

Клетки, соответствующие морфотипу *Ulnaria acus*, обнаружили в пробах, отобранных в пяти географически удаленных друг от друга популяциях.

Клетки *U. acus* прикреплялись к субстрату одним концом с помощью слизи, располагаясь по одной клетке или образуя колонии (рисунок 3.1). Достаточно большое количество клеток оставалось неприкрепленными к субстрату, находясь в среде во взвешенном состоянии. Одним из критериев описания видов рода *Ulnaria* является форма колоний [240], однако наблюдения за клоновыми культурами *U. acus* показывают, что клетки могут вести себя по-разному даже в зависимости от стадии жизненного цикла. В дорепродуктивной фазе жизненного цикла, когда клетки имеют большую длину, они в основном находятся в среде во взвешенном состоянии, лишь часть клеток оседает на дно. Мы отметили, что при достижении клетками размеров близких к половине от максимального видоспецифического, при котором они готовы вступать в половой процесс, большая часть клеток встречается на дне, образуя плотные колонии, содержащие от нескольких до десятков клеток.

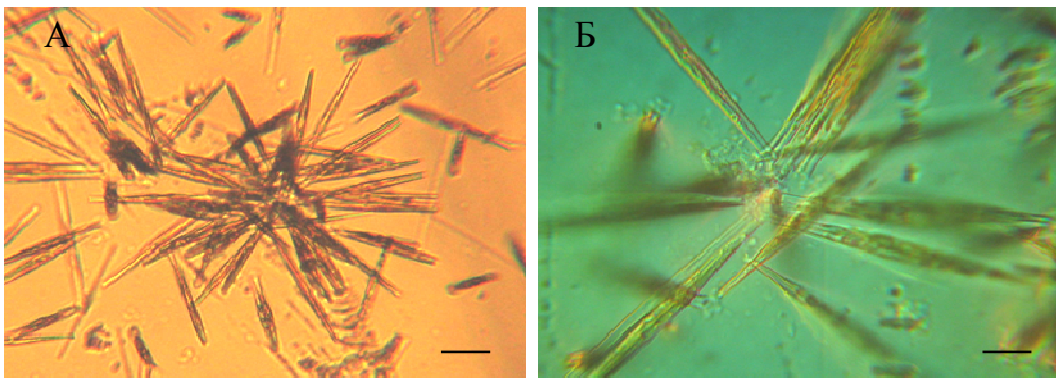


Рисунок 3.1 — *Ulnaria acus*, колонии клеток, СМ. Масштаб 50 мкм (А), 20 мкм (Б)

Клетки *U. acus* вытянутые, створки имеют узко-ланцетную форму, постепенно сужаясь к концам. Концы закругленные, головчатые. Два вытянутых хлоропласта расположены пристенно (рисунок 3.2).

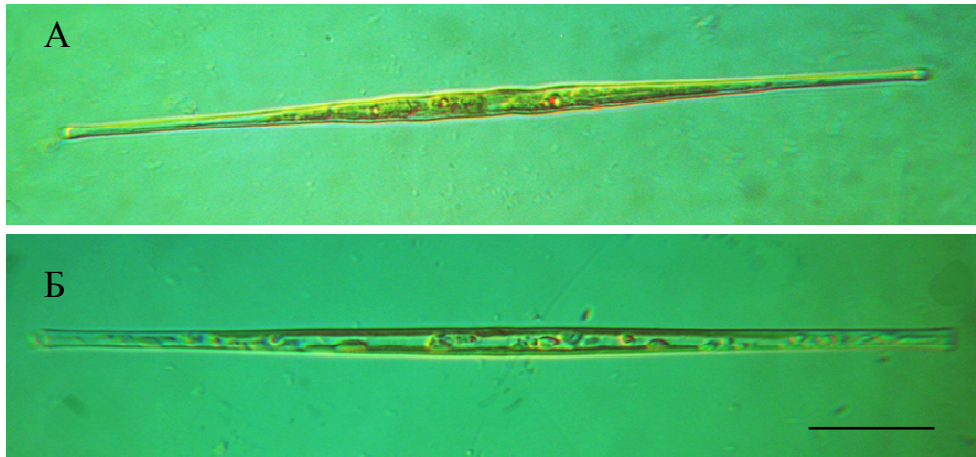


Рисунок 3.2 — *Ulnaria acus*, внешний вид живых клеток в культуре, СМ.

А – вид со стороны створки, Б – со стороны пояска. Масштаб 20 мкм

На каждом из концов створки имеется по одной римопортуле, которые часто располагаются на стернуме под углом к апикальной оси (рисунок 3.3 В–Г), в редких случаях на одном из концов римопортула отсутствует. С наружной стороны панциря римопортулы открываются эллипсоидным отверстием (рисунок 3.3 Д). Осевое поле узкое, может быть неровным, сужается к дистальным концам клетки. Оцеллюлимбус на каждом конце лежит в углублении на наружной поверхности загиба створки и состоит из 5–7 транспикальных рядов пореллей. Центральное поле прямоугольное, выраженное, присутствовало у всех исследованных клеток, часто имело неявно выраженные штрихи, так называемые "призрачные штрихи" (рисунок 3.3 Б). Штрихи параллельные, чаще расположены напротив друг друга, реже – чередующиеся. Плотность штрихов – 9–18 в 10 мкм. Ширина клеток варьировала от 4,2 до 8,4 мкм (N = 122). Эти показатели выше, чем указанные для типового материала вида, но укладываются в диапазон значений,

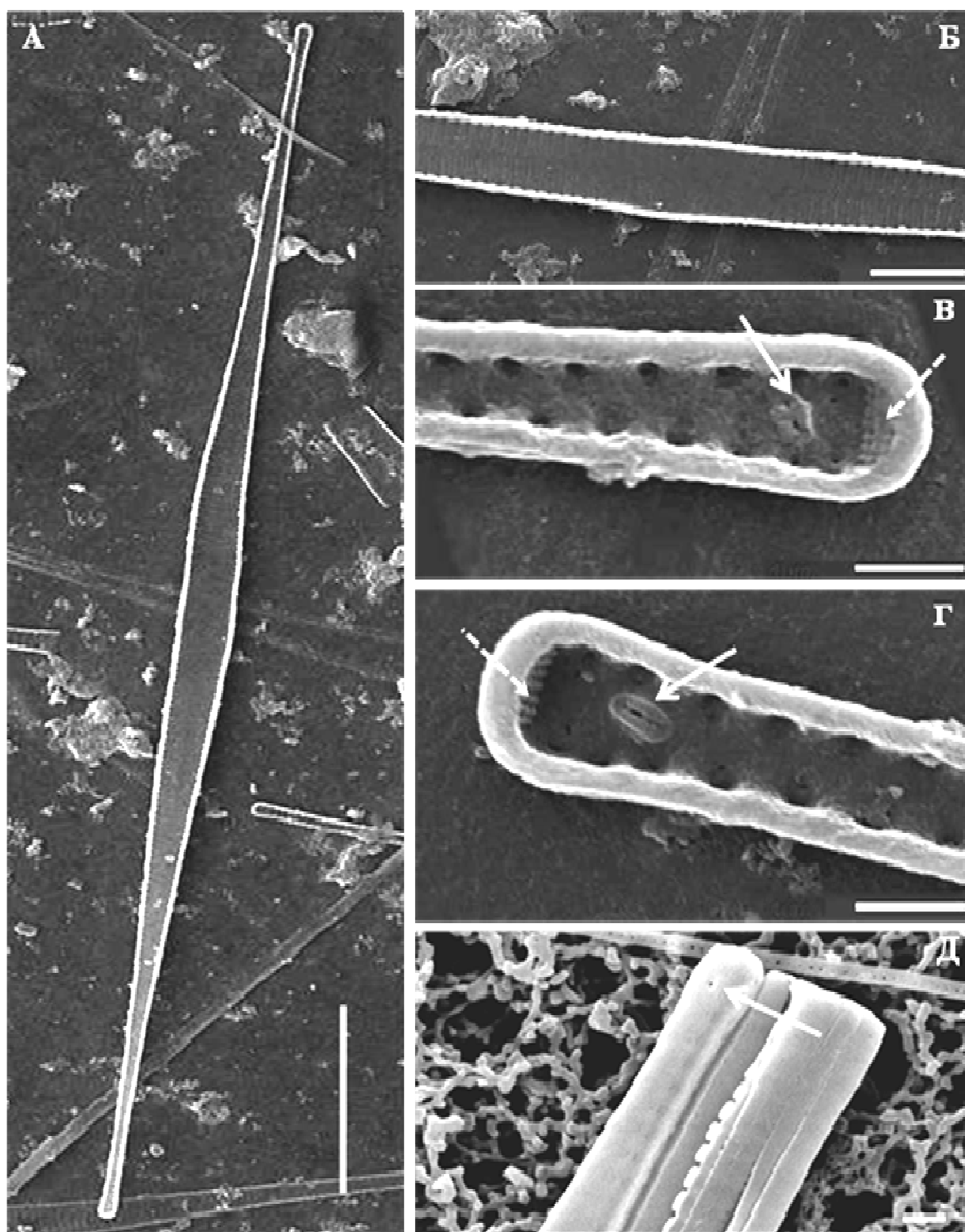


Рисунок 3.3 — *Ulnaria acus*, А – внутренняя сторона створки панциря, Б – центральное поле, В–Г – концы створки, Д – внешняя сторона створки с элементами пояска, стрелками указаны римопортулы, пунктирными стрелками показан оцеллюлибус, СЭМ. Масштаб 20 мкм (А), 1 мкм (Б–Д)

полученный по данным разных авторов для клеток, обнаруженных в различных природных популяциях (таблица 3.1).

Диапазоны размеров клеток, характерные для вида, широко используются в таксономических целях для описания и определения видов. Однако, указываемый в диагнозе видов диапазон апикальных размеров клеток часто оказывается зауженным. Возможно, это связано с тем, что авторы работают с природными популяциями и часто не видят в природе крупных инициальных и постинициальных клеток.

Для типовой формы *U. acis* указаны значения апикальной длины клеток 95–102 мкм [148]. В природных популяциях встречались в основном клетки от 60 до 250 мкм, но в водоемах Карелии отмечены клетки длиной до 378 мкм (таблица 3.1). М.С. Куликовским с соавторами [145] показано, что диапазон длин клеток *U. acis* может составлять 27–600 мкм (таблица 3.1), что, по-видимому, является ошибочным, т.к. эта же длина отмечена авторами и для *U. ulna*, но для обоих видов такой интервал сильно завышен и не соответствует значениям, полученным при половом воспроизведении.

Диапазон размеров вегетативных клеток *U. acis*, содержащихся в наших культурах, составил от 42 до 360 мкм (N = 486). Несомненно, судя по полученным нами и имеющимся в литературе данным, диагноз вида нуждается в уточнении.

3.2 Комплекс видов *Ulnaria cf. ulna*

Ulnaria ulna мы рассматриваем в широком смысле, как комплекс видов, морфологически очень слабо отличающихся друг от друга. Их можно охарактеризовать как криптические/полукриптические.

В естественных популяциях *U. danica* (Kützinger) Compère & Bukhtiyarova и *U. ulna* (Nitzsch) Compère встречаются чаще всего в виде колоний, образованных клетками, прикрепленными к субстрату с помощью общей

Таблица 3.1 — Диапазоны морфологических признаков изучаемых видов *Ulnaria* по литературным данным

Автор, год издания / популяция	Длина, мкм	Ширина, мкм	Число штрихов в 10 мкм
<i>Ulnaria acus</i>			
Lange-Bertalot, Ulrich, 2014 [148] / типовая форма	95,0 – 102,0	4,6 – 5,0	11,5 – 13,0
Чудаев, Гололобова, 2016 [39] / оз. Глубокое, Россия	95,1 – 123,9	3,1 – 3,9	12,9 – 15,0
Popovskaya et al., 2002 [204] / Байкал, Россия (как <i>Synedra acus</i>)	90,0 – 250,0	4,0 – 5,0	12,0 – 14,0
Slate, Stevenson, 2007 [225] / Флорида, США	98,0 – 262,0	3,5 – 5,0	11,0 – 13,0
Генкал, Ярушина, 2018 [6] / Западно-Сибирская Арктика, Россия	100,0 – 135,0	2,0 – 3,9	14,0 – 22,0
Генкал и др., 2015 [5] / водоемы Карелии, Россия	91,0 – 378,0	2,4 – 7,8	10,0 – 20,0
Куликовский и др., 2016 [22] / водоемы России	27,0 – 600,0	2,0 – 9,0	12,0 – 18,0
Liu et al., 2019 [153] / водоемы Китая	62,0 – 166,0	3,3 – 5,2	12,0 – 14,0
<i>Ulnaria danica</i>			
Skabitschewsky, 1960 [224] / водоемы России (как <i>Synedra ulna</i> var. <i>danica</i>)	89,0 – 480,0	4,5 – 6,4	8,0 – 11,0
Popovskaya et al., 2002 [204] / Байкал, Россия (как <i>Synedra ulna</i> var. <i>danica</i>)	235,0 – 442,0	8,0 – 10,0	8,0 – 10,0
Чудаев, Гололобова, 2016 [39] / оз. Глубокое, Россия	184,6 – 270,0	4,6 – 5,6	7,9 – 10,4
Куликовский и др., 2016 [22] / водоемы России	184,0 – 270,0	4,5 – 5,5	7,0 – 10,0
<i>Ulnaria ulna</i>			
Lange-Bertalot, Ulrich, 2014 [148] / типовая форма	230,0 – 320,0	6,3 – 7,7	9,2 – 10,4
Van Heurk, 1896 [244] / пресные водоемы Англии, Ирландии (как <i>Synedra ulna</i>)	150,0 – 250,0	–	9,0
Williams, 1986 [254] / Шотландия, остров Малл (как <i>Synedra ulna</i>)	65,0 – 85,0	5,0 – 11,0	10,0 – 12,0
Venkatachalapathy, Karthikeyan, 2013 [246] / штат Тамилнад, Индия (как <i>Synedra ulna</i>)	75,0 – 100,0	9,0 – 15,0	9,0 – 10,0
Чудаев, Гололобова, 2016 [39] / оз. Глубокое, Россия	120,8 – 270,9	6,0 – 7,4	9,2 – 10,2
Генкал, Ярушина, 2018 [6] / Западно-Сибирская Арктика, Россия	88,0 – 443,0	6,4 – 8,6	7,0 – 16,0
Генкал и др., 2015 [5] / водоемы Карелии, Россия	136,0 – 388,0	4,3 – 10,0	9,0 – 12,0
Куликовский и др., 2016 [22] / водоемы России	27,0 – 600,0	3,5 – 9,0	7,0 – 12,0

слизистой оболочки (рисунок 3.4), можно обнаружить также одиночные клетки. Изредка попадаются в планктоне. В культурах, если условия благоприятны, быстрорастущие клоны образуют колонии на дне чашек Петри.

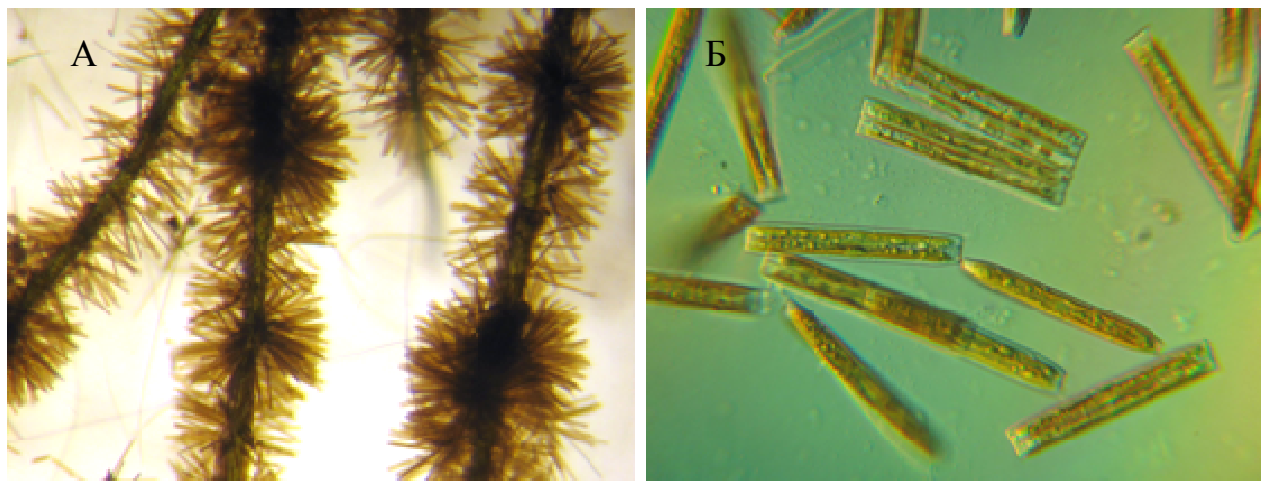


Рисунок 3.4 — *Ulnaria ulna*, колонии клеток. А – в пробе из природной популяции на нитях макрофитов, Б – клетки, лежащие на дне чашки Петри

Клетки *U. danica* (рисунок 3.5 А) и *U. ulna* (рисунок 3.5 Б) палочковидные, створки линейные, немного сужающиеся к концам. Два хлоропласта вытянуты вдоль створки и прилегают к ее стенкам (рисунок 3.5). *U. ulna* имеет несколько округлых полупогруженных пиреноидов на пластиду, имеющих инвагинации в цитоплазму. У *U. acus* никаких инвагинаций в цитоплазму не выявлено [3, 216].

Концы оттянутые, немного головчатые. На обоих концах створок клеток у этих видов имеются римопортулы (рисунок 3.6 В; 3.7 В), наружное отверстие которых эллипсовидное, находится в небольшом углублении (рисунок 3.6 Е). В редких случаях римопортула наблюдается только на одном конце створки. У *U. danica* и *U. ulna* оцеллюлимбус на каждом конце створки шире, чем у *U. acus*, состоит из 6–10 транспикальных рядов пореллей. На каждом полюсе, как и у *U. acus*, встречается пара выдающихся шипов (рисунок 3.6 Е). Вставочные ободки обычно имеются (рисунок 3.6 Д). Осевое поле узкое, линейное (рисунок 3.6 А, Б; 3.7 А, Б). Центральное поле прямоугольное, может

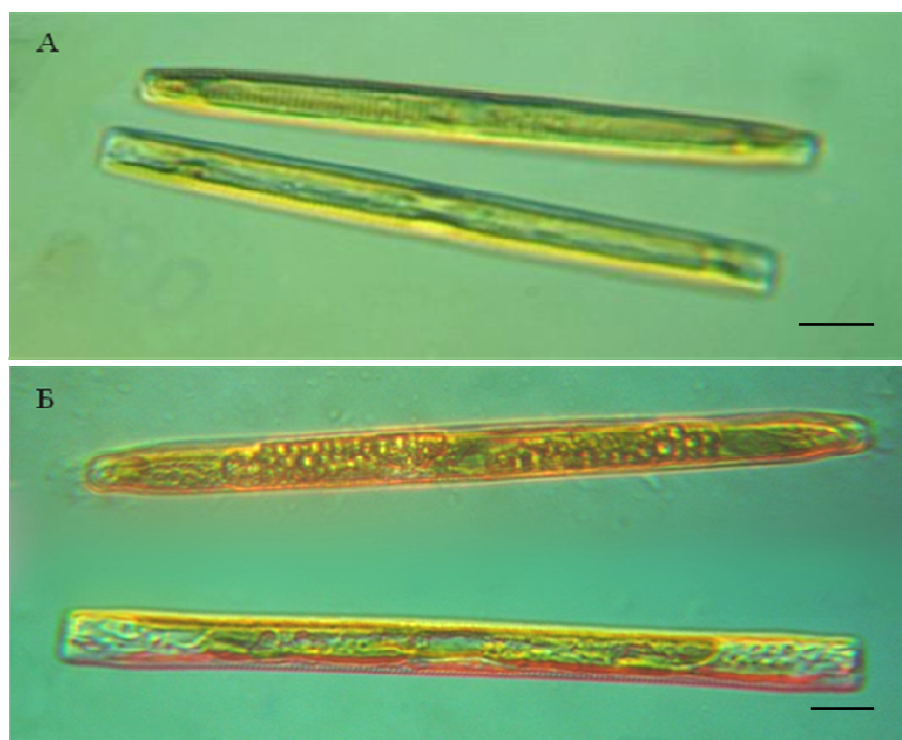


Рисунок 3.5 — Вегетативные клетки в живой культуре. А – *Ulnaria ulna* (Крымская популяция), Б – *Ulnaria danica* (г. Владивосток). Масштаб 20 мкм

содержать слабозаметные следы штрихов (рисунок 3.6 Б, Г), в некоторых популяциях *U. danica* может отсутствовать (рисунок 3.6 Б). В нашем исследовании мы не обнаружили клеток *U. ulna*, у которых бы отсутствовало центральное поле.

Рассматривая створки из разных популяций *U. danica* и *U. ulna*, можно обнаружить значительную вариабельность таких морфологических параметров как ширина клетки, плотность расположения штрихов и ареол (таблица 3.2). Диапазоны варьирования параметров у генетически однородных клеток оказались сопоставимыми с данными, полученными за период многолетних наблюдений на генетически разнородном материале. Можно отметить для сравнения, что данный факт был отмечен у представителей рода *Nitzschia* [221]. Таким образом, у диатомовых один и тот же генотип способен давать весьма широкий спектр фенотипов.

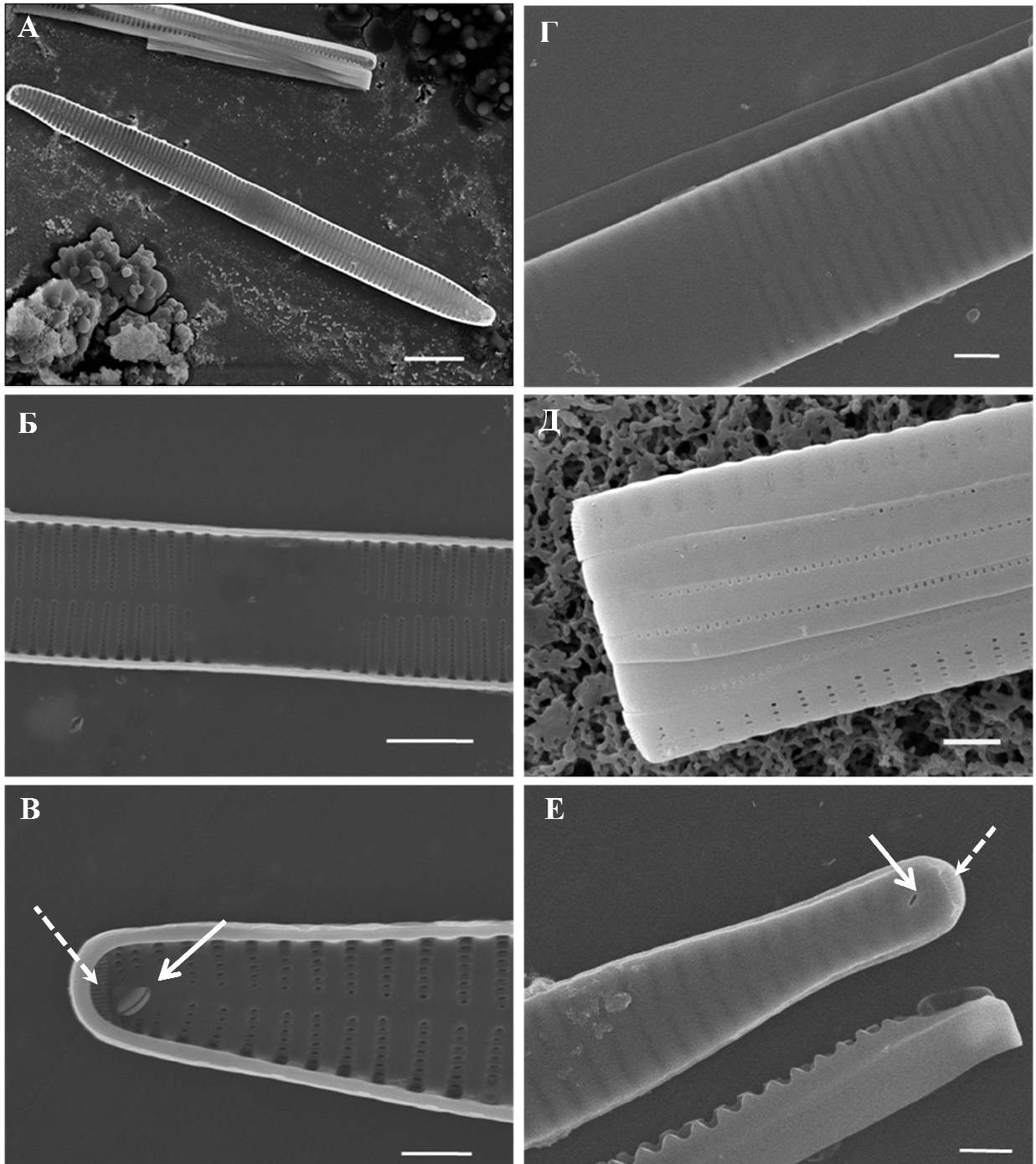


Рисунок 3.6 — *Ulnaria ulna*, СЭМ. А–В – внутренняя сторона створки (А – общий вид створки, Б – центральная область, В – конец створки), Г–Е – внешняя сторона створки (Г – центральная область, Д – вид створки с пояса, Е – конец створки с двумя шипами), стрелками указаны римопортулы, пунктирными стрелками показан оцеллюлимбус. Масштаб 10 мкм (А), 5мкм (Б, Г), 2 мкм (Б, Д, Е)

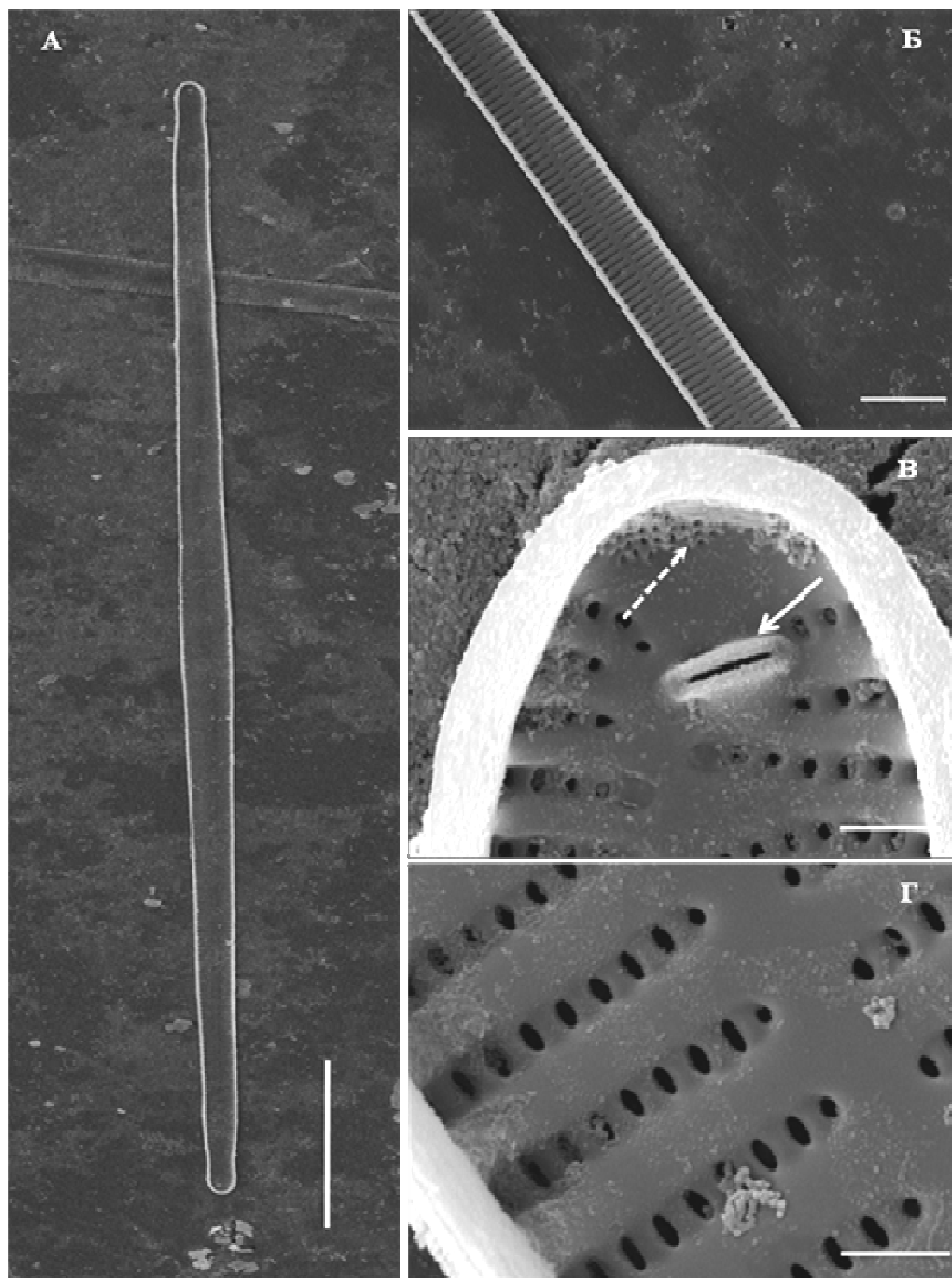


Рисунок 3.7 — *Ulnaria danica*, внутренняя сторона створки, СЭМ. А – общий вид створки, Б – центральное поле отсутствует, В – конец створки, Г – структура штрихов; стрелками указаны римопортулы, пунктирными стрелками показан оцеллюлимбус. Масштаб 30 мкм (А), 10 мкм (Б), 1 мкм (В–Г)

Изучение фенотипической (морфологической) variability в культурах позволяет, не выходя за рамки вида, установить степень его внутривидовой морфологической изменчивости, что объективно трудно сделать, располагая данными о природной популяции, не относящимися, как правило, к полному жизненному циклу. Кроме того показано, что расстояние между штрихами уменьшается с уменьшением апикальной длины клеток. Таким образом, в течение жизненного цикла *U. ulna* отмечено изменение частоты штрихов: с 9–10 увеличивалось до 12–13 на 10 мкм. Помимо этого, показано, что у *Ulnaria* наблюдается аллометрическое изменение размеров: трансапикальный размер уменьшается намного медленнее, чем апикальный. Как следствие этого, маленькие клетки не являются уменьшенной копией больших [27107].

Нами по данным анализа диапазонов морфологических признаков в культуре не установлено значительных морфологических различий для *U. danica* и *U. ulna* из географически удаленных популяций, диапазоны для этих двух видов шире указанных в литературе и перекрываются друг с другом. Хотя можно указать на то, что для *U. danica* отмечены бóльшие значения ширины клеток при равном количестве штрихов и при меньшем количестве ареол (таблица 3.2). В среднем у изученных представителей *U. ulna* ширина створок составляла $6,8 \pm 0,4$ мкм, количество штрихов в 10 мкм – $11,1 \pm 0,5$, количество ареол в 1 мкм – $4,3 \pm 0,2$. У *U. danica* отмечена ширина створок $7,25 \pm 0,3$ мкм, количество штрихов в 10 мкм – $11,2 \pm 0,6$, количество ареол в 1 мкм – $3,8 \pm 0,2$.

Створки клеток *U. cf. ulna* из индонезийской популяции (рисунок 3.8) имели следующие морфологические характеристики: ширина 4,1 – 8,1 мкм ($5,1 \pm 0,5$), количество штрихов в 10 мкм 11,6–13,9 ($12,7 \pm 0,8$), количество ареол в 1 мкм 4,4– 6,0 ($5,1 \pm 0,1$). Полученные отличия в структуре створки от Индонезии отдельного вида из комплекса *U. cf. ulna*. Учитывая variability морфологических признаков, отмеченную также другими авторами (см. таблицу 3.1), рассматриваемые виды можно считать криптическими.

Таблица 3.2 — Средние значения некоторых морфологических параметров и их диапазоны у двух видов *Ulnaria*

Вид	Место обитания	Ширина, мкм	Число штрихов в 10 мкм	Число ареол в 1 мкм
<i>Ulnaria ulna</i>	г. Кардиф	6,3 ± 0,2	11,3 ± 0,5	4,4 ± 0,2
		5,4 – 7,2	8,8 – 12,5	4,2 – 4,5
	г. Гент	6,6 ± 0,1	11,6 ± 0,3	4,3 ± 0,1
		6,0 – 7,3	9,9 – 12,8	4,0 – 4,5
	г. Ле Манн	7,3 ± 0,3	10,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1
		6,1 – 7,8	10,2 – 11,1	3,8 – 5,0
	р. Адуй	7,1 ± 0,1	11,0 ± 0,2	4,1 ± 0,1
		6,4 – 7,7	10,0 – 11,8	3,7 – 4,6
<i>Ulnaria danica</i>	р. Бия	6,5 ± 0,2	11,0 ± 0,1	3,8 ± 0,1
		5,6 – 7,9	10,4 – 12,0	3,5 – 4,1
	р. Обь	7,2 ± 0,2	11,2 ± 0,2	3,9 ± 0,1
		6,8 – 7,9	10,6 – 11,7	3,6 – 4,0
	оз. Хубсугул	7,4 ± 0,3	12,0 ± 0,6	3,8 ± 0,2
		6,9 – 8,2	11,3 – 15,0	3,7 – 3,9
	г. Владивосток	7,9 ± 0,3	10,4 ± 0,5	3,4 ± 0,2
		6,1 – 9,3	9,0 – 12,5	2,8 – 4,0

Диапазон указанных разными авторами параметров для *U. danica* и *U. ulna* настолько широк, что говорит о необходимости применения дополнительных методик (молекулярно-генетических, оценка репродуктивной совместимости/изоляции) для разграничения видов. Для многих диатомовых, например, *Nitzschia rectilonga* Takano [221], *Tabularia fasciculata* (C.A. Agardh) D.M. Williams & Round [131], была показана широкая внутривидовая вариабельность таких признаков как количество штрихов, ширина клеток, количество ареол. Для вида *T. fasciculata* близкородственного к *Ulnaria* отмечено, что существенные различия по морфологическим критериям могут не являться

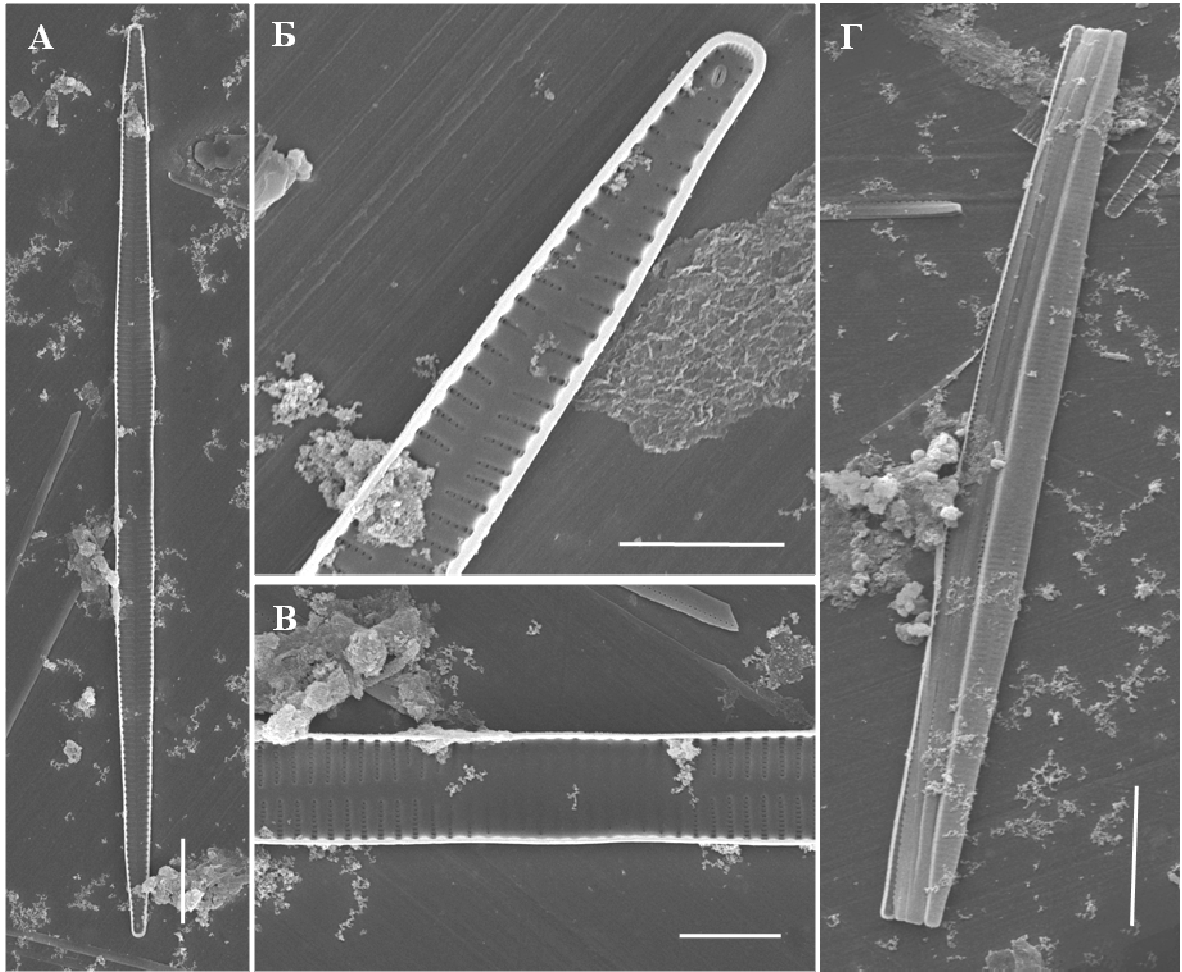


Рисунок 3.8 — *Ulnaria cf. ulna*, створки клеток из индонезийской популяции. А–В – внутренняя сторона створки (А – общий вид створки, Б – конец створки, В – центральное поле), Г – внешняя сторона створки с пояса. Масштаб 10 мкм (А, Г), 5 мкм (Б, В)

основанием для разграничения видов, так как репродуктивные барьеры между двумя морфологическими группами отсутствовали [131].

Апикальный размер (длина) культивируемых клеток *U. ulna* и *U. danica* на разных этапах их жизненного цикла изменялся от 11 до 436 мкм ($N = 3598$) у *U. ulna*, и от 42 до 430 мкм ($N = 668$) у *U. danica*.

Длина клеток из некоторых природных популяций показана в таблице 3.3. Графики распределения размеров клеток в популяциях представлены на рисунках 3.8 и 3.9. Распределение размеров клеток в популяции позволяет

Таблица 3.3 — Апикальная длина клеток у двух видов *Ulnaria* из разных природных популяций

Вид	Место обитания	Время отбора проб	Средняя апикальная длина, мкм	Диапазон размеров, мкм
<i>Ulnaria ulna</i>	г. Кардиф	Апрель, 2012	$148,0 \pm 3,2$ N = 104	62,3 – 235,3 N = 104
	г. Гент	Ноябрь, 2012	$146,0 \pm 4,9$ N = 72	81,6 – 283,7 N = 72
	г. Ле-Манн	Декабрь, 2012	$203,0 \pm 6,2$ N = 40	110,7 – 249,1 N = 40
	Крым	Апрель, 2010	$91,4 \pm 2,4$ N = 658	11,2 – 176,0 N = 658
	Москва-река	Сентябрь, 2012	$188,0 \pm 4,6$ N = 144	90,0 – 290,6 N = 144
	оз. Рица	Ноябрь, 2015	$274,0 \pm 7,9$ N = 122	69,2 – 401,4 N = 122
	р. Адуй	Сентябрь, 2013	$172,4 \pm 6,3$ N = 47	62,3 – 263,0 N = 47
<i>Ulnaria danica</i>	р. Бия	Октябрь, 2013	$222 \pm 6,1$ N = 46	138,4 – 263,7 N = 46
	р. Обь	Октябрь, 2013	$209,6 \pm 6,1$ N = 42	107,4 – 283,1 N = 42
	г. Владивосток	Декабрь, 2015	$256,1 \pm 6,1$ N = 117	117,6 – 347,0 N = 117

установить, на какой стадии развития находится популяция, какая ее часть остается в дорепродуктивной фазе, а какая уже вошла в репродуктивную. Это является основанием для прогнозирования возможного наступления полового воспроизведения в популяции, и, кроме того, позволяет оценить эффективную долю популяции, т.е. ту ее часть, которая участвует в половом воспроизведении.

Нами установлено в экспериментах по скрещиванию, что граница перехода в репродуктивную фазу одинаковая для всех изученных популяций в пределах каждого вида. Так, например, весной 2010 года все клетки *U. ulna* в крымской локальной популяции были меньше верхней границы репродуктивной фазы жизненного цикла, а треть из них оказались за пределами

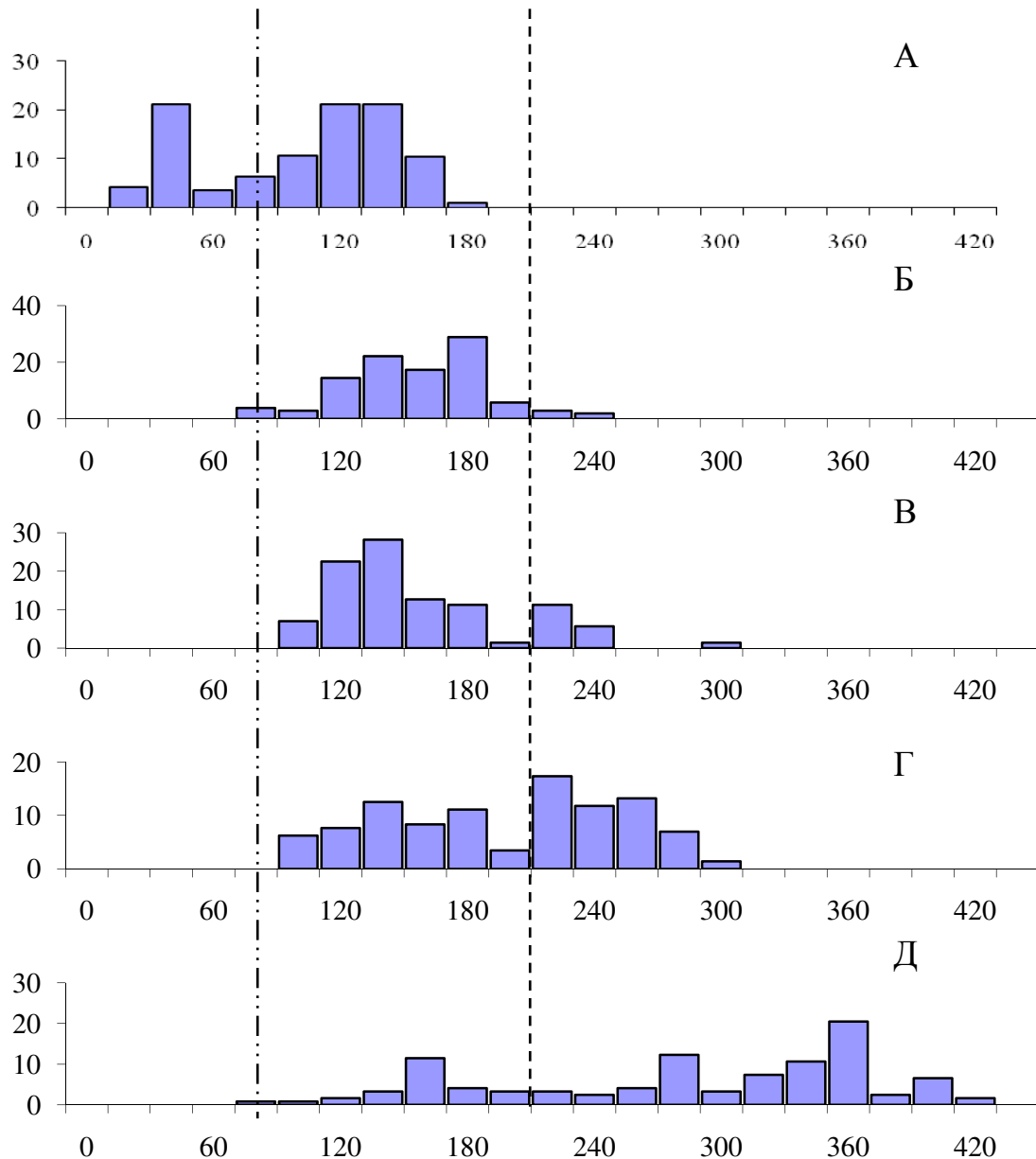


Рисунок 3.9 — Распределение апикального размера клеток по частоте встречаемости в природных популяциях *Ulnaria ulna*. А – горный ручей, Крым; Б – речка, г. Кардифф; В – Гент; Г – Москва-река; Д – оз. Рица. Пунктирной линией указана верхняя критическая граница (50 % от максимального видоспецифического размера), после достижения которой клетки способны вступать в половое воспроизведение. Штрихпунктирной линией отмечена нижняя граница репродуктивной фазы жизненного цикла. По оси абсцисс отмечена апикальная длина клеток, мкм; по оси ординат – частота встречаемости клеток, %

нижней границы репродуктивной фазы (рисунок 3.9 А). В этой же популяции была встречена самая маленькая клетка с апикальной длиной 11 мкм.

В двух из изученных популяций (г. Кардифф в апреле и г. Гент в ноябре) более 80 % клеток *U. ulna* находились в генеративной фазе жизненного цикла и были способны к половому воспроизведению (рисунок 3.9 Б–В). В Москве-реке в сентябре 2012 года наблюдали примерно равное количество клеток, находящихся в вегетативной и генеративной фазах жизненного цикла (рисунок 3.9 Г). В оз. Рица в ноябре 2015 года около 70 % клеток популяции находилось в вегетативной фазе цикла (рисунок 3.9 Д), из них размер трети клеток был близок к максимальному видоспецифическому. Здесь же была обнаружена самая крупная для изученных нами природных популяций клетка *U. ulna*, ее длина составила 401 мкм. Заметим, что всего нами было измерено в разных репродуктивно совместимых популяциях 1187 клеток.

Большая часть клеток *U. danica* из реки Обь, отобранных осенью 2013 года, находилась в дорепродуктивной фазе жизненного цикла (рисунок 3.10 А), только 30 % популяции были способны перейти к половому воспроизведению. В популяции реки Артемовка (г. Владивосток) наблюдали две группы клеток, хорошо отличимых друг от друга. Клеток, размер которых приближался к максимальному видоспецифическому, было гораздо меньше (20 % от всех измеренных клеток) (рисунок 3.10 Б). Такое размерное распределение свидетельствует о недавно прошедшем в популяции аукоспорообразовании. Размер самой крупной клетки *U. danica*, обнаруженной в природе в реке Артемовка, составил 347 мкм.

Крупные клетки в популяциях нам встречались достаточно редко, что можно объяснить несколькими причинами [175]. Для наступления полового воспроизведения необходимо стечение благоприятных внешних факторов (температура, фотопериод, освещение и др.), наличие полового партнера (для гетероталлического воспроизведения), достижение критического размера.

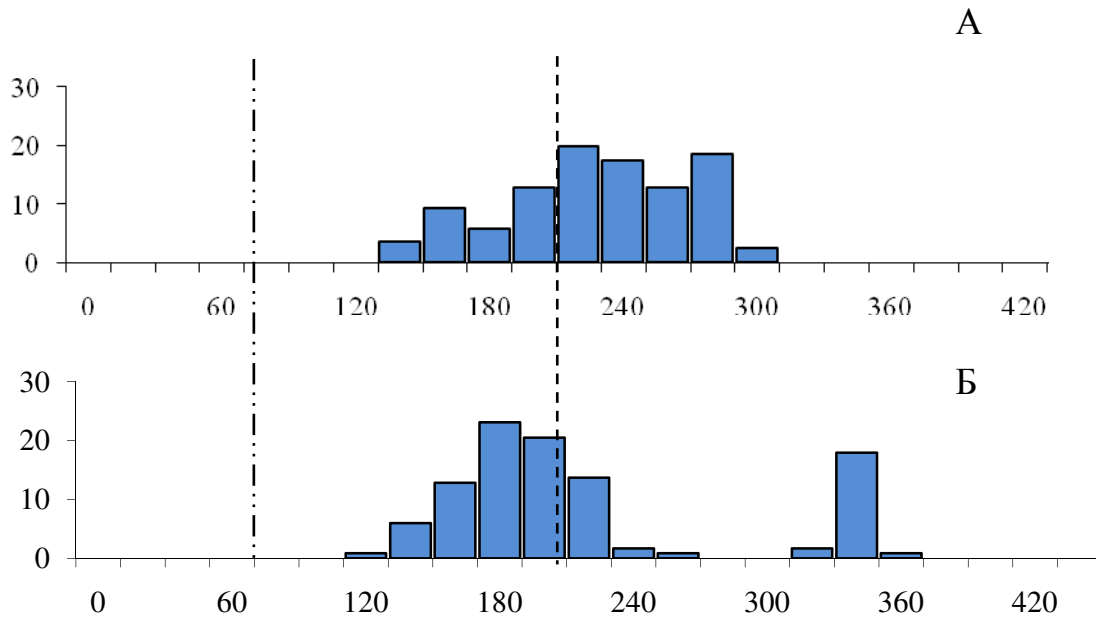


Рисунок 3.10 — Распределение апикального размера клеток по частоте встречаемости в природных популяциях *Ulnaria danica*. А – р. Обь; Б – р. Артемовка, Владивосток. Пунктирной линией указана верхняя критическая граница (50 % от максимального видоспецифического размера), после достижения которой клетки способны вступать в половое воспроизведение. Штрихпунктирной линией отмечена нижняя граница репродуктивной фазы жизненного цикла. По оси абсцисс отмечена апикальная длина клеток, мкм; по оси ординат – частота встречаемости клеток, %

В популяции половое воспроизведение продолжается недолго, от нескольких дней, до нескольких недель. Митотический цикл в отличие от мейоза и последующего ауксоспорообразования, в два–четыре раза короче по продолжительности, а клеток в популяции, которые не вступили в половой процесс, а продолжили вегетативное деление, гораздо больше, что хорошо прослеживается, например, в представленных выше размерных распределениях клеток двух видов рода *Ulnaria*.

У изученных нами *U. ulna* и *U. danica* часто наблюдали бимодальное распределение апикальной длины клеток. Пики диапазонов длин клеток, находящиеся на расстоянии друг от друга, могут представлять собой две

генерации, возникшие в результате последовательно прошедших в популяции этапов аукоспорообразования, разделенных периодом, когда осуществлялось вегетативное деление клеток. Иногда различия между двумя такими пиками были сглаженными, а в ряде случаев наблюдали явное доминирование клеток в некоторых диапазонах размеров. Таким образом, изучение размеров клеток в природных популяциях дает обширную информацию не только о видовых характеристиках, например, о диапазоне видоспецифических размеров клеток, но и о динамике популяций и жизненном цикле водорослей. Однако проанализировать данные о распределении клеток в популяции можно только при наличии сведений о половом воспроизведении, критических границах жизненного цикла, которые на практике могут быть получены исключительно в лабораторных условиях.

3.3 Рост в культуре представителей рода *Ulnaria* в зависимости от содержания в среде некоторых элементов

Жесткие требования к составу среды для успешного выращивания диатомей – являются одной из основных причин малой представленности диатомовых водорослей в коллекциях культур. Есть ряд работ, которые показывают влияние на рост культуры, морфологию и физиологию клеток диатомовых различных концентраций компонентов среды, например силиката натрия, железа, цинка, фосфора и др. [38, 61, 99, 124, 150, 234].

Одним из основных элементов, обеспечивающих вегетативное размножение и половое воспроизведение диатомей, является кремний [196, 197]. В природных водоемах кремний присутствует в виде растворенных соединений кремниевой кислоты в разных состояниях (ортокремниевая H_4SiO_4 , метакремниевая H_2SiO_3 , а также поликремниевая кислотопеременного состава $m\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), в донных отложениях водоемов в виде оксидов (кварц, опал), а также входит в состав разнообразных силикатов и алюмосиликатов (полевых

шпатов, слюд, глин). Значительная часть кремния в донных отложениях присутствует в виде аморфного биогенного кремнезема, который образуется в результате отмирания органического материала оседающего на дно водоема. Растворимость аморфного кремнезема выше, чем у природных силикатов, поэтому он является главным источником растворимого кремния в воде. В искусственные среды – соленные и пресные – кремний в основном добавляют в виде силиката натрия – соли кремниевой кислоты. Кремниевая кислота захватывается клетками диатомей даже из очень низких концентраций и переносится в специальные органеллы. Расшифрована аминокислотная последовательность белков, осуществляющих трансмембранный перенос кремниевой кислоты у морской шовной пеннатной диатомеи *Cylindrotheca fusiformis* Reimann & J.C. Lewin [123] и пресноводной бесшовной *Ulnaria acus* [9]. И хотя имеется целый ряд работ, посвященных росту диатомей в зависимости от концентрации кремния [56, 87, 93, 121, 124], многие вопросы, связанные с содержанием кремния и других элементов в искусственных средах, остаются открытыми. Виды рода *Ulnaria* – *U. ulna* и *U. acus* – можно считать модельными пресноводными видами, которые широко используются в различных экспериментальных и прикладных, в том числе биотехнологических, исследованиях [3, 4, 100, 145, 203, 207].

Мы провели ряд экспериментов, в которых установили влияние кремния, добавляемого в среду, на рост *U. ulna* и *U. acus*. В первом эксперименте фильтрат истощенной среды, в которой культура росла длительное время (см. раздел Материалы и методы) добавляли к вновь засеянной культуре (рисунок 3.11 А). Клоны *U. ulna*, находившиеся в контрольной чашке, продемонстрировали экспоненциальный рост в течение семи дней и переход в стационарную фазу на девятый день, тогда как в чашках с фильтратом среды достоверного увеличения количества клеток не происходило, к седьмому дню количество живых клеток уменьшилось ниже начального уровня. В эксперименте, в котором к фильтрату было добавлено равное количество среды Dm и фильтрата, количество клеток увеличивалось, однако в два раза

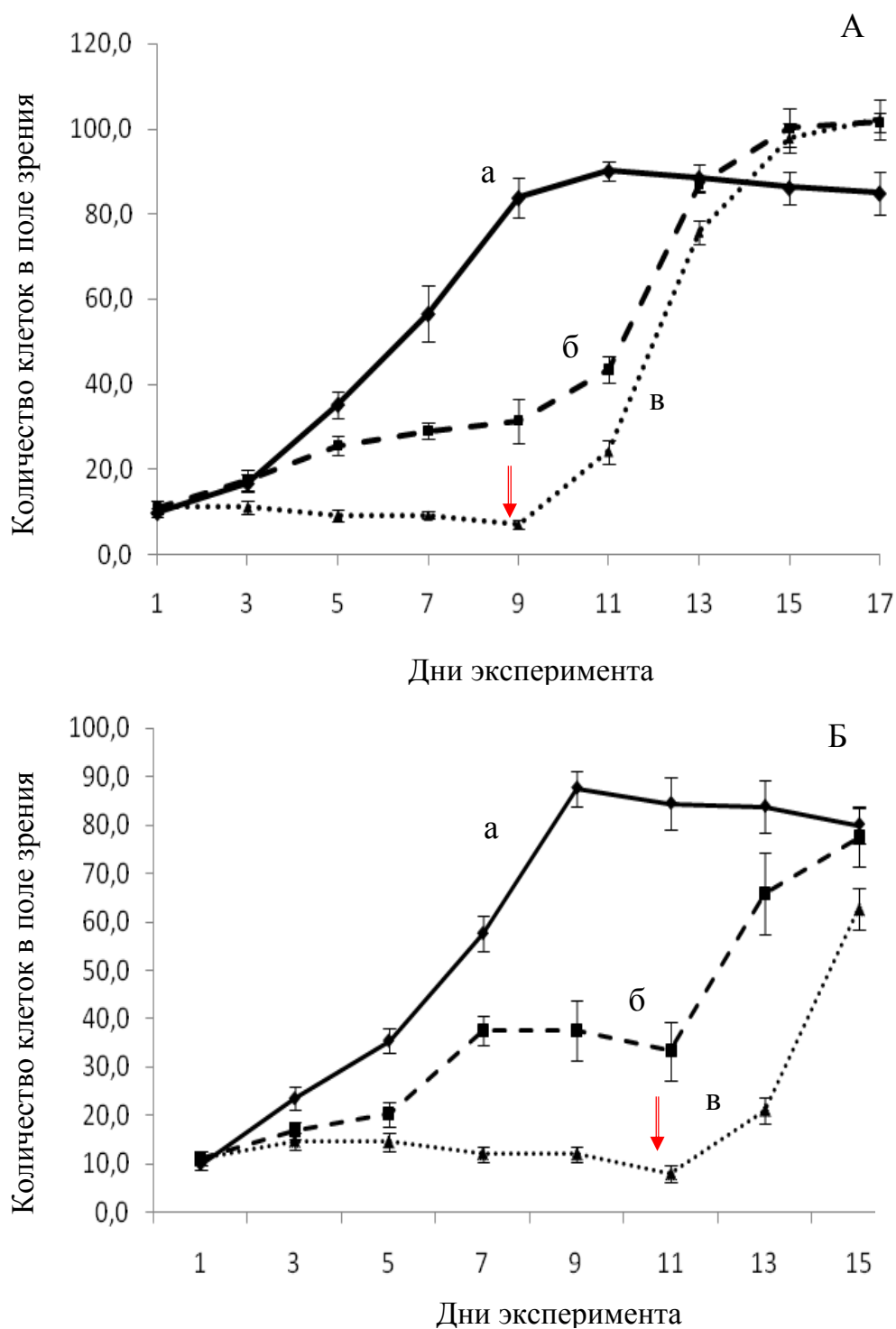


Рисунок 3.11 — Зависимость состояния культур от добавления силиката натрия. А – *Ulnaria ulna*; Б – *Ulnaria acus*. а – контроль; б – клетки, помещенные в фильтрат среды с добавлением среды Dm; в – клетки, помещенные в фильтрат среды [26]

медленнее, чем в контроле. После добавления на десятый день эксперимента силиката натрия, на тринадцатый день количество клеток в экспериментальных чашках резко увеличилось и сравнилось с контролем; культуры, таким образом, продемонстрировали экспоненциальную фазу роста. На последний, семнадцатый день эксперимента количество клеток в экспериментальных чашках Петри в 1,3 раза превысило количество клеток в контрольной чашке, в которой культура уже с девятого дня находилась в стационарной фазе без достоверного увеличения числа клеток.

В чашках Петри, в которых фильтрат среды был разбавлен средой Dm, на пятые-седьмые сутки эксперимента был отмечен внутриклоновый гаметогенез в клонах пола, противоположного тому, который долгое время содержался в среде – фильтрате. При этом если экспериментальные клоны были женскими, то гаметогенез заканчивался "абортированием" гамет. Если же экспериментальные клоны были мужскими, то гаметогенез заканчивался аукоспорообразованием. Вероятно, гаметогенез был спровоцирован феромонами, выделенными в среду клетками противоположного пола. Размер инициальных клеток, полученных при внутриклоновом воспроизведении клонов А 3.0904-А и М 2.0929-D, составил в среднем 337 ± 5 мкм (диапазон значений 290–358 мкм, измерено клеток N = 15).

Клоны *U. acis* показали реакцию, идентичную изучаемым клоном *U. ulna* (рисунок 3.11 Б). В контрольной чашке происходило нарастание культуры и переход в экспоненциальную, а затем и стационарную фазу. В опытной чашке с фильтратом нарастания культуры не наблюдали. После добавления в опытные чашки на одиннадцатый день силиката натрия происходило резкое нарастание клеток в клоновой культуре. На тринадцатый день количество клеток в экспериментальной чашке с фильтратом выросло в три раза, а на пятнадцатый – в восемь раз и практически сравнилось с контролем, в котором культура с девятого дня находилась в стационарной фазе. Гаметогенез в клонах не был отмечен ни в одной из чашек.

Во втором эксперименте с клонами *U. ulna* (рисунок 3.12) наибольший рост числа клеток отмечен в культурах, помещенных в фильтрат с добавлением силиката натрия. Несмотря на то, что первые пять дней эксперимента клоны в данной экспериментальной чашке показывали меньший темп роста, чем в контроле, на седьмой и несколько последующих дней еще продолжался экспоненциальный рост культуры, тогда как в контрольной чашке клетки к этому времени достигли стационарной фазы.

На одиннадцатый день эксперимента количество клеток в чашке с добавлением силиката натрия в 1,3 превышало количество клеток в контроле, и в 21,5 раз было выше, чем в чашке с фильтратом (в 3,2 раза – в чашке с фильтратом и витамином B₁₂). При добавлении в фильтрат витамина B₁₂ рост численности клеток в культуре был в два раза более интенсивным, чем у

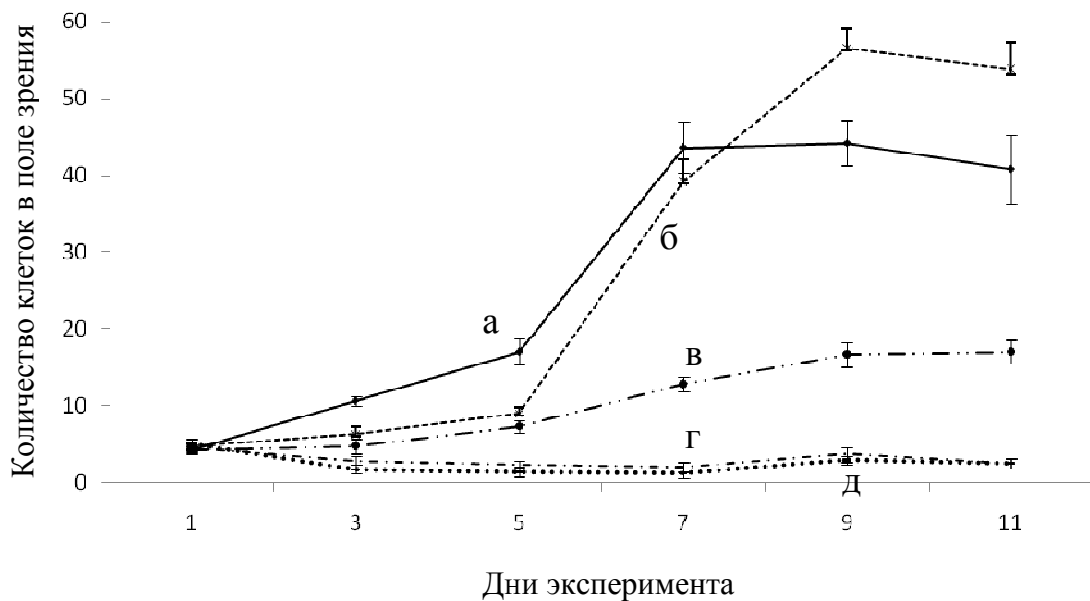


Рисунок 3.12 — *Ulnaria ulna*, зависимость состояния культур от добавления метаболитов и биогенных элементов. а – контроль; б – клетки в фильтрате среды с добавлением силиката натрия; в – клетки в фильтрате среды с витамином B₁₂; г – клетки в фильтрате, разбавленном дистиллированной водой; д – клетки, помещенные в фильтрат среды [26]

клеток, находившихся в фильтрате среды без витамина. В чашке Петри, в которой фильтрат был разбавлен в два раза дистиллированной водой, на третий день эксперимента произошло резкое уменьшение количества клеток, почти в четыре раза. В аналогичном эксперименте с клонами *U. acus* наблюдали такую же картину, как и в случае с *U. ulna*.

Кроме дефицита некоторых элементов в среде, фактором ограничивающим рост культуры клеток диатомей может стать накопление в среде продуктов метаболизма клеток, которые ингибируют деление клеток и приводят к их разрушению. При длительном нахождении в среде без пересева происходило ингибирование как митотического, так и мейотического деления клеток диатомовых [11]. Как показали проведенные нами исследования, добавление в среду, в которой длительное время без пересева находились клоновые культуры диатомей, силиката натрия и витамина B₁₂, приводит к резкому улучшению состояния культур и увеличению количества клеток. Это может быть использовано как для успешного содержания клонов диатомовых водорослей в культуре, так и при их массовом культивировании в биотехнологических целях. Проведенные эксперименты позволили нам отработать протокол содержания изучаемых водорослей в культуре и подобрать для них оптимальные условия для проведения экспериментов по скрещиванию.

ГЛАВА 4 ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ULNARIA*

4.1 Жизненный цикл и изменение размеров клеток

Жизненный цикл диатомовых включает в себя две основные фазы: длительную вегетативную фазу, длящуюся от нескольких месяцев до нескольких лет, в течение которой клетки делятся митотически, и короткую фазу (от нескольких часов до нескольких суток), которая включает в себя половое воспроизведение (гаметогенез и оплодотворение) и процесс формирования ауксоспор и инициальных клеток, дающих начало новым поколениям вегетативных клеток [15, 67, 167]. Жизненный цикл диатомовых водорослей напрямую связан с апикальной длиной клеток. Для подавляющего большинства диатомей характерно уменьшение длины створок. Это связано с тем, что в ходе митотического деления всегда достраивается меньшая створка панциря (гипотека). При достижении критического размера, названного Л. Гайтлером кардинальным пунктом [106, 111], клетки становятся сексуально индуцибельными и способными перейти от митоза к мейозу. Верхняя граница диапазона размеров, необходимых для полового воспроизведения, может составлять от 30 до 75 % максимального размера клетки, в зависимости от вида, но у большинства диатомовых она соответствует 45–55 % [85].

Л. Гайтлером [107] было показано, что у *Ulnaria ulna* запуск процесса ауксоспорообразования возможен только при достижении клетками определенных размеров, т. е. главным фактором процесса является "внутренняя среда организма". Только клетки длиной 130–180 мкм (а чаще 150–180 мкм) способны к гаметообразованию, в то время как ни маленькие (120 мкм), ни большие (360 мкм) клетки гаметы не производили.

Нами отмечено, что клетки *U. acus* приобретали способность к половому воспроизведению при достижении апикальной длины 194 мкм, что составляет 54 % от максимального видоспецифического размера (рисунок 4.1 А). Клетки, апикальная длина которых стала меньше 62 мкм (что соответствует 17 % от максимального видоспецифического размера), оказались неспособными более вступать в половое воспроизведение. Такой диапазон принято считать закрытым [34].

Клетки *U. ulna* проявляет способность к половому воспроизведению при достижении размера 203 мкм, что составляет 53 % от максимального видоспецифического размера (рисунок 4.1 Б). Клетки *U. danica* становятся сексуально индуцибельными при достижении 51 % от максимального видоспецифического размера (рисунок 4.1 В). Как и у *U. acus*, у *U. ulna* и *U. danica* диапазон размеров, допускающих половое воспроизведение, также является закрытым. Диапазон размеров клеток, в котором возможен половой процесс во всех видов *Ulnaria*, составлял около 40 % от полного диапазона размеров.

Л. Гайтлер [106] предполагал, что размеры инициальных клеток находятся в узком диапазоне и их можно рассматривать в качестве кардинального пункта. Однако диапазон размеров инициальных клеток у видов рода *Ulnaria* оказался достаточно вариабельным и составил около 30 % от общего диапазона размеров. Вопрос о том, насколько вариабельны размеры инициальных клеток у диатомовых, остается обсуждаемым в литературе [91, 85, 92].

У *U. acus*, как и у *U. ulna*, отсутствует статистически значимая зависимость длины инициальных клеток от длины гаметангиальных клеток (рисунок 4.2 А), ввиду того, что даже самые маленькие родительские клетки способны порождать инициальные клетки, размер которых близок к максимальному и наоборот, гаметангии с максимальным размером могут произвести инициальные клетки с размером, приближающимся к критической

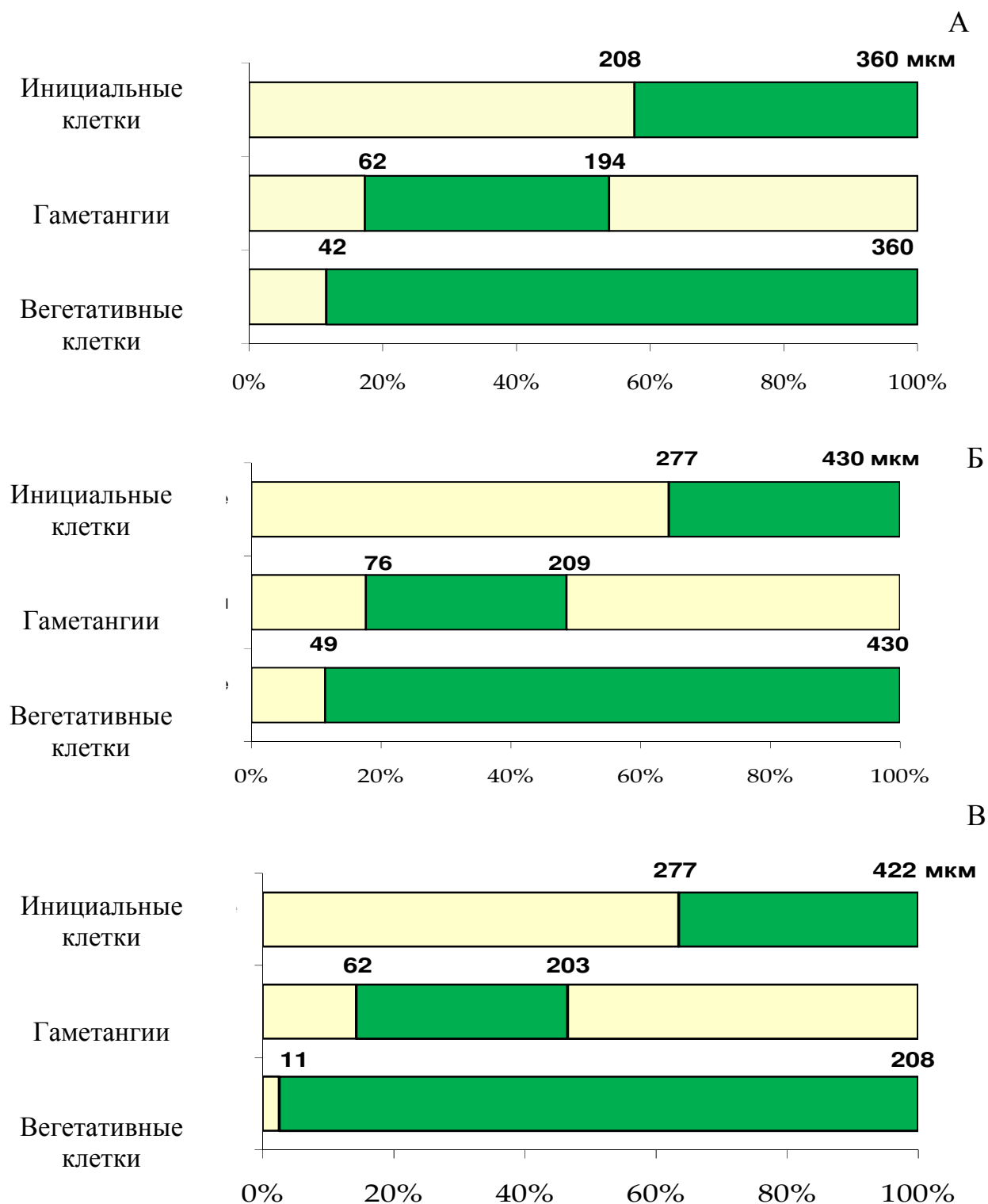


Рисунок 4.1 — Этапы жизненного цикла. А – *Ulnaria acus*; Б – *Ulnaria danica*; В – *Ulnaria ulna*. Цифры показывают минимальный и максимальный размер створок на соответствующих этапах жизненного цикла [28, 203]

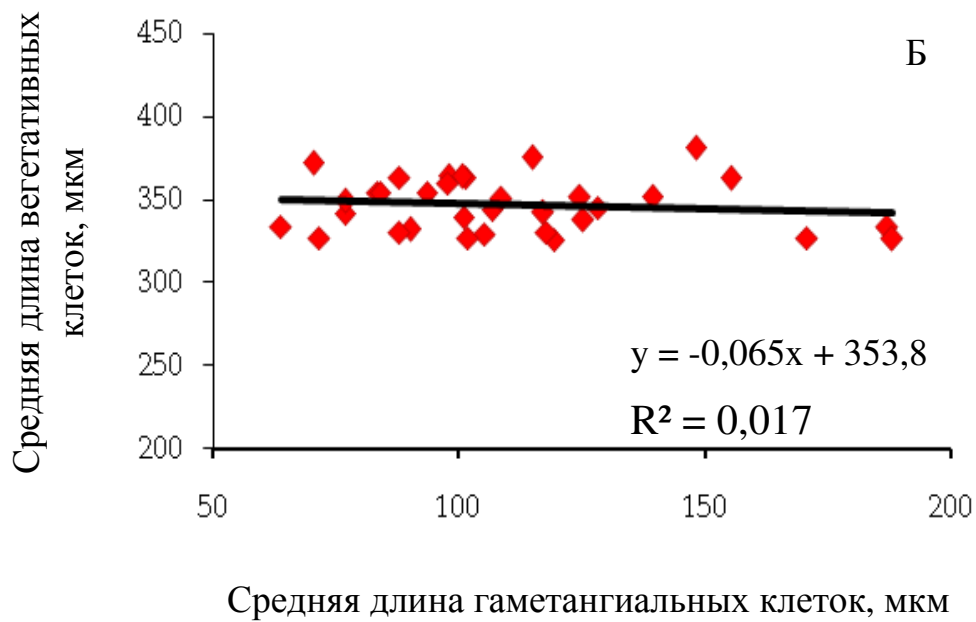
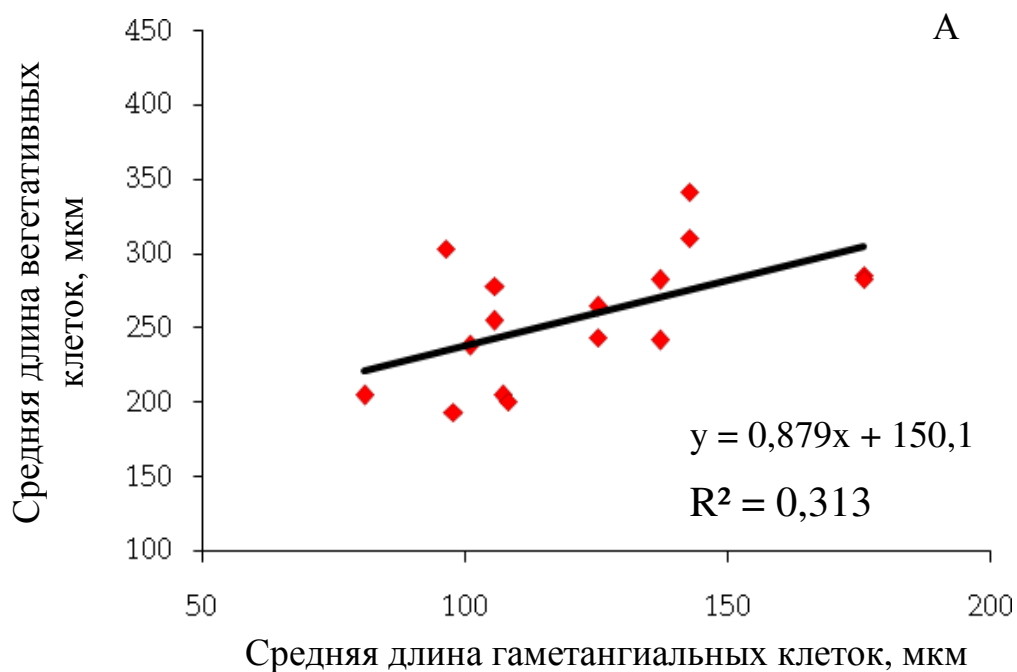


Рисунок 4. 2 — Зависимость длины инициальных клеток от длины гаметангиев. А – *Ulnaria acus*; Б – *Ulnaria ulna*. Длину клеток гаметангиев рассчитывали как среднее из средних размеров клеток в паре клонов; длина инициальных клеток рассчитывалась как средняя длина инициальных клеток, возникших в смеси родительских клонов [28, 203]

точке начала полового воспроизведения. Поэтому коэффициент восстановления размера может варьировать от 1,7 до 6,8.

Клетки представителей близкородственного к *Ulnaria* рода *Tabullaria* также приобретают способность к половому воспроизведению после достижения 50 % максимального размера, характерного для вида, но при этом зависимость длины инициальных клеток от родительских у *T. fasciculata* присутствовала с коэффициентом корреляции 0,655 [79]. Коэффициент увеличения размеров у *T. tabulata* при половом воспроизведении также зависит от размера гаметангиев [83]. У некоторых центрических, например, *Melosira moniliformis* C.A. Agardh [190], верхняя граница репродуктивного размерного диапазона составляет 71 %, а у шовной пеннатной *Pseudo-nitzschia fraudulenta* (Cleve) Hasle – 83 % [67] от максимального видоспецифического размера.

Для изучаемых нами видов были рассчитаны скорости изменения длины клеток при содержании в клоновых культурах как средневзвешенное значение зависимого коэффициента уравнения линейной регрессии для всех клонов, изменение размеров клеток в которых регистрировалось при содержании в культуре (рисунок 4.3). В клоновых культурах *U. acus* в результате вегетативного размножения длина клеток постоянно уменьшалась со средней скоростью $5,7 \pm 1,1$ мкм·мес⁻¹ (N = 5), для *U. ulna* эта величина составила $5,5 \pm 0,4$ мкм·мес⁻¹ (N = 32), для *U. danica* $5,1 \pm 0,9$ мкм·мес⁻¹ (N = 7).

Межклоновые различия в скорости уменьшения размеров клеток достигали полутора и более раз. В клонах *U. ulna* (рисунок 4.4) был представлен достаточно широкий диапазон варьирования скорости уменьшения апикальной длины клеток, но 75 % клонов уменьшались со скоростью от 4 до 9 мкм·мес⁻¹. Скорость уменьшения клеток зависит от скорости их вегетативного размножения и от толщины поясковых ободков, величин, изменчивых и в разных видах и в пределах одного вида [34].

Абсолютная скорость уменьшения размеров клеток диатомовых зависит от их видовой принадлежности, у крупноклеточных видов она обычно выше, например, *A. crystallina* при содержании в аналогичных условиях уменьшалась

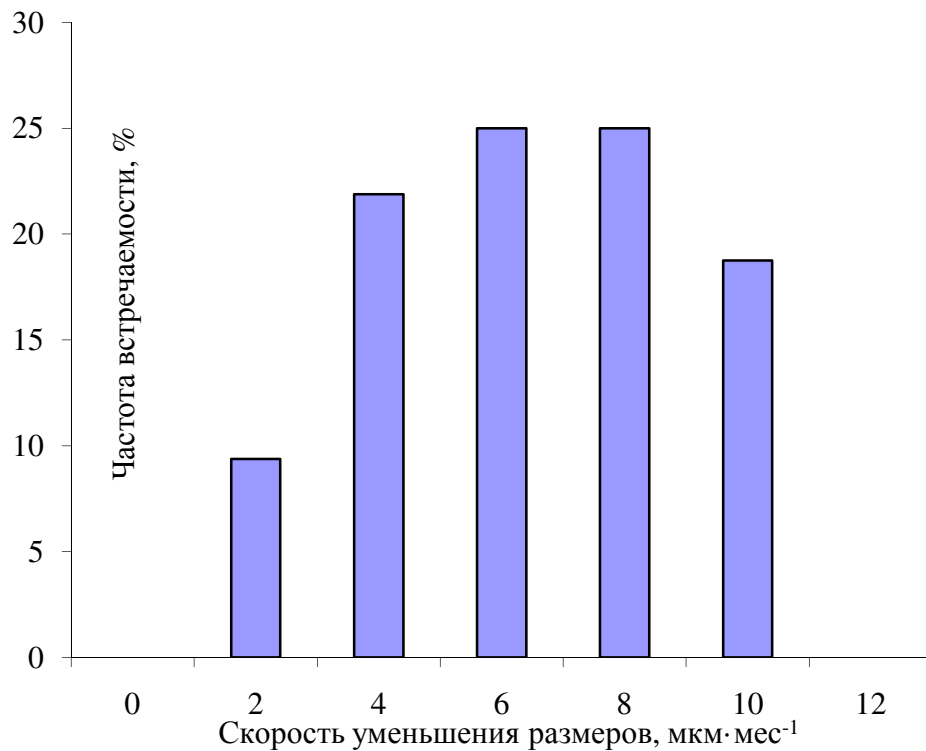


Рисунок 4.4 — Варьирование скорости уменьшения апикальной длины клеток клонов *Ulnaria ulna* в культуре

со скоростью $8,6 \text{ мкм} \cdot \text{мес}^{-1}$ [78], *N. longissima* до $15 \text{ мкм} \cdot \text{мес}^{-1}$ [13], близкородственная *T. tabulata* $6,1 \text{ мкм} \cdot \text{мес}^{-1}$ [83], у более мелкой *H. ostrearia* длина клеток уменьшалась на $3,74 \text{ мкм}$ в месяц [80].

Знание скорости уменьшения апикальной длины клеток позволяет выполнить приблизительную оценку средней продолжительности жизненного цикла. Разделив полный диапазон размеров на среднюю скорость их уменьшения для *U. acus* получим продолжительность жизненной истории порядка пяти с половиной лет для самых крупных и около трех лет для самых мелких инициальных клеток. Согласно расчетам для достижения отдельными клонами генеративной фазы в жизненном цикле должно пройти от 2,5 месяцев до 2,4 лет. Такое варьирование, как и в случае с общей продолжительностью жизненной истории, объясняется существенным различием размеров инициальных клеток. Продолжительность всего жизненного цикла для *U. ulna*

составила от двух до шести лет и дорепродуктивной фазы от одного до трех, а для *U. danica* – от четырех с половиной до семи и от одного года до трех с половиной лет соответственно.

Для представителей рода *Ulnaria* показана зависимость между апикальной длиной клеток и скоростью ее уменьшения. Мелкие клетки уменьшались в размерах медленнее, чем крупные. Например, у *U. ulna* клетки с длиной от 200 до 400 мкм (дорепродуктивная фаза жизненного цикла) уменьшались в среднем со скоростью $7,4 \text{ мкм} \cdot \text{мес}^{-1}$, а с длиной 80–190 мкм – $5,9 \text{ мкм} \cdot \text{мес}^{-1}$. А.М. Рощин [34], отметивший такую же закономерность для других видов, связывал это с тем, что створки и поясковые ободки становятся тоньше с уменьшением клеток в ходе вегетативного размножения. Уменьшение скорости изменения размеров клеток во время нахождения клона в репродуктивной фазе увеличивает, таким образом, время самой фазы и вероятность встречи с половым партнером и вступления в половой процесс.

Для всех изученных видов *Ulnaria* отмечена способность клеток к скачкообразному спонтанному уменьшению размеров (рисунок 4.5), которое может существенно ускорить прохождение дорепродуктивного этапа

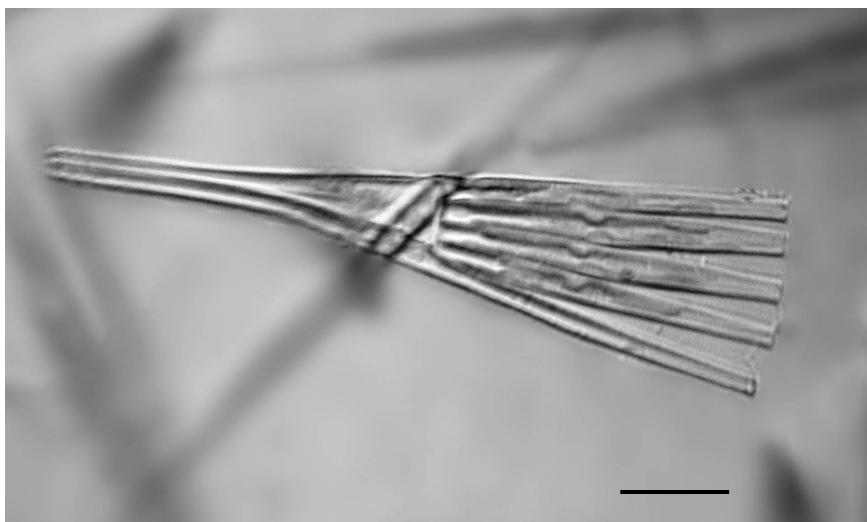


Рисунок 4.5 — *Ulnaria acus*, клетка с неправильным митотическим делением, при котором новообразованные клетки имеют меньшую апикальную длину. Масштаб 20 мкм

жизненного цикла. Скачкообразное уменьшение чаще всего проходит в крупных клетках, в результате неправильного митотического деления клетка может уменьшиться в размерах в два и более раза. Это явление не является уникальным и показано для других диатомей [34].

4.2 Особенности полового воспроизведения *Ulnaria acus* и комплекса видов *Ulnaria cf. ulna*

Достигнув верхней границы диапазона размеров, допускающих половое воспроизведение, клетки диатомовых водорослей могут перейти к мейозу, если этому способствует наличие всех необходимых условий (наличие полового партнера в случае раздельнополости, благоприятные температурные и световые условия). У диатомовых водорослей, как у диплоидных организмов, мейоз происходит во время гаметогенеза. Мейоз сам по себе не имеет каких-то особенностей [162].

Половое воспроизведение диатомовых происходит в форме аллогамии или аутомиксиса (автогамия, педогамия). Иногда встречается апомиксис. После оплодотворения образуется зигота, которая превращается в ауксоспору – клетку, способную быстро увеличиваться, достигая максимальных размеров характерных для вида. Ауксоспора обычно диплоидная, но известно также, что она может быть гаплоидной или полиплоидной, например, у *Licmophora* C.A. Agardh [34] и *Pinnularia* [205]. Ауксоспоры не являются покоящимися стадиями. Ауксоспорообразование редко происходит в неблагоприятных условиях и не приводит к увеличению числа клеток в популяции, поэтому не является размножением. После окончания процесса роста внутри ауксоспоры образуется эпитека и гипотека, т.е. таким образом, формируется инициальная клетка, размеры которой обычно приближаются к максимально возможным для данного вида.

Л. Гайтлер [107, 108] впервые изучил половое воспроизведение *Ulnaria ulna* (как *Synedra ulna*) в природе и показал, что для вида характерен гетероталлический половой процесс. Им было показано, что интенсификация гаметообразования происходит после выпадения осадков. Быстротечность репродуктивной фазы жизненного цикла, в принципе, затрудняет наблюдение полового воспроизведения в природных популяциях, которое при этом у большинства видов происходит в определенное время года. Поэтому, более детально половое воспроизведение диатомовых можно изучить с помощью клоновых культур. Мы проводили эксперименты в смешанных посевах в разных сочетаниях клонов *Ulnaria*, подбирая подходящие условия для скрещивания.

На четвертые-пятые сутки в смешанных посевах репродуктивно совместимых клонов *U. ulna* наблюдали аллогамный половой процесс. В нем участвовали клетки, принадлежавшие клонам противоположного пола, о чем свидетельствовали разные размеры клеток клонов, вступавших во взаимодействие. Половое воспроизведение, таким образом, можно охарактеризовать как гетероталлическое. Каждый мужской и женский гаметангий давал по две гаметы. На основании различий в поведении и способе формирования гамет клоны можно было разделить на мужские и женские, однако в конце гаметогенеза все гаметы приобретали сферическую форму и становились морфологически неразличимыми. Ранние стадии мужского и женского гаметогенеза различались существенно. В мужском гаметангии протопласт делился на две равные части в трансапикальном плане (рисунок 4.6 А–В). Перегруппировки гамет не наблюдали. На ранних стадиях мужские гаметы имели форму цилиндра с закругленными концами и независимо друг от друга могли реципрокно двигаться вдоль апикальной оси. В дальнейшем гаметы округлялись и одна за другой выходили из гаметангия, раздвигая его створки (рисунок 4.6 Г). В отличие от мужского, деление женского гаметангия происходило в апикальной плоскости (рисунок 4.6 Д–Ж). В начале своего развития женские гаметы были прикреплены к створкам материнской клетки

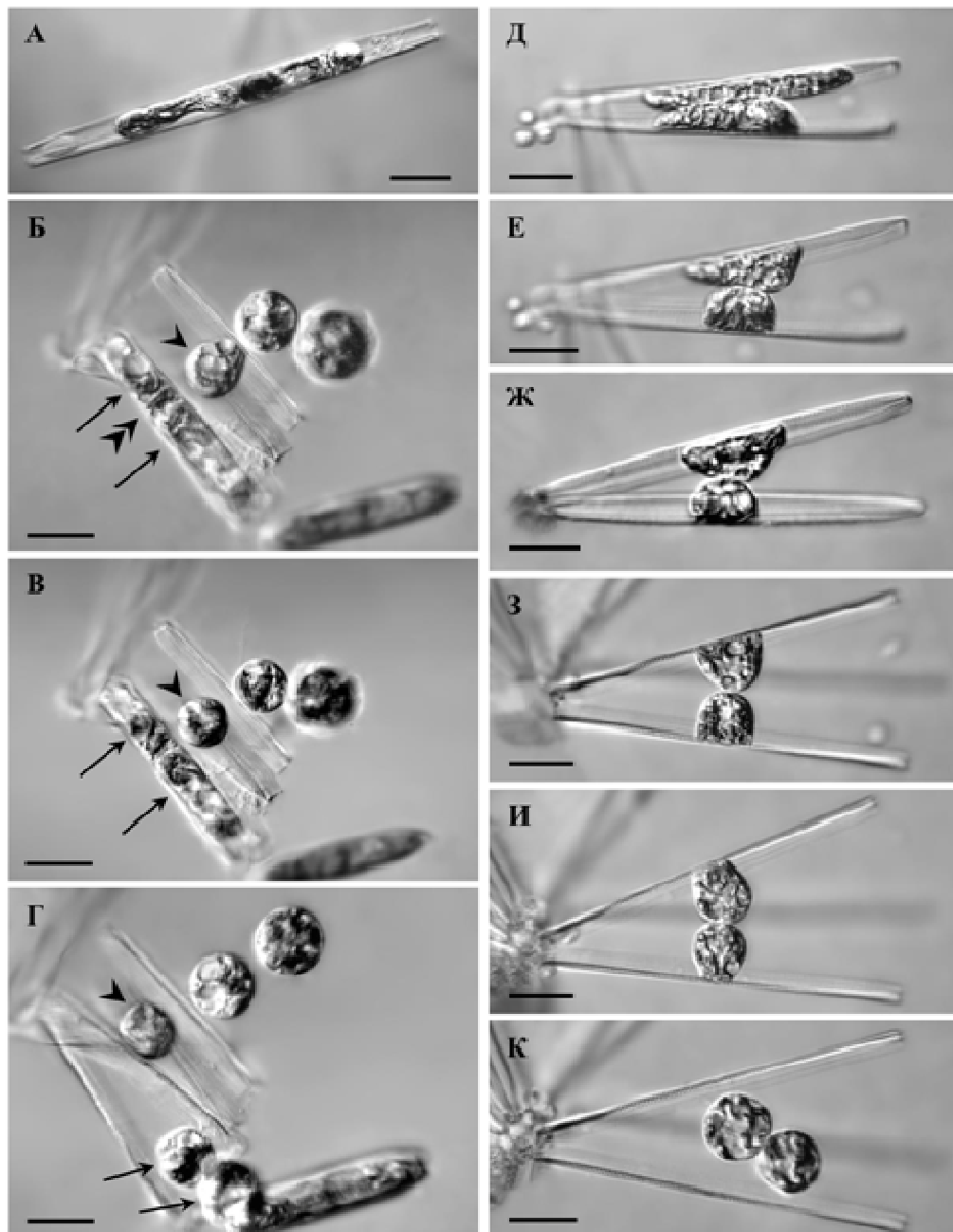


Рисунок 4.6 — *Ulnaria ulna*, мужской и женский гаметогенез, СМ, ДИК. А – содержимое мужского гаметангия делится в трансапикальной плоскости, давая начало двум гаметам; Б – ранняя стадия формирования мужских гамет (стрелки) – образуется перетяжка (двойная стрелка), женская гамета (короткая стрелка) на поздних стадиях формирования еще прикреплена к створке гаметангия; В, Г – как мужские, так и женские гаметы в конечном итоге становятся сферическими и теряют связь с панцирями родительских клеток; Д–К – последовательность формирования женских гамет. Масштаб 20 мкм [203]

одна против другой (рисунок 4.6 И). Развитие двух гамет в женском гаметангии не было полностью синхронным, очень часто одна из гамет развивалась быстрее, но со временем обе женские гаметы округлялись и теряли контакт со створками (рисунок 4.6 К).

Обычно зрелые женские гаметы лежали между или около "материнских" гаметангиальных панцирей. Иногда сингамия могла происходить в тот момент, когда женская гамета еще не отделена от створки. Мы наблюдали также слияние гамет, находившихся на значительном удалении от створок родительских клеток.

Родительские гаметангии зачастую располагались рядом достаточно произвольным образом по отношению друг к другу, могли быть прикрепленными к субстрату с помощью слизистой подушки или находиться в толще среды. При физическом контакте мужские и женские гаметы сливались с образованием зигот, которые содержали по два хлоропласта (рисунок 4.7 А). Ни копуляционных трубок, ни слизистых оболочек не наблюдали. Зиготы изначально имели сферическую форму (рисунок 4.7 А). Примерно через час-два зиготы начинали биполярно удлиняться (Рисунок 4.2 Б–В), и с этого момента их можно рассматривать как ауксоспоры. Растущие ауксоспоры не имели плотного контакта со створками материнской клетки, производящей женские гаметы, и могли находиться между ними или отдельно от них (рисунок 4.7 В–Г). Таким образом, в расположении ауксоспор по отношению к створкам гаметангия или друг к другу закономерностей также не выявлено.

Удлиненные ауксоспоры могли быть слегка изогнутыми. В отличие от некоторых других диатомовых водорослей [например, 173, 235], остатки оболочек зигот в виде "колпачков" на концах ауксоспор не были видны. Внутри полностью разросшейся ауксоспоры последовательно откладывались две створки, эпитека и гипотека, давая начало инициальной клетке (рисунок 4.7 Д), которая возобновляла митотические деления.

Схема полового процесса у *U. danica* не отличалась от таковой у *U. ulna*.

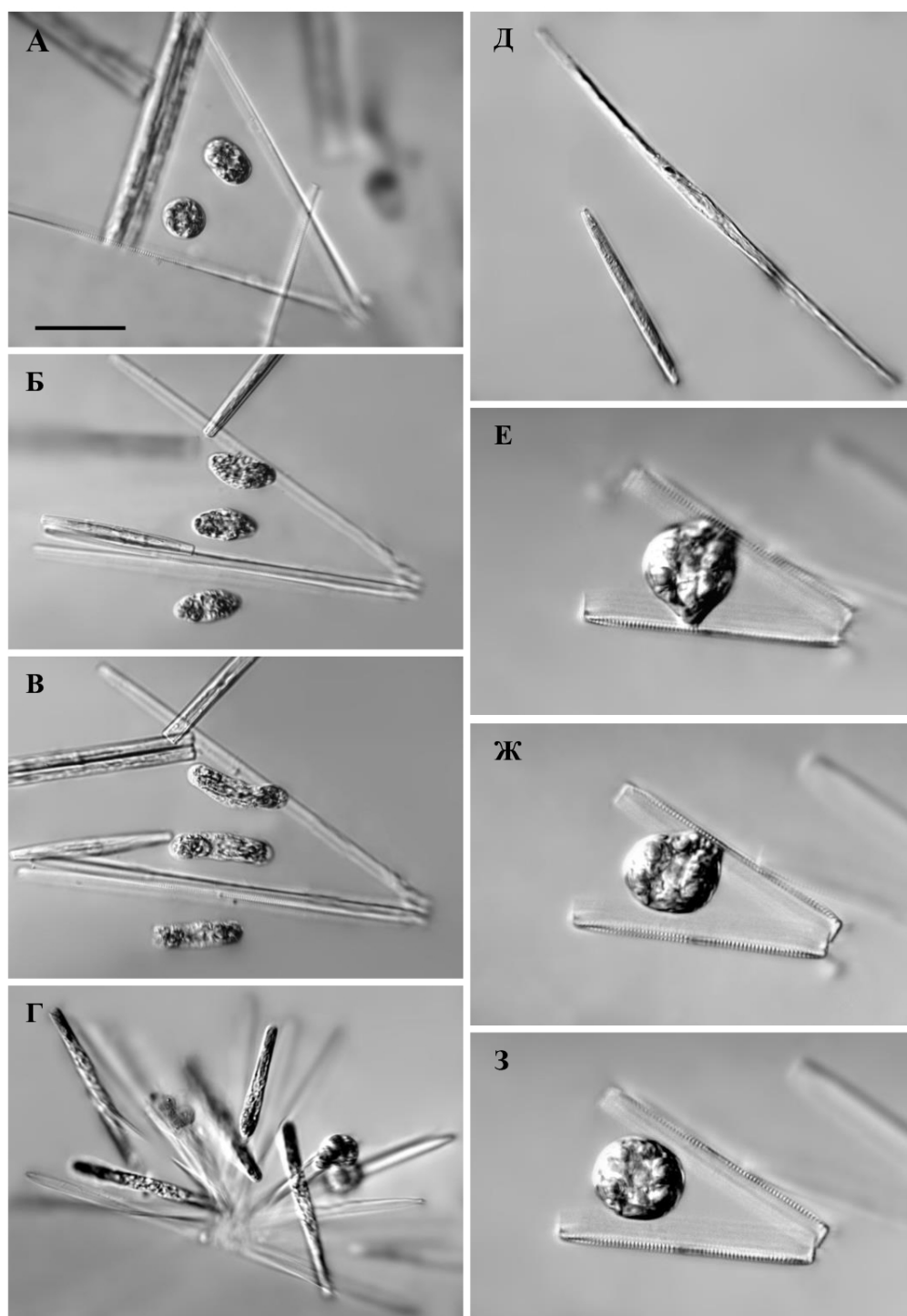


Рисунок 4.7 — *Ulnaria ulna*, формирование ауксоспор и педогамия: А – зигота (вверху) начала биполярное удлинение; Б–Г – стадии роста ауксоспор; Д – инициальная клетка заметно длиннее одной из клеток родительских клонов; Е–Ж – педогамное воспроизведение в женском клоне. Масштаб 20 мкм (А–Д) и 10 мкм (Е–Ж) [203]

В смесях клонов противоположного пола *U. acus* наблюдали аллогамный половой процесс на третьи-четвертые сутки после посева. Половой процесс в большинстве случаев наступал в пучках клеток, прикрепленных к субстрату. При этом в пучке могли находиться клетки разного пола, что можно было хорошо видеть при скрещивании двух клонов, клетки которых хорошо различались по апикальной длине. Клетки, в которых начинался гаметогенез, отличались появлением вакуолей, так же как и у *U. ulna*. В общих чертах половой процесс у *U. acus* такой же, как и у *U. ulna*: гаметообразование (рисунок 4.8 А–Д), сингамия и рост ауксоспор (рисунок 4.8 Е–И) не имели существенных отличий. Инициальные и постинициальные клетки в основном вели планктонный образ жизни, редко прикрепляясь к субстрату и не образуя колонии.

В смешанных посевах в обоих изученных видах часто наблюдали неслившиеся гаметы. Такое происходило, если гаметы из женского и мужского гаметангия находились друг от друга на значительном расстоянии или гаметогенез начинался в пучке клеток одного пола. Однако в пучках мужских клонов *U. ulna* не исключается аллогамное гомоталлическое половое воспроизведение ввиду способности продуцируемых ими гамет перемещаться на значительные расстояния (см. раздел 4.2).

Гаметы, которые не встретили полового партнера, а также абортировавшие зиготы, отмирали, и "раздуваясь", приобретали сферическую форму (рисунок 4.9 А). При этом хлоропласты собирались вместе и располагались у стенки. Абортирование гамет или ауксоспор наблюдали и у других диатомей, например у *Nitzschia lanceolata* W. Smith иногда происходило разрушение только одной из двух ауксоспор, производимых каждой парой гаметангиев [35]. В отдельных случаях наблюдали нарушения в развитии ауксоспор, приводящие к изменению их формы (рисунок 4.9 В, Г). Такие ауксоспоры в большинстве случаев погибали и не давали начала инициальным клеткам. Хотя в литературе описаны случаи гаплоидного партеногенеза, как у бесшовной *Licmophora ehrenbergii* (Kützinger) Grunow [32], при котором

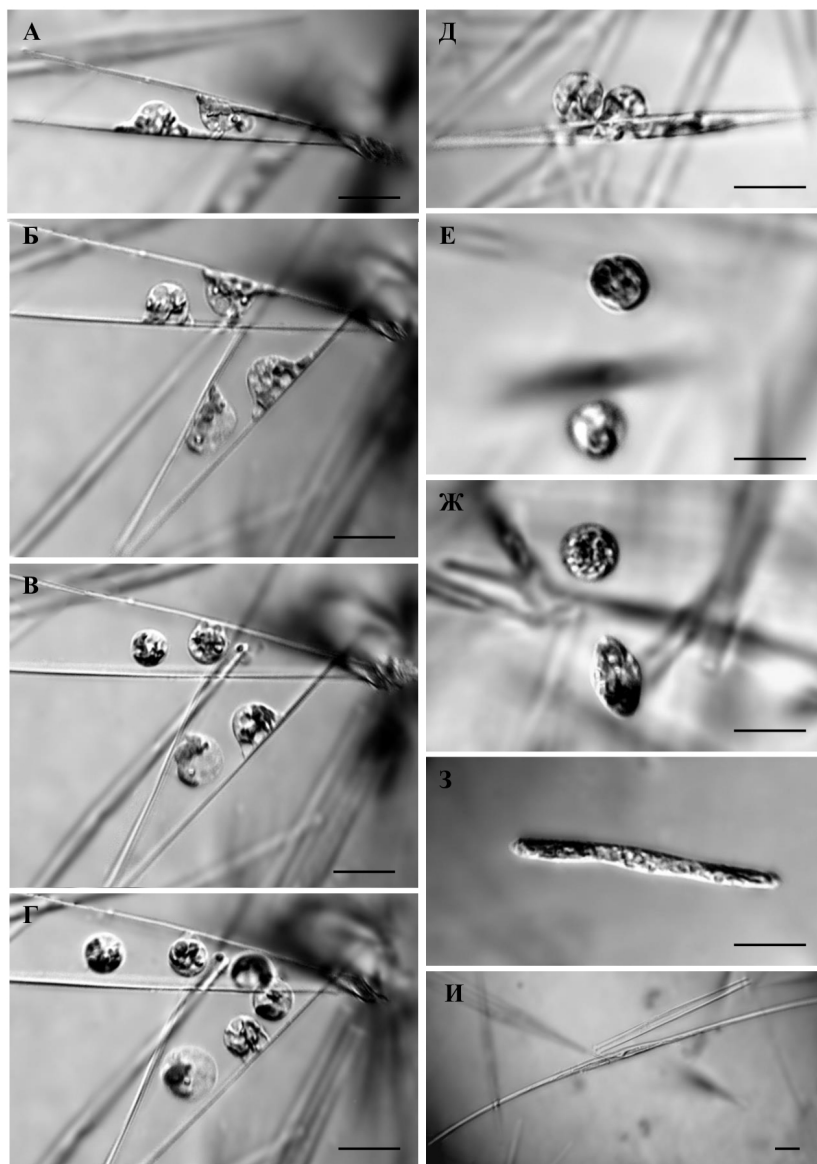


Рисунок 4.8 — *Ulnaria acus*, гаметогенез и образование аукоспор. А–Г – стадии женского гаметогенеза, содержимое гаметангия поделилось в апикальной плоскости, образовав две гаметы, прикрепленные к створкам. Созревая, женские гаметы округляются и отделяются от створок гаметангия; в паре гамет это происходит не всегда синхронно; Д – мужские гаметы, которые после деления мужского гаметангия в трансапикальной плоскости, раздвигая створки клетки гаметангия и округляясь, "выходят" в среду; Е–З – стадии формирования аукоспор; И – постинициальная клетка, апикальная длина которой более чем в два раза превышает длину материнской клетки. Масштаб 20 мкм [28]

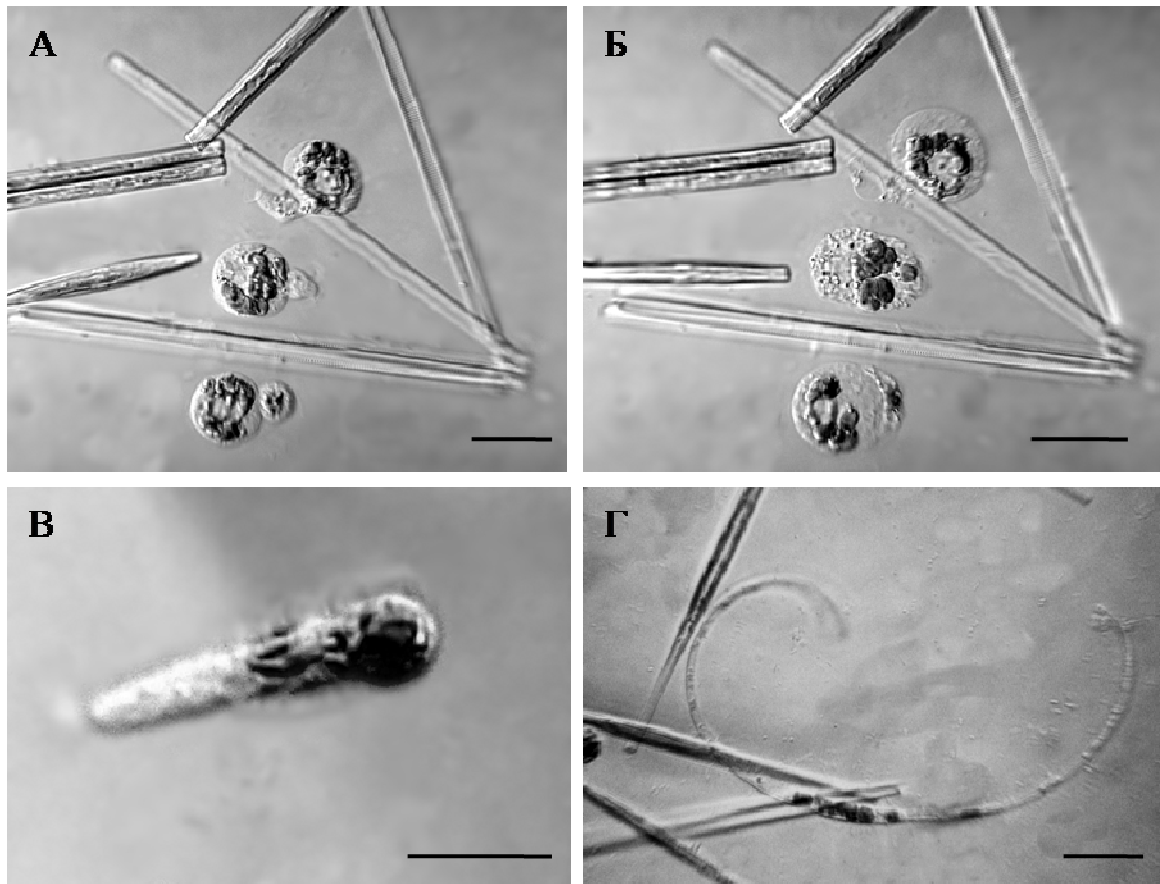


Рисунок 4.9 — Нарушения в развитии гамет, зигот и аукоспор. А – "раздувшиеся гаметы" *Ulnaria ulna* около створок гаметангиев; Б – гаметы начали разрушаться; В – аукоспора увеличивается только с одного конца; Г – аукоспора *Ulnaria acus* неправильной формы

образовывались инициальные клетки. Они были в два раза короче обычных и вскоре погибали. У *U. ulna* и *U. acus* гаплоидного партеногенеза мы не отмечали.

Л. Гайтлер, впервые описавший половое воспроизведение *U. ulna* [107, 108], дал описание аллогамного размножения как наиболее обычного для этого вида, однако показал, что на ранних стадиях гаметогенеза протопласт клеток, разделенный в продольной плоскости, прикрепляется к створкам; позже гаметы округляются, отделяются от панцирей материнской клетки и сливаются с

гаметами, которые в других клетках еще не отделились от створок. Ранние стадии мужского гаметогенеза в работах Л. Гайтлера не представлены.

Таким образом, схемы полового процесса *U. ulna* и *U. acus* соответствуют в основных чертах категории IA2b в системе Л. Гайтлера [105], классифицирующей модели полового воспроизведения и ауксоспорообразования у пеннатных диатомовых водорослей. Тип полового процесса, при котором в одной гаметангии образуются две гаметы женского типа (пассивные), а в другой — мужского типа (активные), называют цис-анизогамией [164].

Поведенческая анизогамия, которая может проявляться как у самих гаметангиальных клеток, так и у гамет, формируемых клонами противоположного типа спаривания (мужских и женских), характерна и для других видов бесшовных и шовных пеннатных диатомовых: *Sellaphora pupula* (Kützinger) Mereschkovsky [169], *Achnanthes javanica* f. *subconstricta* (Meister) Husted [189], *L. ehrenbergii* [32], *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle [82], *Nitzschia longissima* (Brébisson) Ralfs [86], *Tabularia tabulata* (C.A. Agardh) Snoeijjs [83], *Neosynedra delicatissima* (Proshkina-Lavrenko) Bukhtiyarova (ранее *Fragilaria delicatissima* Proshkina-Lavrenko) [34] и др. При этом, например, у шовных *A. javanica*, *P. multiseries*, *S. pupula* различий в морфологии гамет не наблюдали ни на одном из этапов их формирования.

У бесшовных *L. ehrenbergii*, *T. tabulata*, *T. fasciculata*, *N. delicatissima*, а также шовной *N. longissima* [13] наблюдали и поведенческую, и морфологическую анизогамия. В отличие от *U. ulna*, у близкородственных *T. tabulata* [83] и *T. fasciculata* (C.A. Agardh) D.M. Williams [33, 79] женские гаметы теснее связаны с гаметангиальными теками, у *N. delicatissima* женские гаметы были не только неподвижными, но и неокругляющимися и не теряющими связь с гаметангиальной створкой [34]. Интересно, что у бесшовной *L. ehrenbergii* женские гаметы никогда не перестраивались, но гаметы в мужских гаметангиях могли перестраиваться, в зависимости от относительного положения спаривающихся гаметангиев [66].

Стимуляция гаметогенеза у пеннатных диатомовых водорослей происходит с помощью феромонов, которые взаимно стимулируют сексуализацию репродуктивно совместимых клонов [138, 214]. У *Pseudostaurosira trainorii* процесс полового воспроизведения запускается каскадно: гаметогенез мужских клонов стимулируется женским феромоном, который, по-видимому, секретруется женскими вегетативными клетками постоянно. Мужские вегетативные клетки подвергаются мейотическому делению и высвобождают две подвижные гаметы. При этом мужские клетки и/или гаметы выделяют второй феромон, который стимулирует гаметогенез женских клеток [214]. У бентосной пеннатной диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin выделение феромонов происходит клетками одного типа спаривания (mt^-) и выполняет роль привлечения партнера противоположного типа спаривания (mt^+) [138, 248]. Аналогичным образом, сигнал, выпущенный mt^- клетками делает возможным спаривание у *Seminavis robusta* D.B. Danielidis & D.G. Mann [114]. Для *T. fasciculata* и *Ardissonea crystallina* (C.A. Agardh) Grunow показано, что гаметогенез индуцируется без контакта с клетками противоположного пола и, предположительно, также связан с выделяемыми феромонами [79, 202, 203].

Гипотезу о влиянии феромонов на половую активность клеток мы подтвердили результатами экспериментов, в которых клетки клонов различного пола были высажены с разных сторон чашки Петри (рисунок 4.10). В чашку Петри с диаметром 80 мм сексуально-совместимые клоны были засеяны с двух сторон чашки так, чтобы вероятность встречи клеток на границе (середина чашки) была минимальной (см. Материалы и методы, рисунок 2.1). В этом эксперименте участвовали две пары клонов Пара клонов *U. ulna* 2.0423-С и 2.0419-С воспроизводилась гетероталлическим путем, клон 2.0419-С давал мужские гаметы, клон 2.0423-С – женские. При этом оба клон ни разу за все время наблюдений не воспроизводились гомоталлически. Воспроизведение начиналось со смеси клонов на третий-четвертый день после посева. На границе встречи двух клонов наблюдали максимальное по интенсивности

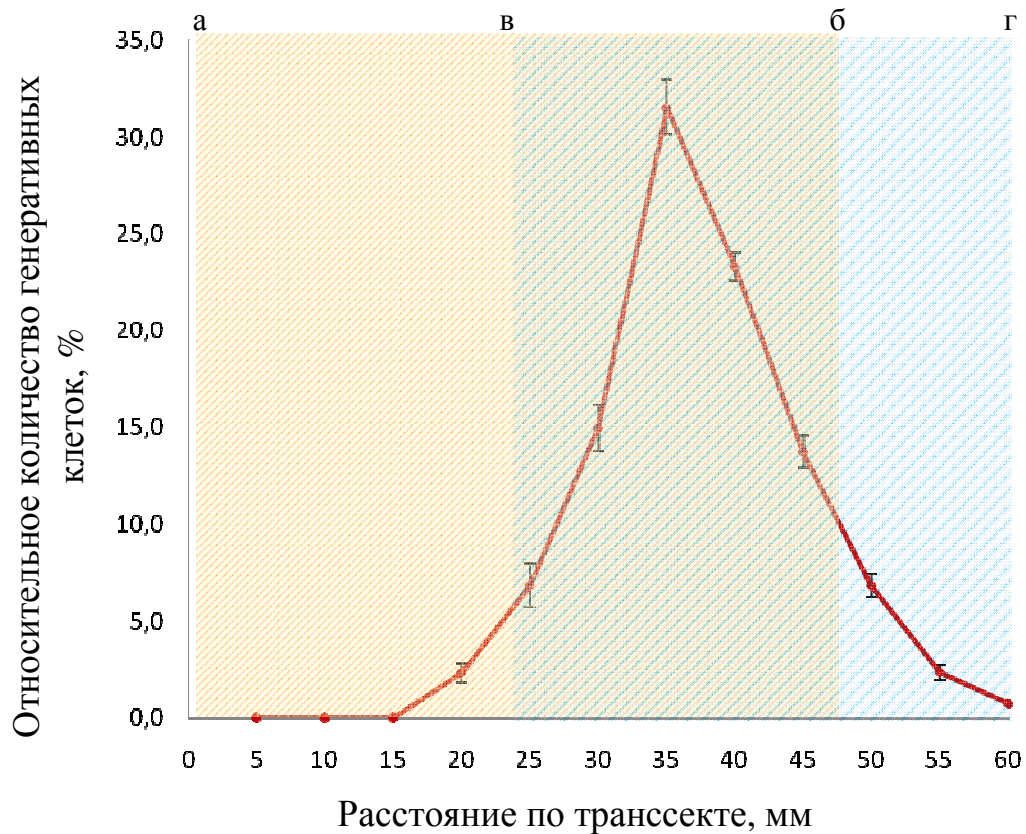


Рисунок 4.10 — Количество генеративных клеток в смеси репродуктивно совместимых клонов *Ulnaria ulna* на пятые сутки экспериментов при пространственном разделении мужского и женского клона в чашке. а–б – зона распространения клеток мужского клона 2.0419-С; в–г – зона распространения женского клона 2.0423-С; в–б – зона перекрытия – встречаемости клеток двух клонов

воспроизведение, встречались гаметы, зиготы и растущие ауксоспоры. При межклоновом воспроизведении *U. ulna* максимальное количество половых клеток, обнаруженное на границе встречи двух клонов, может быть обусловлено не только увеличившейся вероятностью встречи родительских клеток, что подтверждается разными размерами родительских клонов, но и большей доступностью выделяемых феромонов. Следует упомянуть, что у бесшовной *U. ulna* доставка гамет к месту сингамия не может осуществляться за счет родительских клеток в силу их малоподвижности. Чем дальше от границы

соприкосновения клонов расположены клетки, тем интенсивность полового процесса оказывается меньшей. Однако, возле стенок на двух противоположных сторонах чашки наблюдали разную картину (рисунок 4.10): в мужском клоне гаметогенез при удалении от центра прекращался полностью, тогда как в женском клоне можно было увидеть случаи гаметогенеза за пределами зоны контакта, но без образования зигот и ауксоспор. Если бы гаметогенез в женском клоне происходил без воздействия феромонов мужского клона, то его интенсивность была бы равномерной по всей площади распространения женского клона. Единственной причиной этого могут быть выделяемые клетками мужского клона феромоны, концентрация которых уменьшается с удалением от границы расположения мужского клона.

Еще одним доказательством выделения феромонов клетками *U. ulna* можно считать гаметогенез, который происходил в клоновых культурах при добавлении фильтрата среды, в котором содержался клон противоположного пола (см. раздел 3.3).

У пеннатных диатомовых, у которых, в отличие от центрических, наступление полового процесса в основном зависит размера клеток, и в меньшей степени от влияния внешних факторов, межклеточные взаимодействия между репродуктивно совместимыми клетками могут быть одним из основным стимулов, определяющим вступление в процесс полового воспроизведения [66, 68, 114, 214]. Выделение специфических феромонов может также служить одним из механизмов репродуктивной изоляции между близкородственными видами.

4.3 Движение гамет

Исторически диатомовые водоросли были разделены на две группы: центрические и пеннатные, в первую очередь на основании морфологии их клеточной стенки. Что касается полового размножения, подавляющее

большинство центрических оогамны, производят неподвижные яйцеклетки и подвижные сперматозоиды. Подвижность сперматозоидов центрических диатомей обеспечивается за счет наличия одного жгутика, имеющего необычное внутренне строение (ось жгутика демонстрирует модель "9 + 0", лишенную центральных микротрубочек), направленного вперед и совершающего волнообразные движения [34, 127, 176, 214]. Более молодые в эволюционном плане и произошедшие от центрических пеннатные диатомеи производят гаметы, лишенные жгутиков, что является достаточно уникальным явлением в растительном царстве.

Стратегия оплодотворения большинства пеннатных диатомей связана с аллогамным половым процессом, при котором для сингамии необходимо взаимодействие гамет из двух разных клеток [34, 67]. У подвижных шовных пеннатных проблема доставки гамет к месту слияния решается активным движением гаметангиев к друг другу с образованием гаметангиальной пары, как, например, у *Nitzschia reversa* W. Smith sensu Kramer & Lange-Bertalot [166] и *Navicula directa* var. *directa* (W. Smith) Ralfs in Pritchard [188], или группы клеток как у *Schizostauron* Grunow [77, 84] и *Entomoneis* cf. *paludosa* (W. Smith) Reimer [201]. У некоторых видов наблюдается формирование слизистых капсул, окружающих гаметангиальные пары, как у *Lyrella atlantica* (A. Schmidt) D.G. Mann и *Stauroneis anceps* Ehrenberg [160, 173]. Для достижения контакта у гамет, находящихся в непосредственной близости (на расстоянии меньшем их диаметра), задействован механизм амебоидного движения или/и увеличения размера гамет [84, 201]. Особый узкоспециализированный случай — формирование копуляционных каналов — характерен для эволюционно продвинутых родов *Nitzschia* sensu stricto [163] и *Eunotia* Ehrenberg [109].

У бесшовных диатомей доставка гамет сопряжена с трудностями, возникающими из-за неподвижности клеток. У некоторых видов бесшовных диатомей родительским клеткам необходимо очень близко примыкать друг к другу, в этом случае гаметы могут достигать места сингамии посредством амебоидного движения, как например у *Licmophora communis* (Heiberg) Grunow

[34, 66]. Особый способ доставки гамет к месту слияния был впервые обнаружен у *Tabularia fasciculata* и *T. tabulata* [81]. У них мужские гаметы способны перемещаться на относительно большие расстояния, в несколько раз превышающие их диаметр. Достигается это путем образования псевдоподиальных выростов. О подобном способе движения сообщалось также у *Pseudostaurosira trainorii* [214]. Позднее псевдоподиальные выросты были обнаружены у полярной центрической диатомеи *Ardissonea crystallina*, в настоящее время относимой к классу Mediophyceae [182, 186], демонстрирующий неоогамный тип полового процесса нетипичный для центрических [78].

У *Ulnaria ulna* (рисунок 4.11) и *U. acus* (рисунок 4.12) нами также была отмечена способность гамет к движению. Их вращение и хаотическое движение совпадало с образованием тонких цитоплазматических выростов, напоминающие псевдоподии. При этом было обнаружено, что только мужские гаметы способны перемещаться. Хотя Л. Гайтлер писал, что для морфологически изогамных гамет бесшовных диатомей типична физиологическая анизогамия, в том числе движение гамет, однако последнюю он не связывал с выражением различной половой конституции, а воспринимал как чисто физиологическое явление (возрастное различие, разбухание слизи). Л. Гайтлер отметил, что активность/пассивность гамет у *Synedra* это не выражение их сексуальной конституции, а то, что гаметы соседних материнских клеток созревают неравномерно, и те из них, которые раньше отрываются от створок, начинают движение первыми, и передвигаются к молодым еще покоящимся гаметам [107].

Мы отметили, что у представителей рода *Ulnaria* псевдоподиальную активность мужских гамет можно было выявить на разных стадиях их формирования. Процесс формирования псевдоподий у гамет начинался, когда они еще лежали между створками гаметангия, и продолжался после выхода из гаметангия. Процесс формирования псевдоподиальных выростов был циклическим. Вначале гаметы были почти идеально сферическими и

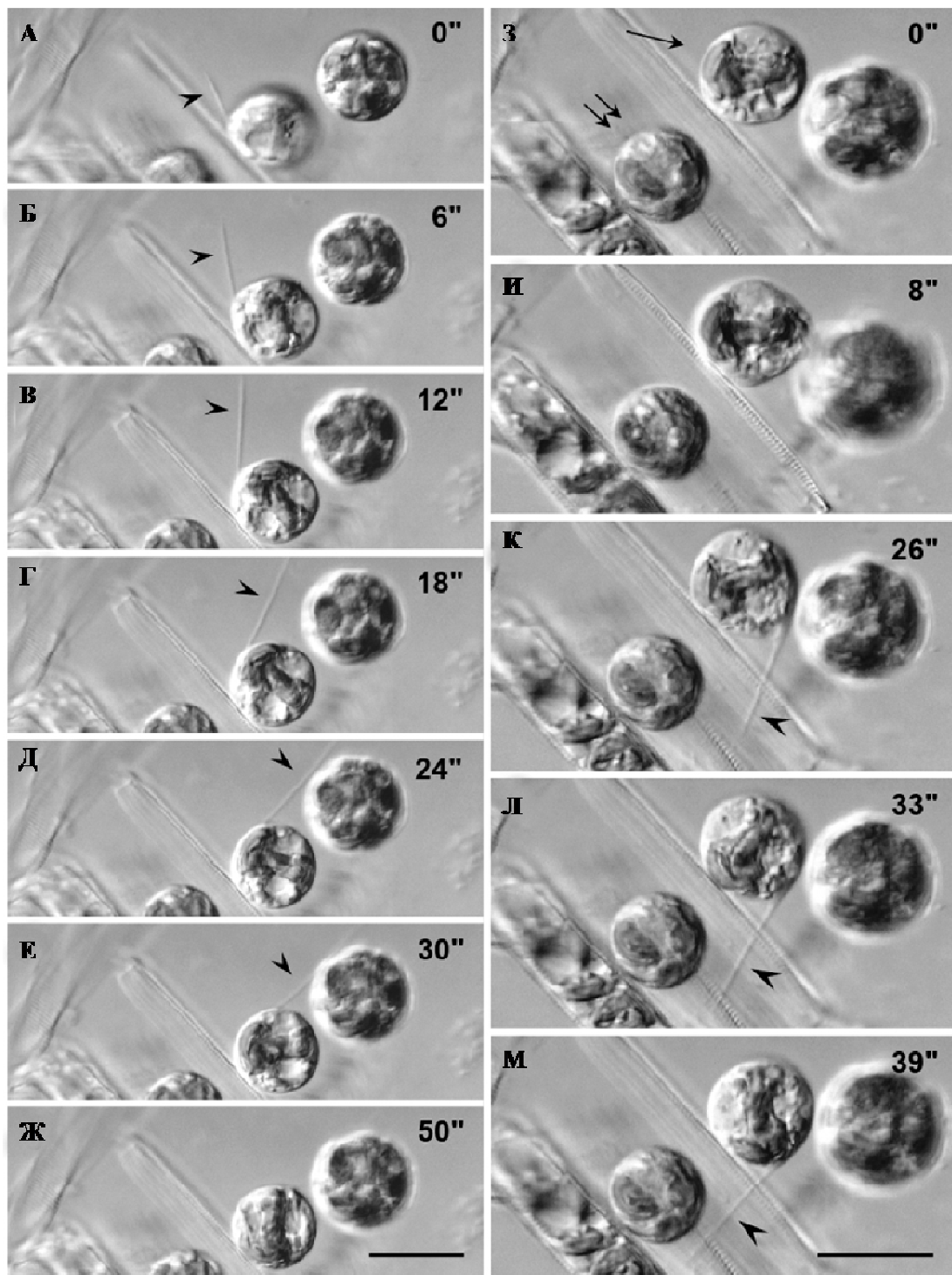


Рисунок 4.11 — *Ulnaria ulna*, этапы формирования цитоплазматических выростов в мужских гаметах. А, З–И – первый этап псевдоподиальной активности, теряется сферическая форма клетки, появляется тонкий вырост; Б–Е, К–М – псевдоподии удлиняются и провоцируют вращение гаметы; Ж – цикл заканчивается, выросты исчезают. Стрелками показаны структуры, напоминающие псевдоподии. Масштаб 10 мкм [203]

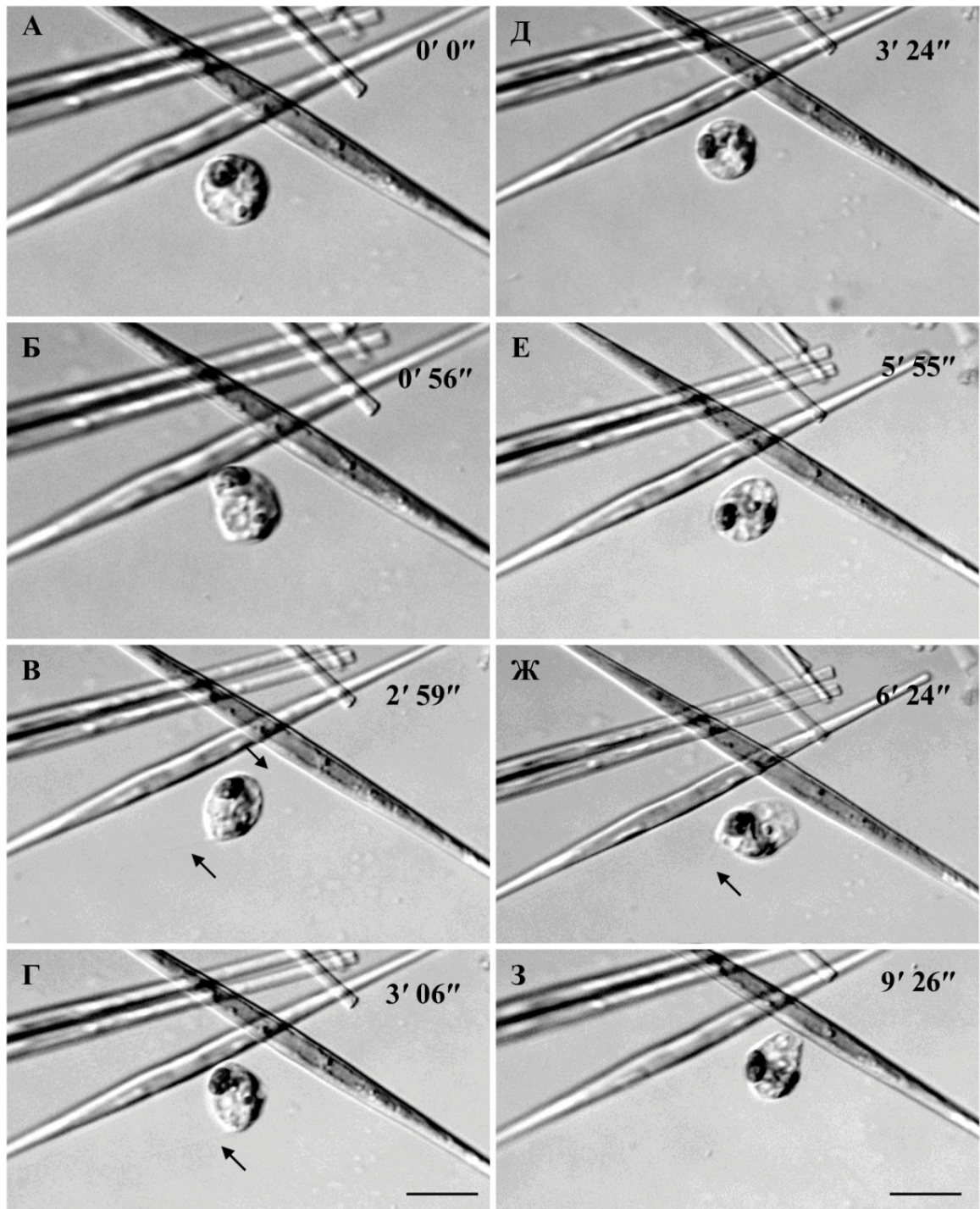


Рисунок 4.12 — *Ulnaria acus*, стадии движения гамет. А, Д – стадии покоя, гамета круглая, без псевдоподиальных выростов, неподвижная; Б–Г, Е–З – поверхность гаметы становится активной, гамета меняет свою форму, поворачивается и совершает небольшие движения, то приближаясь, то отдаляясь от створок соседних клеток. Стрелками показаны структуры, напоминающие псевдоподии. Масштаб 20 мкм [28]

неподвижными. Через несколько минут поверхность гамет становилась активной, появлялась бугристость, искажающая сферическую форму. Со временем короткие и более широкие выросты исчезали, и на поверхности появлялись тонкие удлиняющиеся нити, напоминающие аксоподии [119]. У *P. trainoriis* [214] подобные тонкие цитоплазматические нити также не ветвились и содержали тубулин, организованный в трубочки, что подтверждает их аксоподиальную природу. Ширина нитей была равномерной по всей длине.

Вздутия на аксоподиях находились на фиксированном расстоянии друг от друга и от концов нитей и не перемещались вдоль них, в то время, как в целом длина выроста увеличивалась. Следовательно, можно сделать вывод о том, что рост цитоплазматических выростов происходил не в дистальных, а в проксимальных отделах. По достижении максимальной длины выступы становились гибкими и начинали втягиваться. Складывалось впечатление, что выросты "наматываются" вокруг гамет, и последняя вынуждена вращаться в противоположном направлении (по аналогии с клубком ниток). В конце цикла псевдоподии полностью исчезали, движение прекращалось, и форма гамет снова становилась сферической. Цикл повторялся через несколько минут.

Движение во время вращения позволяло гаметам перемещаться на значительные расстояния, в отличие от амебоидного движения благодаря которому преодолевались последние микрометры перед слиянием с женской гаметой.

Образование нитей и движение мужских гамет происходило ненаправленно, случайным образом. Мы наблюдали множество мужских гамет, не слившихся с женскими, несмотря на то, что последние находились в пределах досягаемости псевдоподий.

Длина псевдоподиальных выростов, отмеченных нами у представителей рода *Ulnaria*, была небольшой, не превышала 50 мкм. Такие же небольшие псевдоподии формировались у *T. fasciculata*, тогда как у *T. tabulata* они достигали 150 мкм в длину [81]. У *P. trainorii* длина выростов была меньше, чем у *T. tabulata*, она доходила до 84 мкм [214]. Количество

цитоплазматических выростов, которые можно было наблюдать одновременно на поверхности гамет, у *U. ulna* и *U. acus*, также как у *P. trainorii*, было небольшим по сравнению с отмеченным у представителей рода *Tabularia* и у полярной центрической диатомеи *A. crystallina* [78]. Мы не наблюдали агглютинации ("слипания") нитей друг с другом, что, возможно, связано с относительно небольшой длиной и количеством псевдоподий у *U. ulna* и *U. acus*. Вздутия на аксоподиях у *Ulnaria* и по размеру, и по количеству были меньшими, чем у *T. tabulata*, *T. fasciculata* и *A. crystallina*.

Филогенетическое родство некоторых диатомей, у которых наблюдали появление псевдоподиальной активности (*Tabularia*, *Ulnaria*) [194], позволяет предположить, что подобный тип движения может присутствовать и у других бесшовных пеннатных. Для *Striatella unipunctata* (Lyngbye) C.A. Agardh было показано, что мужские гаметы, покидая гаметангий, вплотную приближаются к женским гаметам [34], при этом способ движения не описан. У *L. communis* [34, 66] наблюдали только амебоидный способ движения мужских гамет. Как и у представителей рода *Ulnaria* и *Tabularia*, у вышеотмеченных видов способность к движению проявляли именно мужские гаметы.

Появление движения с помощью псевдоподиальных выростов у бесшовных пеннатных (*T. fasciculata*, *T. tabulata*, *P. trainorii*, *U. ulna* и *U. acus*) [28, 81, 203, 214] и в группе токсариид, относящихся к полярным центрическим (*A. crystallina*) [78], может свидетельствовать о конвергентной эволюции, которая произошла в двух классах диатомей. Цитоплазматические нити возникли и закрепились в эволюционно далеко отстоящих друг от друга группах диатомовых в разное время. Очевидно, что в группе токсариид они появились раньше, чем у бесшовных пеннатных. У неподвижных диатомей такое эволюционное приобретение позволяет гаметам перемещаться на расстояния, превышающие диаметр самой гаметы, тем самым значительно повышая вероятность контакта с половыми клетками противоположного пола.

4.4 Системы скрещивания изученных видов рода *Ulnaria*

Система скрещивания представляет собой систему возможных путей полового воспроизведения. Существует два пути полового воспроизведения – гомоталлический (с участием только одного клона) и гетероталлический (с участием двух клонов противоположного пола, или типа спаривания, если пол морфологически не определяется). У центрических диатомовых в клоне могут образовываться как мужские, так и женские гаметы, что благоприятствует гомоталлическому воспроизведению, хотя в природных популяциях, вероятнее всего, происходит перекрестное оплодотворение. Большинство пеннатных диатомовых раздельнополы, это подразумевает гетероталлический путь воспроизведения. Хотя при этом у отдельных пеннатных наряду с гетероталлическим воспроизведением отмечались случаи гомоталлизма [67, 106]. У некоторых видов к гомоталлизму склонны представители только одного пола [79], что, возможно, определяется в большей мере степенью подвижности гамет, а не генетическими запретами. Известны раздельнополые виды, у которых при явном доминировании гетероталлизма у каждого из полов наблюдались редкие случаи внутриклонового воспроизведения (например, у *T. tabulata*), при этом мужской пол отличался большей эффективностью гомоталлического воспроизведения [83]. Система скрещивания видов напрямую связана с характером детерминации пола. Если у центрических проявление пола регулируется эпигенетически, то у пеннатных диатомей пол закреплен генетически и не изменяется в клоне на протяжении всего онтогенеза [86, 161].

За семь лет наблюдений и экспериментов по скрещиванию ни у одного клона *U. acus* не было обнаружено способности к гомоталлическому воспроизведению, тогда как в смесях клонов противоположного пола при соблюдении необходимых условий практически во всех случаях наблюдался гетероталлический половой процесс (таблица 4.1).

Таблица 4.1 — Воспроизведение в смешанных посевах *Ulnaria acus*

Популяция	Имя клона	Пол	0.0224-OE	0.0224-OD	0.0224-OJ	0.0304-YC	0.0304-YD	0.0316-YE	5.1015-B	5.1015-C	5.1015-D	5.0903-A	5.0903-D	5.0903-F	B 114	B 118	B 119	3.0213-B*	3.0213-C*	3.0213-D*	3.0213-E*	5.0227-C	5.0227-E	5.0227-F	5.0227-G	5.0227-I
			F	F	F	F	F	M	F	M	F	F	F	M	F	F	M	F	F	F	M	M	M	F	F	F
р. Эрдр, Франция	0.0224-OE	F																								
р. Эрдр, Франция	0.0224-OD	F	0																							
р. Эрдр, Франция	0.0224-OJ	F	0	0																						
р. Эрдр, Франция	0.0304-YC	F	0	0	0																					
р. Эрдр, Франция	0.0304-YD	F	0	0	0	0																				
р. Эрдр, Франция	0.0316-YE	M	3	3	3	3	3																			
оз. Рица, Россия	5.1015-B	F	0	0	-	0	0	3																		
оз. Рица, Россия	5.1015-C	M	2	3	2	2	2	0	3																	
оз. Рица, Россия	5.1015-D	F	0	0	-	0	0	2	0	2																
оз. Хубсугул, Монголия	5.0903-A	F	0	0	0	0	0	3	0	2	0															
оз. Хубсугул, Монголия	5.0903-D	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0														
оз. Хубсугул, Монголия	5.0903-F	M	-	3	-	3	3	0	3	0	3	2	2													
оз. Фролиха, Россия	B 114	F	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	0	2												
оз. Фролиха, Россия	B 118	F	-	-	-	-	-	-	0	2	0	-	-	-	0											
оз. Фролиха, Россия	B 119	M	-	2	-	2	2	0	0	-	0	2	2	0	3	2										
оз. Фролиха, Россия	3.0213-B*	F	-	0	0	0	0	3	-	0	-	0	0	-	0	0	3									
оз. Фролиха, Россия	3.0213-C*	F	-	0	0	0	0	2	1	0	2	0	0	2	0	0	3	0								
оз. Фролиха, Россия	3.0213-D*	F	-	-	-	-	-	-	3	0	2	0	0	-	0	0	2	0	0							
оз. Фролиха, Россия	3.0213-E*	M	-	-	-	3	3	0	0	2	0	-	-	0	-	-	0	3	3	1						
оз. Матано, Индонезия	5.0227-C	M	-	-	-	-	-	-	0	3	0	-	2	0	2	-	0	-	-	-	0					
оз. Матано, Индонезия	5.0227-E	M	2	2	-	3	3	0	-	-	-	-	2	0	2	-	0	-	1	-	0	0				
оз. Матано, Индонезия	5.0227-F	F	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	-	3	3			
оз. Матано, Индонезия	5.0227-G	F	-	-	-	-	-	-	0	2	0	0	0	-	0	0	3	0	0	0	2	2	3	-		
оз. Матано, Индонезия	5.0227-I	F	0	0	0	0	0	3	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0	0	0	2	2		-	-	

Примечание: частота (обилие) случаев воспроизведения оценена в баллах: 0 – нет воспроизведения, 1 – редкие случаи, 2 – нередко, 3 – массовое воспроизведение, - – не проверяли; * – потомки первого поколения, полученные здесь в результате скрещивания клонов B 114 и B 119; F – клоны женского пола, M – клоны мужского пола.

Изначально для получения полового воспроизведения у *U. acis* нами было использовано всего три клона, выделенные из природной популяции оз. Фролиха, которые в смешанных посевах успешно вступили в половой процесс и дали жизнеспособное потомство. Инициальные клетки – потомки первого поколения, образовавшиеся в результате гетероталлического воспроизведения, были введены в культуру. После уменьшения клеток до размеров, при которых клоны стали сексуально-индуцибельными (194 мкм и менее), потомки также свободно скрещивались между собой и при возвратном скрещивании с родительскими клонами (таблица 4.1). Пол потомков был подтвержден морфологическими признаками. В потомстве одной родительской пары были предоставлены и мужские, и женские клоны.

Все изученные клоны *U. acis* оказались способными вступать в гетероталлическое половое воспроизведение при внутрипопуляционных и межпопуляционных скрещиваниях в смесях клонов противоположного пола (таблица 4.1). Среди выделявшихся нами из природных популяций клонов большинство были женскими, так, например, в популяции из р. Эрдр, только один из 7 клонов оказался мужским.

У *U. ulna* половое воспроизведение впервые обнаружено в моноклоновой культуре 8.0626-Д. Все гаметы, которые наблюдались в этом случае, были сферическими (на всех этапах формирования) и подвижными. Во всех аспектах своей морфологии и поведения они были сходны с мужскими гаметами, которые позднее были обнаружены в гетероталлических парах. В последующих экспериментах мы выяснили, что и мужские, и женские клоны *U. ulna* были способны к внутриклоновому воспроизведению. Такая способность была обнаружена почти у половины исследованных клонов (18 из 42). Внутриклоновое воспроизведение не было обильным по сравнению с межклоновым и не всегда приводило к образованию жизнеспособных инициальных клеток, иногда процесс заканчивался на стадии образования гамет или зигот.

В мужских клонах внутрикловое воспроизведение было аллогамным, в случае женских клонов мы наблюдали педогамное воспроизведение, когда две женские гаметы, продуцируемые одним и тем же гаметангием, сливались, будучи прикрепленными к створкам материнской клетки (Рисунок 4.7 Е–З). Теоретически аутомиксис в мужских клонах, а также аллогамия в женских клонах также возможны. В мужских клонах *U. ulna* отличить педогамия от аллогамного воспроизведения не представляется возможным. Аллогамия в женских клонах мы не наблюдали. В качестве исключения из нормальной перекрестной копуляции Л. Гайтлер также описывал аутомиктическое (педогамное) оплодотворение, когда единственная материнская клетка формирует только одну зиготу, прикрепленную к обоим клапанам створки [107, 108], однако Гайтлеровское описание гомоталлизма у *U. ulna* не соотносится с каким-либо определенным полом. Аутомиктическая ауксоспоруляция была описана как единственный способ полового воспроизведения у *Synedra vaucheriae* (Kützinger) Kützinger [112].

В начале наших экспериментов не было полной ясности в отношении системы скрещивания *U. ulna*, поэтому было проблематично установить половую принадлежность клонов, руководствуясь только таблицей скрещиваний, поскольку часть мужских клонов воспроизводилась гомоталлически в смесях с другими мужскими клонами. Складывалось ложное впечатление об их репродуктивной совместимости. Впоследствии при более тщательно выполненных наблюдениях за ранними стадиями гаметогенеза мы смогли установить, что в смесях мужских клонов формируются гаметы исключительно одного типа (в процессе трансипикального деления), в то время как в смесях мужских и женских клонов наблюдался гаметогенез двух типов [203]. Кроме того, тщательное изучение полученных данных выявило выраженную разницу в частоте ауксоспоруляции и способности образовывать жизнеспособные ауккоспоры и инициальные клетки при гомо- и гетероталлическом воспроизведении (таблица 4.2). В смесях, где мужской клон проявлял способность к гомоталлизму, появлялись единичные ауккоспоры, в то

Таблица 4.2 — Воспроизведение в смешанных посевах *Ulnaria ulna*

Популяция	Имя клона	пол	2.0419-F	2.0419-J	2.0423-C	2.0419-A	2.0419-C	2.0903-A	2.0903-E	2.0903-F	2.0903-H	2.1130-C	2.1130-H	2.1130-D	2.1130-E	0.0513-A	0.0513-B	0.0513-C	9.0330-A	9.0424-A	9.0424-C	9.0424-E	9.0427-B	9.0427-G	9.0626-D	0.0416-B	0.0416-C	0.0416-G	1.0929-D	1.0929-G	1.0929-F	1.0929-A	5.1124-A	5.1124-B	3.0904-G	3.0904-B	3.0904-A	3.0904-C	3.0904-H	
			F	F	F	M	M	F	M	M	F	F	F	M	M	M	F	M	M	F	M	M	F	M	M	F	M	M	M	F	F	M	F	F	F	M	M	M		
г. Кардифф, Уэльс	2.0419-F	F																																						
г. Кардифф, Уэльс	2.0419-J	F	0																																					
г. Кардифф, Уэльс	2.0423-C	F	-	0																																				
г. Кардифф, Уэльс	2.0419-A	M	-	3	2	+																																		
г. Кардифф, Уэльс	2.0419-C	M	2	2	2	0																																		
г. Гент, Бельгия	2.0903-A	F	-	0	0	3	3																																	
г. Гент, Бельгия	2.0903-E	M	2	2	2	-	0	3																																
г. Гент, Бельгия	2.0903-F	M	-	3	-	0	-	-	-																															
г. Гент, Бельгия	2.0903-H	F	1	0	0	3	2	0	2	-	+																													
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-C	F	-	-	2	3	-	-	2	-	0																													
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-H	F	-	-	-	-	2	0	1	-	-	-																												
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-D	M	2	3	-	0	0	2	-	0	2	2	2	+																										
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-E	M	-	-	-	0	-	2	0	0	0	2	2	-	+																									
г. Киев, Украина	0.0513-A	M	0	0	0	2	0	-	-	-	2	-	-	-	-																									
г. Киев, Украина	0.0513-B	F	0	0	0	3	3	-	-	2		0	0	3		2																								
г. Киев, Украина	0.0513-C	M	0	2	1	-	-	-	0	0	2	-	-	-	-	0	2																							
Крым, Россия	9.0330-A	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+																					
Крым, Россия	9.0424-A	F	0	0	0	2	2	0	3	-	2	-	-	2	-	-	-	-	3	+																				
Крым, Россия	9.0424-C	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1																				
Крым, Россия	9.0424-E	M	-	2	1	0	0	-	-	-	-	1	2	0	0	-	-	-	0	2	1																			
Крым, Россия	9.0427-B	F	-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	1	1	2	1	+																	
Крым, Россия	9.0427-G	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	0	1	2																	
Крым, Россия	9.0626-D	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	+															
Крым, Россия	0.0416-B	F	-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	1	2	2	2	2	+														

Продолжение таблицы 4.2

[illegible]

Примечание: частота (обилие) случаев воспроизведения оценена в баллах: 0 – нет воспроизведения, 1 – редкие случаи, 2 – нередко, 3 – массовое воспроизведение, - – не проверяли; + – внутриклоновое воспроизведение; F – клоны женского пола, М – клоны мужского пола.

время как при гетероталлическом воспроизведении интенсивность ауксоспорообразования оценивалась двумя-тремя баллами (см. раздел Материалы и методы). Дифференциация полов, основанная на интенсивности ауксоспорообразования, подтверждалась полученными данными о морфологии, поведении и способе формирования гамет на ранних этапах гаметогенеза.

Система скрещивания *U. danica* (таблица 4.3) принципиально не отличается от выявленной у *U. ulna*. Часть мужских клонов оказалась способной к гомоталлическому половому воспроизведению как в монокультурах, так и в тех смешанных посевах двух клонов, где вторым клоном был мужской или женский, но еще не достигший генеративной фазы жизненного цикла.

Два мужских клона из индонезийской популяции *U. cf. ulna* также оказались способными к аллогамному гомоталлическому воспроизведению. Интенсивность такого воспроизведения была гораздо ниже, чем при гетероталлизме: во всей чашке Петри с моноклоновой культурой обнаруживали один-два случая ауксоспорообразования.

В одном имеющемся клоне *U. pilum*, из видового комплекса *U. ulna*, ни разу не фиксировали случаев полового процесса.

Во многих основных чертах система скрещивания *U. acus* была такой же, как у *U. ulna* и *U. danica*, имеет много общих признаков с близкородственными *T. fasciculata* и *T. tabulata* [34, 79, 83], а также *Neosynedra delicatissima* [34], однако отличалась отсутствием случаев гомоталлического воспроизведения и в мужских, и в женских клонах. Отсутствие внутриклонового воспроизведения не является чем-то уникальным, у бесшовных оно известно, например, у *L. communis* [66]. При этом отсутствие гомоталлического воспроизведения не дает нам возможности проверить, какой пол является гетерогаметным (см. ниже).

Сочетание гетероталлизма с гомоталлизмом, наблюдающееся у многих пеннатных диатомовых [13, 34, 69, 70], может быть рассмотрено как свойство, эволюционно унаследованное от предположительно гомоталлических предков.

Таблица 4.3 — Воспроизведение в смешанных посевах *Ulnaria danica*

Популяция	Имя клона		3.1121-A	3.1121-B	3.1121-C	3.1120-A	3.1120-C	B 75/2	B 155	B 687	5.0901-C	5.0901-D	5.0901-A	5.0901-K	5.1111-B	5.1111-G	5.1111-C	5.1111-A	9.0901-A	9.0901-B	9.0901-C	9.0901-D	9.0901-E
р. Бия, Россия	3.1121-A	M	+																				
р. Бия, Россия	3.1121-B	F	-	+																			
р. Бия, Россия	3.1121-C	M	0	0	+																		
р. Обь, Россия	3.1120-A	F	2	0	-																		
р. Обь, Россия	3.1120-C		0	2	0	2																	
оз.Фролиха, Россия	B 75/2	F	2	0	3	0	3	+															
оз.Фролиха, Россия	B 155		0	0	0	-	0	0															
оз.Фролиха, Россия	B 687	M	-	-	-	-	0	3	0	+													
оз. Хубсугул, Монголия	5.0901-C	M	-	-	-	-	0	2	0	-	+												
оз. Хубсугул, Монголия	5.0901-D	F	-	-	-	-	3	0	0	-	3												
оз. Хубсугул, Монголия	5.0901-A	M	-	-	-	-	0	3	0	-	-	1	+										
оз. Хубсугул, Монголия	5.0901-K	F	-	-	-	-	2	-	0	-	-	-	0										
г. Владивосток, Россия	5.1111-B	M	-	2	0	-	0	3	-	-	-	-	-	-	+								
г. Владивосток, Россия	5.1111-G	M	-	1	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0								
г. Владивосток, Россия	5.1111-C	F	-	0	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	3							
г. Владивосток, Россия	5.1111-A	F	-	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	0						
п-ов Камчатка, Россия	9.0901-A	M	-	2	0	-	0	3	-	-	0	2	2	2	0	0	2	2	+				
п-ов Камчатка, Россия	9.0901-B	M	-	1	0	-	0	3	-	-	-	3	-	-	0	0	3	3	0				
п-ов Камчатка, Россия	9.0901-C	F	-	0	3	-	2	0	-	-	-	0	-	-	3	3	0	0	2	3			
п-ов Камчатка, Россия	9.0901-D	M	-	3	0	-	0	2	-	-	-	2	-	-	0	0	3	2	0	0	3		
п-ов Камчатка, Россия	9.0901-E	F	-	0	1	-	1	0	-	-	-	0	-	-	3	3	0	0	2	3	0	3	

Примечание: частота (обилие) случаев воспроизведения оценена в баллах: 0 – нет воспроизведения, 1 – редкие случаи, 2 – нередко, 3 – массовое воспроизведение, - – не проверяли; + – внутриклоновое воспроизведение; F – клоны женского пола, M – клоны мужского пола.

Такая дополнительная способность к гомоталлическому воспроизведению существенно расширяет возможности расселения видов. Особенно это актуально для пресноводных видов, для которых, для того, чтобы попасть в другой водоем, нужно преодолеть как сухопутный барьер, так и морские пространства, разделяющие разные континенты (острова). Исходя из системы скрещивания, мы можем утверждать, что всего лишь одна клетка *U. ulna* или *U. danica*, попав в новое место обитания, может не просто размножиться путем митотических делений, но и закрепиться в виде популяции благодаря появлению в результате гомоталлического воспроизведения мужских и женских потомков.

Такой "эффект основателя" [178] благоприятствует аллопатрическому видообразованию за счет переноса в новое место обитания малого, а иногда и единичного количества особей, имеющих ограниченный генетический набор. В случае с *U. acus* одной клетки для этого будет недостаточно. Без внутриклонового воспроизведения потомство такой клетки, размножающееся вегетативно со временем, после уменьшения до минимального размера, погибнет. У *U. acus* для формирования новой популяции необходимы как минимум два клона противоположного пола.

4.5 Генотипическое определение пола

Пол – совокупность генетически и/или эпигенетически детерминированных признаков особи, определяющих ее роль в процессе полового воспроизведения [12]. Пол у центрических и пеннатных диатомовых водорослей детерминирован и проявляется по-разному. У подавляющего большинства центрических диатомей (исключение составляет на данный момент только группа токсариид у полярных центрических [78]) пол детерминирован эпигенетически, т.е. один и тот же клон может производить как женские, так и мужские гаметы. Проявление конкретного пола

определяется или внутренними (размер клеток), или внешними (температура, условия освещения, химический состав среды) факторами [90]. Л. Гайтлер отмечал, что материнские клетки пеннатных диатомей, являются двуполыми и фенотипически сексуально детерминированными, но нет доказательств диплогенотипического определения пола [106, 107]. Современные исследования показывают, что у пеннатных пол детерминирован генетически [15, 86]. Половых хромосом у диатомовых водорослей не обнаружено [36], поэтому мы ведем речь о половых детерминантах (половых факторах) – аллельных формах генов, определяющих генетическую основу пола особи [12]. У пеннатных диатомей женский пол определяется сочетанием половых факторов FF (гомогаметный), а мужской, соответственно, MF (гетерогаметный) [12, 13, 15, 67].

Мы получили потомков от скрещивания клонов противоположного пола у двух видов *Ulnaria ulna* и *U. danica* (таблица 4.4). Поскольку у представителей рода *Ulnaria* не образуется гаметангиальных пар и слияние двух гамет одного родителя может произойти абсолютно случайно с гаметами от разных гаметангиев, мы не можем определить пол потомков конкретной пары, как это было сделано у *N. longissima* [34]. Однако, соотношение полов потомков первого поколения у семи изученных пар клонов двух видов *Ulnaria* оказалось равным единице (18:18), что является результатом и косвенным доказательством хромосомного определения пола. Численное отношение полов близкое к единице приводит к пониманию механизма определения пола, однако этой информации недостаточно для определения закономерностей детерминации пола. Более информативным оказалось изучение потомков гомоталлического воспроизведения.

Внутриклоновое потомство, полученное как от мужских, так и от женских клонов *U. ulna* и *U. danica* было фертильным; клоны F1 могли скрещиваться друг с другом и с клонами, происходящими из естественных популяций. Был определен пол потомков, случайно выделенных из внутриклонового поколения трех мужских клонов *U. ulna* (таблица 4.4) и среди

Таблица 4.4 — Наследование пола у двух видов *Ulnaria* в первом поколении при внутриклоновом и межклоновом воспроизведении

Вид	Родительские клоны	Пол родителей	Количество клонов потомков первого поколения (F1)	
			F	M
Гетероталлическое воспроизведение				
<i>Ulnaria ulna</i>	9.0424-C 0.0513-B	M F	3	4
	0.0513-C 1. 0929-A	M F	2	2
	2.1130-D 2.0419-J	M F	3	2
	9.0424-C 2.0903-H	M F	3	3
	1.0929-G 2.0903-H	M F	3	4
<i>Ulnaria danica</i>	5.0901-C B 75/2	M F	2	1
	3.1121-A B 75/2	M F	2	2
Гомоталлическое воспроизведение				
<i>Ulnaria ulna</i>	9.0330-A	M	2	5
	2.1130-D	M	3	1
	9.0626-D	M	2	2
	9.0424-A	F	7	0
<i>Ulnaria danica</i>	B 75/2	F	5	0

Примечание: F – клоны женского пола, M – клоны мужского пола

них присутствовали примерно в равном соотношении (7 : 8) мужские и женские клоны. Это свидетельствует о гетерогаметности мужского пола, который содержит разные генетические детерминанты.

Из двух женских клонов (*U. ulna* – 9.0424-A и *U. danica* – B75/2), которые воспроизвелись партеногенетически в монокультуре и дали жизнеспособное потомство, изолировали в совокупности 12 клонов – потомков первого

поколения. Все клоны оказались женскими, что подтверждает гомогаметность женского пола, содержащего, таким образом, одинаковые половые факторы (таблица 4.4).

Л. Гайтлер, достаточно подробно описавший половой процесс у *U. ulna*, не мог исследовать систему скрещивания, распределение полов в популяции, а также механизм определения и дифференциации пола, потому что он работал в основном с материалом, полученным из естественных популяций. Он объяснял различие в двигательном поведении гамет возрастной разницей их формирования, и лишь с допущением, выражением разной сексуальной конституции. Мы же приводим доказательства диплогенотипического определения пола у представителей рода *Ulnaria*. Диплогенотипическое определение пола было показано для разных групп пеннатных диатомей, как бесшовных (например, *T. fasciculata*, *T. tabulata*), так и шовных (например, *N. longissima*) [79, 83, 86].

Сочетание двух путей полового воспроизведения и морфологическая анизогамия *U. ulna* и *U. danica* позволяют подтвердить полученные ранее данные о характере детерминации пола. У *U. acus* не отмечено случаев гомоталлического воспроизведения, поэтому мы можем только предположить по аналогии с *U. ulna* и *U. danica*, что гетерогаметным должен быть мужской пол.

ГЛАВА 5 БИОГЕОГРАФИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ ИЗОЛЯЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ULNARIA* НА ЕВРАЗИЙСКОМ КОНТИНЕНТЕ

5.1 Распространение вида и репродуктивная совместимость популяций *Ulnaria acus*

Распространение вида происходит в результате его постоянного стремления к заселению новых областей. Этот процесс зависит от эколого-физиологических требований видов, окружающих условий обитания и способности преодолеть географические барьеры. Биogeография изучает феномен географического распределения и распространения организмов на Земле и устанавливает закономерности этого явления [25]. Во второй половине XX – начале XXI веков исследователи стали уделять внимание биogeографии диатомовых водорослей, были показаны пробелы и противоречивость данных, а также освещены перспективы исследований в этом направлении [158, 220, 252 и др.]. Проблема изучения биogeографии диатомовых напрямую связана с проблемой определения видовых границ.

Можно выделить несколько концепций, на основании которых разграничиваются виды диатомовых водорослей [47, 159, 171, 172]. Морфологические и ультраструктурные особенности панцирей клеток традиционно используются в диатомологии для распознавания видов [210] и для оценки видового разнообразия. В то же время существует проблема в определении видовых границ, если морфологические критерии сильно изменчивы или их диапазоны перекрываются друг с другом. Низкая изменчивость может маскировать комплексы видов, как это было обнаружено, например, у видов *Sellaphora* [54] или *Pseudo-nitzschia* [46]. Оценить границы видов у диатомовых можно также на основе молекулярных данных [154, 171]. Последние достаточно объективны, хотя и в этом случае выбор уровня

расхождений, необходимых для установления видовых границ, остается за исследователем.

Классической и в то же время сущностной в отношении понимания вида является биологическая концепция. Если обратиться к концепции биологических видов, обстоятельно изложенной Т. Добжанским [89] и Э. Майром [24], то вид – это группа скрещивающихся естественных популяций, репродуктивно изолированная от других таких групп. Эта концепция применима (с определенными ограничениями) для видов диатомовых, демонстрирующих, прежде всего, раздельнополость и связанный с ней гетероталлизм. К ним относится большинство видов, представленных современными пеннатными диатомовыми. Раздельнополость позволяет методически корректно выполнить эксперименты по скрещиванию.

Репродуктивная изоляция может объясняться наличием не только пре-, но и постзиготическими барьерами [247]. Если презиготические механизмы изоляции направлены на предотвращение скрещивания, т.е. на нераспознавание партнера и невозможность образования или взаимодействия гамет, вследствие чего потомство не образуется, то постзиготические механизмы включают гибридную нежизнеспособность или стерильность. Независимо от механизмов репродуктивной изоляции барьеры, мешающие обмену генами между популяциями, определяют отдельное существование генетических линий, которые мы называем видами. Изучение механизмов и степени репродуктивной изоляции между видами, особенно в сочетании с данными о генетической дивергенции, может дать представление о механизмах видообразования.

Мы изучили репродуктивную совместимость географически удаленных популяций *Ulnaria acus* из водоемов Евразийского континента (рисунок 2.1, карта). Самые удаленные друг от друга популяции (Нант, Франция – оз. Матано, Индонезия) расположены на расстоянии более 12 тыс. км друг от друга; самые близкие (оз. Байкал, Россия – оз. Хубсугул, Монголия) – около 200 км. Клетки из всех изученных популяций по морфологии соответствовали морфотипу *U. acus* (см. раздел 3.1).

Все изученные клоны *U. acus* оказались способными вступать в гетероталлическое половое воспроизведение при внутрипопуляционных и межпопуляционных скрещиваниях в смесях клонов противоположного пола (см. таблицу 4.1). Межпопуляционное воспроизведение подтверждалось разными размерами клеток в клонах, используемых для скрещивания. Таким образом, никаких очевидных презиготических барьеров не было обнаружено для клонов *U. acus*, выделенных из всех изученных популяций. Потомство, полученное от межпопуляционных скрещиваний, оказалось жизнеспособным. Часть клонов – потомков первого поколения – ввели в культуру и при достижении ими критического размера, после чего появлялась способность к половому воспроизведению, проверили на возможность скрещиваться друг с другом и с родительскими клонами. Мы установили, что все изученные потомки первого поколения от межпопуляционных скрещиваний *U. acus* фертильны и способны скрещиваться в комбинациях, соответственно своему полу (таблица 5.1).

Исследования биогеографии и репродуктивной совместимости некоторых видов диатомовых водорослей проводились как на симпатрических популяциях [46, 56], так и на популяциях из отдаленных местообитаний [54, 65, 131, 249]. При этом в ряде случаев была показана репродуктивная совместимость популяций, расположенных на достаточно больших расстояниях, как например, у морских *P. pungens* [65] и *Tabularia fasciculata* [131] и пресноводных *Eunotia bilunaris* (Ehrenberg) Schaarschmidt [249] и *Sellaphora pupula* (Kützinger) Mereschkovsky [54].

Следует, однако, отметить, что установленное нами широкое распространение *U. acus*, не является универсальным. Как будет показано ниже, у других видов из рода *Ulnaria*, несмотря на то, что они не имеют очевидных препятствий для распространения, наблюдается более ограниченный ареал.

Таблица 5.1 — Возвратные скрещивания гибридов F1, полученных в межпопуляционных скрещиваниях *Ulnaria acus*

Гибриды F1	Возвратное скрещивание с популяциями				
	Fr	Ru1	Mn	Ru2	In
Fr + Ru1	+	+	+	+	+
Fr + Mn	+	+	+	+	+
Fr + Ru2	+	+	+	+	+
Fr + In	+	+	+	+	+
Ru1 + Mn	+	+	+	+	+
Ru1 + Ru2	+	+	+	+	+
Ru1 + In	+	+	+	+	+
Mn + In	+	+	+	+	+
Ru2 + In	+	+	+	+	+

Примечания: Fr – р. Эрдр, Франция; Ru1 – оз. Рица, Россия; Mn – оз. Хубсугул, Монголия; Ru2 – оз. Байкал, Россия; In – оз. Матано, Индонезия

5.2 Репродуктивная изоляция и расхождение видов *Ulnaria cf. ulna*

Ulnaria ulna представлена множеством сортов (по данным <https://www.algaebase.org> 76 сортов было описано у *Synedra ulna* и 14 сортов, в настоящее время не получивших статус вида, насчитывается у *U. ulna*). Долгое время на уровне сорта рассматривалась *U. danica* (как *S. ulna* var. *danica* (Kützinger) Grunow) [244]. Сомнения исследователей в отношении выделения отдельных видов объясняется их слабыми морфологическими отличиями, что создает трудности при определении и позволяет рассматривать *Ulnaria cf. ulna* как комплекс криптологических/полукриптологических видов.

Как было сказано выше, для разграничения криптических/полукриптических видов представляется целесообразным использование биологической концепции вида. Репродуктивная совместимость/изоляция является эффективным критерием для определения видовых границ у диатомовых водорослей [46, 102, 165]. Понятие репродуктивной совместимости/изоляции, не противоречит филогенетической, эволюционной, морфологической и другим концепциям, и в то же время позволяет обнаружить и доказать факт дивергенции видов.

Мы изучили репродуктивную совместимость представителей 15 популяций *Ulnaria* cf. *ulna* из водоемов, расположенных на территории Евразии (рисунок 2.1, карта). Расстояния между популяциями указаны в таблице 5.2. Наиболее отдаленные популяции находятся на расстоянии приблизительно 12–13 тыс. км друг от друга, самые близкие – на расстоянии 400 км.

В результате межпопуляционного скрещивания клонов *U.* cf. *ulna* из географически удаленных популяций в комбинациях, соответствующих изученным ранее половым типам, получили следующие результаты (таблица 5.2). Клоны *U.* cf. *ulna* из популяций, локализованных на территории западной Евразии, скрестились не только друг с другом, но и с частью популяций восточной Евразии (до оз. Байкал включительно). Популяции, расположенные на дальнем востоке, оказались репродуктивно изолированными от западно-евразийских. При этом клоны из дальневосточного региона скрещивались с клонами, выделенными из оз. Байкал, оз. Хубсугул и р. Бия. Имеющийся клон из водоема Африканского континента (Алжир) дал интенсивное аукоспорообразование с клонами из западно-евразийских популяций *U.* cf. *ulna* и не вступал в процесс полового воспроизведения с восточно-евразийскими. Отмеченная презиготическая репродуктивная изоляция между отдаленными друг от друга западноевразийскими и дальневосточными популяциями *U.* cf. *ulna* привела нас к мысли о том, что на территории Евразийского континента существует минимум два вида, близких по морфологии к *U. ulna*. Однако, положительные результаты скрещивания

Таблица 5.2 — Межпопуляционное скрещивание клонов *Ulnaria* cf. *ulna* из географически удаленных популяций

Популяция	г. Кардифф, Уэльс	г. Гент, Бельгия	г. Ле-Ман, Франция	Айн-Сефра, Алжир	г. Киев, Украина	Крым, Россия	г. Звенигород, Россия	оз. Рица, Абхазия	р. Адуй, Россия	р. Бия, Россия	оз. Байкал, Россия	оз. Хубсугул, Монголия	оз. Лабынкыр, Россия	г. Владивосток, Россия	п-ов. Камчатка, Россия	оз. Матано, Индонезия
г. Кардифф, Уэльс		0,5	0,4	1,8	2,3	2,6	2,7	3,0	4,5	5,2	7,5	7,1	9,5	10	11,2	128
г. Гент, Бельгия	+		0,4	1,8	1,8	2,3	2,3	2,8	4,0	4,7	7,0	6,6	9,0	9,7	10,7	123
г. Ле-Ман, Франция	+	+		1,4	2,2	2,6	2,6	3,1	4,1	4,8	7,1	6,7	9,1	9,8	10,8	127
Айн-Сефра, Алжир	+	+	+		3,0	2,9	3,6	3,4	4,6	5,3	7,6	8,2	9,5	9,8	11,8	126
г. Киев, Украина	+	+	+	+		0,7	0,7	1,0	1,9	2,6	4,9	4,5	6,9	7,5	8,6	104
Крым, Россия	+	+	+	+	+		1,2	0,5	2,2	2,9	5,2	4,7	6,9	7,8	92	100
г. Звенигород, Россия	+	+	+	+	+	+		1,4	1,2	1,9	4,3	4,1	6,2	7,3	8,6	102
оз. Рица, Абхазия	+	+	+	нд	+	+	+		2,3	3,0	5,0	4,2	6,4	7,3	8,7	97
р. Адуй, Россия	+	+	+	нд	+	+	+	нд		0,7	2,7	2,5	4,0	4,6	5,5	8,7
р. Бия, Россия	+	+	+	нд	+	+	+	+	+		2,0	1,9	3,4	3,9	4,9	8,1
оз. Байкал, Россия	+	+	+	-	нд	+	+	+	+	+		0,6	2,0	2,1	3,5	6,4
оз. Хубсугул, Монголия	+	-	-	-	нд	-	+	нд	+	+	+		2,6	2,5	3,9	6,3
оз. Лабынкыр, Россия	-	-	-	нд	нд	-	-	нд	-	+	+	+		2,2	12	7,4
г. Владивосток, Россия	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		23	5,1
п-ов. Камчатка, Россия	-	-	-	-	нд	-	-	нд	-	+	+	+	+	+		7,3
оз. Матано, Индонезия	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примечания: + – отмечено успешное аукоспорообразование; - – случаев гетероталлического полового воспроизведения не обнаружено; нд – нет данных, скрещивания не проводились; цифрами отмечены приблизительные расстояния между точками отбора проб, тыс. км

популяций оз. Байкал, оз. Хубсугул и р. Бия с западно-евразийскими и дальневосточными популяциями (таблица 5.2), поставило вопрос о том, где проходит граница между видами.

Для понимания того, как распределяются виды на Евразийском континенте, было важно понять, не являются ли положительные результаты скрещивания в первом поколении артефактом, который возник в силу отсутствия презиготической изоляции. Во втором поколении полученные гибриды могли оказаться бесплодными. Для проверки этого предположения мы скрестили потомков *U. cf. ulna* первого поколения, полученных в результате межпопуляционных скрещиваний. Результаты представлены в таблице 5.3.

Оказалось, что потомки, полученные от скрещиваний западноевразийских клонов, были способны к возвратному скрещиванию и скрещиванию друг с другом с образованием жизнеспособного потомства второго поколения. Такой же результат показали и потомки от полового воспроизведения восточноевразийских популяций *U. cf. ulna* (от р. Бия до п-ва Камчатка), скрестившись только между собой и с восточноевразийскими родительскими клонами. Отмечено несколько случаев аукоспорообразования при скрещивании потомков западноевразийских популяции с клонами *U. cf. ulna* из р. Бия и из. Байкал. Однако, в этом случае получившиеся потомки второго поколения оказались нежизнеспособными, и нам, несмотря на многократные попытки, не удалось ввести их в культуру.

Гибриды первого поколения от скрещивания клонов *U. cf. ulna* из западноевразийских популяций с клонами из р. Бия, оз. Хубсугул и оз. Байкал были не способными ни к гетероталлическому, ни к гомоталлическому половому воспроизведению, оказавшись полностью стерильными. Отмеченная постзиготическая репродуктивная изоляция, не допускающая дальнейший обмен генами между популяциями, позволила нам окончательно разделить евразийские популяции *U. cf. ulna* на две группы: западноевразийскую (от г. Кардифф до р. Адуи) и восточноевразийскую (от р. Бия до п-ва Камчатка).

Таблица 5.3 — Возвратные скрещивания гибридов F1, полученных в межпопуляционных скрещиваниях *Ulnaria cf. ulna*

Гибриды F1	Возвратное скрещивание с популяциями										
	Uk	Be	Fr	Ru1	Ru2	Ru3	Ru4	Ru5	Mn	Ru6	Ru7
Uk + Be	+	нд	+	нд	+	нд	нд	-	нд	-	нд
Uk + Fr	+	нд	+	нд	+	нд	нд	-	нд	-	нд
Uk + Ru1	+	нд	нд	+	+	нд	нд	+/-	-	-	нд
Uk + Ru2	+	нд	+	+	+	нд	нд	-	нд	-	нд
Uk + Ru3	+	нд	нд	нд	нд	+	нд	-	-	-	нд
Be + Ru1	нд	+	+	+	+	нд	нд	-	нд	-	-
Be + Ru2	нд	+	нд	+	+	нд	нд	-	нд	-	нд
Be + Ru3	+	+	+	нд	нд	+	нд	+/-	-	-	нд
Fr + Ru1	нд	нд	нд	+	+	нд	нд	-	нд	-	нд
Fr + Ru2	нд	нд	+	+	+	нд	нд	-	нд	-	нд
Fr + Ru3	нд	нд	нд	нд	+	+	+/-	+/-	нд	нд	нд
Ru1 + Ru3	+	нд	нд	+	нд	нд	нд	-	нд	нд	нд
Ru4 + Uk	-	-	-	-	нд	-	нд	-	нд	-	нд
Ru4 + Ru1	-	нд	-	-	-	-	-	-	-	-	нд
Ru4 + Ru3	-	-	нд	нд	нд	нд	-	-	-	нд	-
Ru5 + Uk	-	нд	-	-	нд	-	нд	-	-	-	нд
Ru5 + Be	-	-	нд	-	-	нд	-	-	-	-	нд
Ru5 + Fr	-	-	-	нд	нд	-	нд	-	-	нд	нд
Ru5 + Ru2	-	-	-	-	нд	-	-	-	нд	-	нд
Ru5 + Ru3	-	-	-	-	нд	-	-	-	нд	-	нд
Ru5 + Ru4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	нд	нд
Ru4 + Mn	-	нд	-	нд	-	-	+	+	+	+	нд
Ru5 + Mn	-	нд	-	нд	-	-	+	+	+	+	+
Ru5 + Ru6	-	нд	-	нд	-	-	нд	+	+	+	нд
Ru6 + Mn	-	нд	-	нд	-	-	нд	+	+	нд	+
Ru6 + Ru7	-	нд	-	нд	-	-	нд	+	+	+	+

Примечание: UK – Великобритания, Кардифф; Be – Бельгия, Гент; Fr – Франция, Ле Ман; Ru1 – Крым; Ru2 – Россия, р. Москва; Ru3 – Россия, р. Адуй; Ru4 – Россия, р. Бия; Ru5 – Россия, оз. Байкал; Mn – Монголия, оз. Хубсугул; Ru6 – Россия, г. Владивосток; Ru 7 – Россия, п-ов. Камчатка; + – отмечено успешное ауксоспорообразование; - – случаев гетероталлического полового воспроизведения не обнаружено; +/- – единичные случаи полового воспроизведения не привели к образованию жизнеспособного потомства; нд – данные отсутствуют

Таким образом, опираясь на биологическую концепцию, мы можем утверждать, что на территории Евразии обитает два вида: в западной части континента – *U. ulna*, в восточной – *U. danica* (рисунок. 5.1).

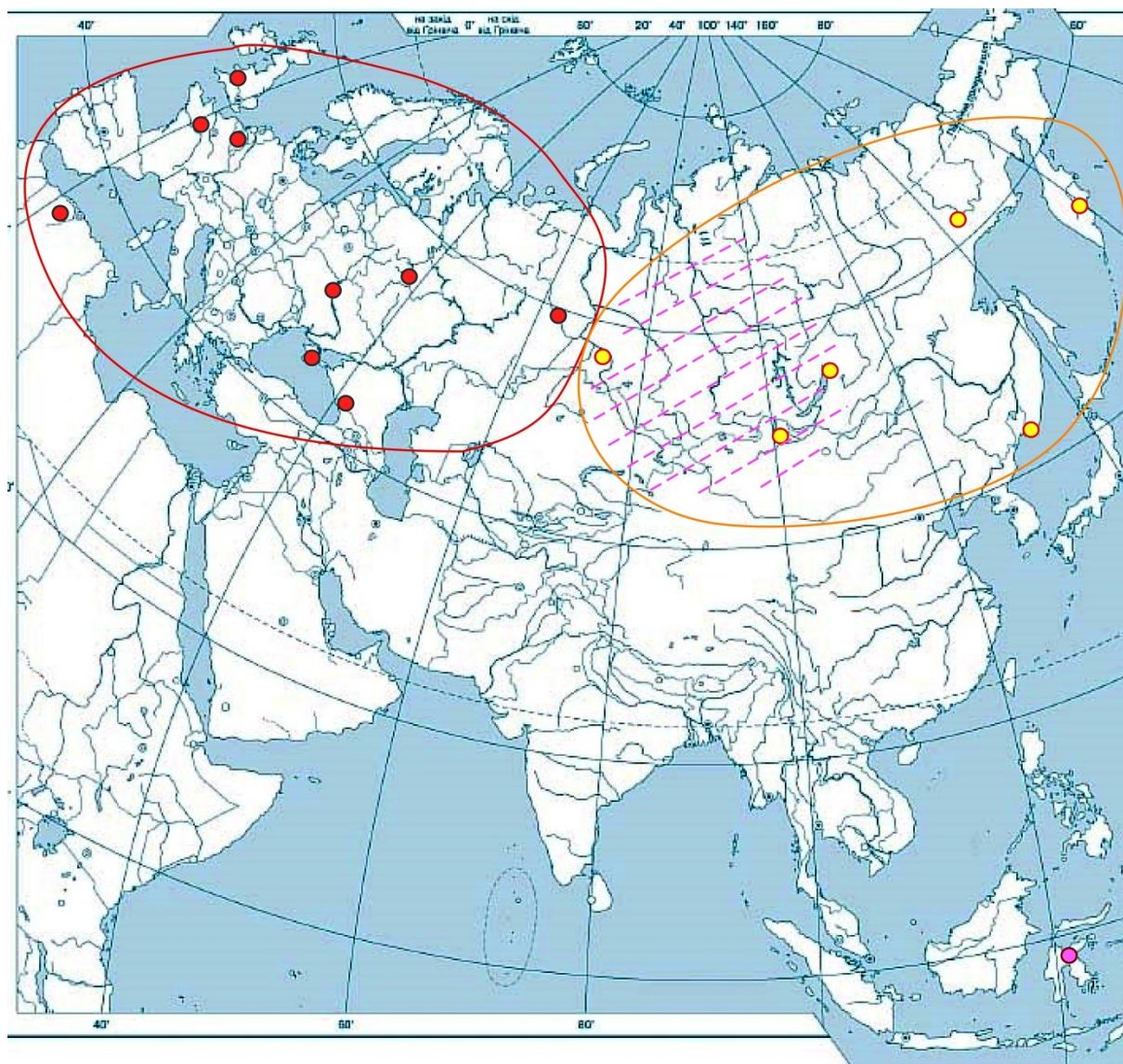


Рисунок 5.1 — Локализация изученных популяций *Ulnaria ulna* (красные точки) и *Ulnaria danica* (желтые точки) на Евразийском континенте. Розовой точкой отмечены популяция *Ulnaria* из индонезийского оз. Матано. Красной линией отмечена зона распространения *Ulnaria ulna*, желтой – *Ulnaria danica*. Розовой штриховкой обозначена зона образования межвидовых гибридов

Граница между видами проходит в районе Западно-Сибирской низменности. При этом мы не можем исключить возможности симпатрического обитания этих двух видов в отдельных водоемах Западно-Сибирской низменности и граничащих с ней территорий. Однако, в настоящее время у нас нет объективных доказательств находок *U. ulna* в восточной Евразии, как и *U. danica* в Европе, которые бы подтверждались экспериментами по скрещиванию.

Комплекс криптических/полукриптических видов *U. cf. ulna* может включать в себя гораздо больше видов. Так, например, в экспериментах по скрещиванию участвовал клон *Ulnaria* B155 из оз. Фролиха, который не скрестился ни с одним другим клоном. Этот клон М.С. Куликовский с соавторами описал как *U. pilum* [145]. Отсутствие случаев положительного аукоспорообразования при многократном скрещивании с клонами из всех изученных популяций может служить подтверждением выделения нового вида.

Клоны *U. cf. ulna* из индонезийского оз. Матано воспроизводились гетероталлически в пределах своей популяции, но нами не было отмечено ни одного случая скрещивания клонов из этой островной популяции с популяциями Евразийского континента (см. таблицу 5.2). Согласно полученным нами данным, представителя *Ulnaria* из оз. Матано надо признать самостоятельным биологическим видом, отличающимся от *U. ulna* и *U. danica*.

В 1937 году Ф. Хустедт обнаружил несколько новых разновидностей *U. ulna* (*Synedra*), обитающих в индонезийских водоемах и отличающихся друг от друга морфологически: var. *aequalis*, var. *spathulifera*, var. *claviceps*, var. *biceps*, var. *danica* [125]. В этом свете идентификация вида и его вариететов, выполненная Ф. Хустедтом, требует уточнения. Тропические регионы характеризуются высоким уровнем эндемизма диатомовых водорослей, а также являются активными очагами видообразования, поэтому не исключено существование в этих водоемах и других видов комплекса *U. cf. ulna*.

Для диатомовых водорослей нередки случаи, когда клетки из разных популяций изначально воспринимались по морфологии панцирей как один вид,

а в ходе изучения оказывались репродуктивно несовместимыми близкородственными криптическими видами, в том числе новыми для науки. Например, *Haslea ostrearia*, легко узнаваемая за счет синего пигмента маренина, долгое время считалась видом-космополитом, но за последние годы описано несколько новых видов "синих" диатомей из рода *Haslea*, среди них *H. karadagensis* из Черного моря [102], *H. provincialis* Gastineau, Hansen & Mouget из Средиземного моря [101], *H. nusantara* Mouget, Gastineau & Syakti из Яванского моря [206], *H. silbo* Gastineau, Hansen & Mouget с Канарских островов [103]. В экспериментах по скрещиванию географически изолированных клонов *Achnantes longipes* из Панамы и Черного моря показано, что клоны репродуктивно совместимы, однако потомство гибнет на стадии формирования эпитеки [70]. Клоны *A. brevipes* из Западной и Восточной Шотландии, различались по размерам, легко гибридизовались, давали поколение F₁, но зиготы в поколении F₂ и потомство от возвратного скрещивания с родительскими клетками оказались нежизнеспособными, то есть клоны дивергировали так далеко, что обмен генами между ними стал невозможен [71].

Образование межвидовых гибридов не редкость, оно известно как у растений, так и животных. Изученные случаи межвидовой гибридизации у диатомовых водорослей достаточно редки. Для симпатрических видов *Eunotia bilunaris* sensu lato было отмечено появление гибридов, но они оказались бесплодными [247]. У *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* Hasle и *P. arenysensis* S. Quijano-Scheggia, E. Garcés & N. Lundholm из всех клонов с известным типом спаривания только у 10 % межвидовые скрещивания были успешным, а из 60 изолированных постинициальных клеток только одна смогла поделиться и сформировать жизнеспособный клон, просуществовавший сравнительно недолго [45].

Случаи межвидовой гибридизации мы, как и другие исследователи, смогли обнаружить, только работая с культурами клеток. На примере представителей рода *Pseudo-nitzschia* было показано, что потомков,

полученных от межвидового скрещивания, невозможно отличить по морфологическим признакам от одного из родительских видов [45]. В случае с *U. ulna* и *U. danica*, которых на данном этапе мы рассматриваем как криптические/полукриптические виды, не удалось обнаружить очевидных морфологических различий ни между родительскими видами, ни между их потомками.

Наши результаты еще раз доказывают, что межвидовая гибридизация диатомовых водорослей возможна и, скорее всего, может встречаться в зоне симпатрического обитания видов в природе. Однако такая гибридизация обычно не приводит к формированию фертильных носителей объединенного генотипа.

5.3 Репродуктивные границы и филогения рода *Ulnaria*

Хотя молекулярные данные пока еще не дали ответы на многие вопросы, касающиеся филогенетических отношений внутри диатомовых водорослей, становится ясно, что в группах криптических видов изучение только морфологии створок не дает возможности надежно разграничить виды. В некоторых случаях ревизия родов на основе морфологических признаков была поддержана молекулярными данными. Например, морские роды диатомовых водорослей *Lyrella* Karajeva и *Petroneis* Stickle & D.G. Mann, выделенные из рода *Navicula* из-за отличий в морфологии панциря и хлоропластов, были помещены в отдельное семейство Lyrellaceae D.G. Mann [19, 160], что было подтверждено позднее данными о хлоропластном гене *rbcL* [130]. Похожее подтверждение было получено для диатомей из рода *Geissleria* Lange-Bertalot & Metzeltin [146, 195], ранее помещавшихся в род *Navicula*, а также рода *Humidophila*, выделенного из рода *Diademsis* [2]. Обратная ситуация возникает, когда схожие морфологические структуры аналогичны, не имея при этом общего происхождения. Например, лировидная область у шва в родах *Lyrella* и

Fallacia Stickle & D.G. Mann. Данные по гену *rbcL* показали, что представители рода *Fallacia* не являются близкими ни *Lyrella*, ни *Petroneis* [96].

Мы проанализировали генетические последовательности *rbcL*, что позволило установить филогенетические отношения между изученными клонами рода *Ulnaria*. Представители рода *Ulnaria* с достаточной степенью достоверности формируют кладу (рисунок 5.2), которая образует одну группу с *Fragilaria*-подобными видами, что подтверждает показанную ранее другими авторами морфологическую и эволюционную близость двух родов. В одну группу с европейскими клонами *Ulnaria* ложится клон TCC520 (номер в GenBank – KC736614), изолированный из реки во Франции и определенный как *U. ulna* [137].

В кладе, соответствующей клонам *U. acus*, можно увидеть, что клон, изолированный из оз. Байкал, имеет небольшие отличия по сравнению с клонами из оз. Рица и Хубсугул. Однако такие генетические различия между популяциями можно рассматривать как внутривидовое варьирование, т.к. с точки зрения биологической концепции нет никаких причин разделять их на два вида, ввиду отсутствия репродуктивной изоляции. Возможно, накопленные различия можно трактовать как вариететы одного вида, которые впоследствии могут дать два вида. Подобные случаи наличия генетических отличий при репродуктивной совместимости были описаны, например, для *Tabularia fasciculata* [79, 131] и *Eunotia bilunaris sensu lato* [247].

На дендрограмме, построенной для клонов рода *Ulnaria* (рисунок 5.3), выделяются четыре субклады, соответствующие разным видам – *U. acus*, *U. ulna*, *U. danica* и *Ulnaria* sp. из индонезийского оз. Матано. При этом процент нуклеотидных различий между представителями индонезийской популяции *Ulnaria* и представленными популяциями *U. ulna* и *U. danica* достаточно велик и не вызывает никаких сомнений в разграничении видов. Тогда как между изученными популяциями *U. ulna* и *U. danica* процент таких различий по гену *rbcL* невысокий и требует дополнительного изучения нуклеотидных последовательностей других генов, например 18S и ITS.

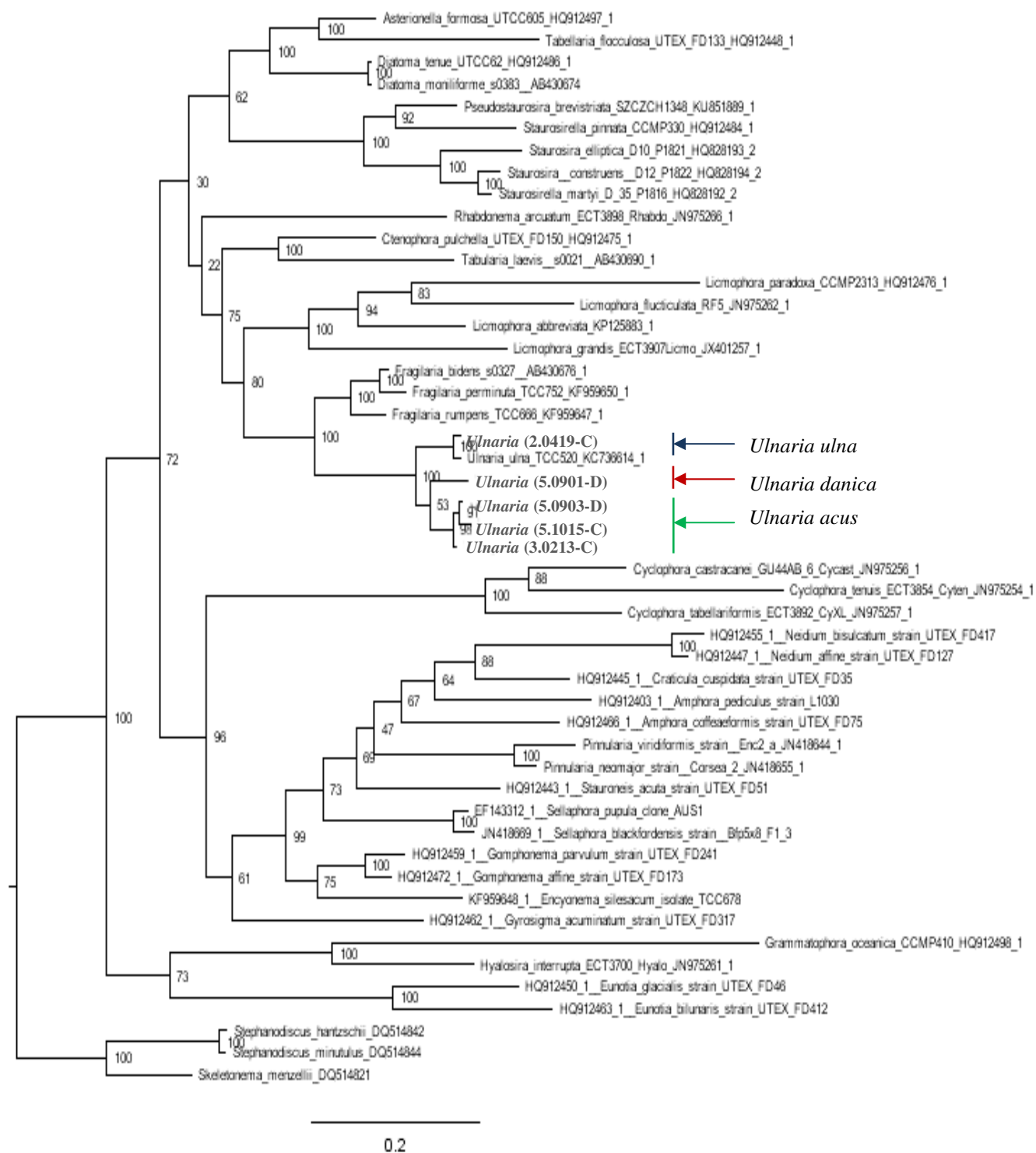


Рисунок 5.2 — Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rbcL*. В качестве внешней группы выбраны центрические диатомовые водоросли. Для изученных представителей рода *Ulnaria* указан номер клона, для остальных диатомовых водорослей – номер доступа к последовательностям в GenBank. Цифрами показаны значения Байесовских апостериорных вероятностей. Модель нуклеотидных замен GTR+R+I

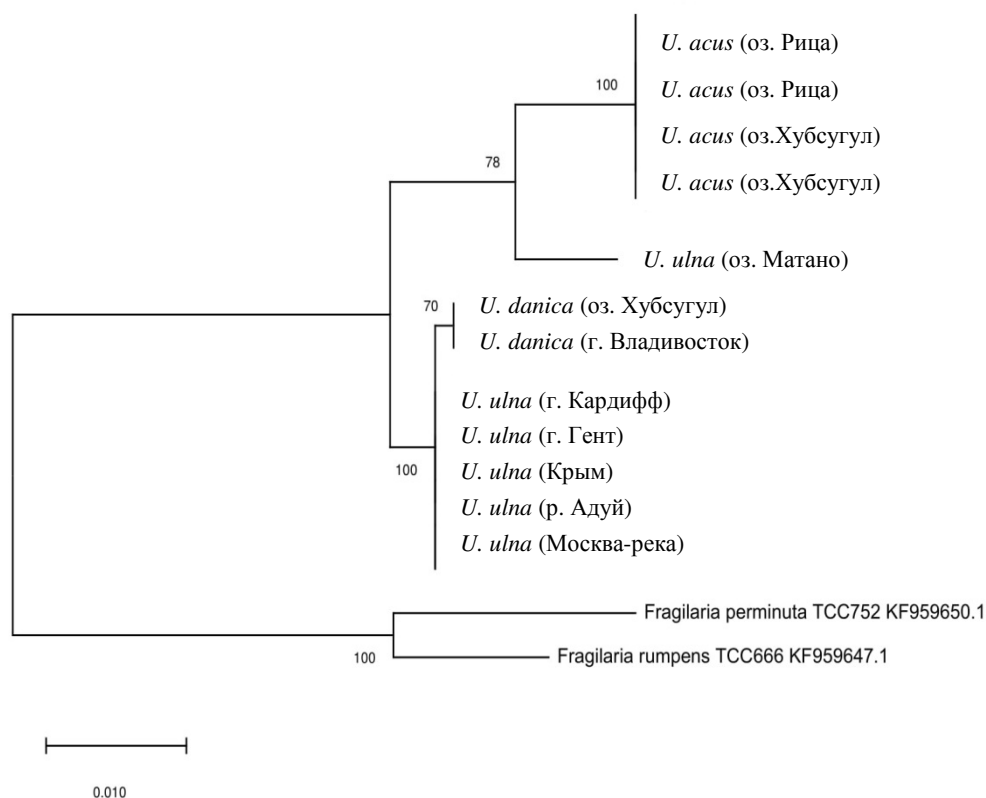


Рисунок 5.3 — Дендрограмма, построенная для клонов рода *Ulnaria* из разных популяций Евразийского континента на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rbcL*. В качестве внешней группы выбраны виды рода *Fragilaria*. Для изученных представителей рода *Ulnaria* указана популяция, для остальных диатомовых водорослей – номер доступа к последовательностям в GenBank. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа для анализа по методу максимального правдоподобия, под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей

На топологию получаемых филогенетических деревьев в значительной степени влияет выбор молекулярного маркера, что представляет собой проблему, с которой нередко сталкиваются исследователи [1]. В отличие от митохондриального генома, который наследуется по одной из линий (отцовской или материнской), как это было показано у *H. ostrearia* [104],

хлоропластный геном наследуется стохастически. Для *P. delicatissima* отмечено, что у потомков может присутствовать как два материнских хлоропласта, так и два отцовских, так и по одному хлоропласту от каждой из родительских клеток [151]. Хлоропластный геном является более консервативным и традиционно используется для разграничения видов диатомей. Однако, неоднократно было показано, что клоны, имеющие существенные различия в генах *rbcL*, могут успешно скрещиваться между собой с образованием фертильного потомства [46, 131].

В отношении рода *Ulnaria* филогенетическое разделение видов по гену *rbcL* соответствует показанной выше репродуктивной изоляции между ними и еще раз подтверждает выделение этих видов по морфологическим критериям.

5.4 Космополитизм, эндемизм и видообразование

Вид – это центральное звено эволюции [177]. Существует множество концепций "вида", в том числе в диатомологии, например, морфологическая, филогенетическая, экологическая, эволюционная, биологическая и другие [47]. "Виды", которые появляются в таксономических сводках и ревизиях, – это не обязательно то же самое, что единицы биоразнообразия, реально существующие в природе. Виды систематиков – это скорее субъективные конструкции, представления систематиков о биологических таксонах, по сути дела, гипотезы, которые пытаются описать действительность. Эти представления могут сильно отличаться от действительного расположения границ между видами. Поэтому даже для тех групп организмов, в которых формально виды в основном описаны, работа по выявлению и уточнению существующих межвидовых границ, работа по делимитации видов, будет продолжаться еще долго [23].

Определение вида по морфологическим признакам у диатомовых зачастую может быть субъективным из-за достаточного небольшого количества

критериев, используемых для анализа, и слабовыраженных отличий между ними. В свою очередь на генетическом уровне выбор необходимого процента различий между генами также субъективен и неоднозначен для разделения видов. Известны примеры слабо обоснованного выделения так называемых "генетических" видов. В настоящее время наиболее популярны две видовых концепции: одна имеет дело с видом как эволюционной линией (варианты филогенетической концепции вида), а другая оперирует видом как совокупностью особей, которые репродуктивно совместимы между собой, но репродуктивно изолированы от других подобных совокупностей (варианты биологической концепции вида) [75, 76]. Эти концепции не противоречат друг другу, но различаются акцентами, принимаемыми во внимание.

В те времена, когда морфологические признаки служили основой для разграничения видов, космополитизм в отношении распространения диатомовых был доминирующей точкой зрения. Широкое распространение водорослей объясняли возможностью свободного переноса клеток, например, течениями, ветром [120], перелетными птицами [215]. Такая неограниченная возможность распространения диатомей подразумевает широкий обмен генами и панмиктическую природу диатомовых таксонов [20].

В последние декады на смену космополитизму стала приходить теория эндемизма, проявляющегося на разных уровнях: локальном, региональном или континентальном [141]. Многие виды диатомовых водорослей, ранее считавшиеся космополитами, сейчас на основании данных, полученных с помощью электронной микроскопии, молекулярно-генетических методов и подходов репродуктивной биологии, стали рассматриваться как криптические/полукриптические таксоны. Криптическое разнообразие может возникнуть, когда морфология изменяется медленнее, чем другие признаки, характеризующие конкретный вид [179].

Некоторые авторы разделяют комплексы видов на ряд категорий: криптические, полукриптические и псевдокриптические [170]. Криптические виды определяются ими как виды, имеющие морфологическую идентичность,

но генетическое несходство, поэтому различимы только на молекулярном уровне. Псевдокриптические виды – это те виды, которые можно различить с помощью тщательного морфологического анализа. Полукриптические виды – это те, которые пересекаются друг с другом морфологически и отдельные экземпляры можно идентифицировать только в конкретном географическом районе, где собрана подробная информация о морфологической и генетической изменчивости. По нашему мнению, указанная дифференциация носит субъективный и в значительной степени надуманный характер, поскольку основывается на индивидуальном опыте, способностях, квалификации исследователей, доступных методах.

Обнаружение криптического/псевдокриптического разнообразия видов диатомовых водорослей выводит на первый план биологическую концепцию вида [24]. Еще во времена К. Линнея был известен один из критериев естественности вида, дошедший до настоящего времени, – критерий скрещиваемости. Поэтому и в современной систематике все большей популярностью пользуется представление о виде как совокупности популяций, особи которых скрещиваются между собой. В 1984 году В. Грант писал: "Наиболее существенная черта биологических видов, как мы видели, связана с их взаимоотношениями при скрещивании. Способность особей успешно обмениваться генами, т.е. свободно скрещиваться между собой и производить плодовитое и жизнеспособное потомство, характеризует их как представителей одного и того же биологического вида, тогда как неспособность к свободному и успешному обмену генами – признак обособленности биологических видов. Все остальное, в том числе и морфологические различия, – это надстройка" [8, с. 64].

Одним из первых исследований криптического комплекса видов диатомовых, в котором была использована биологическая концепция, стало изучение репродуктивной совместимости путем скрещивания штаммов *Sellaphora pupula*, которое показало наличие отдельных "гамодемов", то есть репродуктивно изолированных единиц внутри этого вида [172].

Недавние результаты генетической оценки таксономического разнообразия фитопланктона, показали, что это биоразнообразие значительно недооценивается [45, 46, 65, 131, 154, 247]. Обнаружилось мощное скрытое (криптическое) внутривидовое разнообразие у многих широко распространенных и известных морфологических видов. Существование близкородственных, но репродуктивно изолированных групп, обитающих симпатрически, предполагает наличие эффективных репродуктивных барьеров, препятствующих их скрещиванию. Репродуктивная изоляция, являясь ключевым понятием биологической концепции, обеспечивает эволюционное расхождение видов, разрушая их генетическое единство. В отличие от пространственной или экологической изоляции появление репродуктивной изоляции между видами является необратимым процессом, однозначно определяющим границы вида. При этом скорость формирования репродуктивной изоляции никак не коррелирует со скоростью накопления морфологических или генетических отличий между видами. Иными словами, группы (популяции) диатомей могут приобрести заметные морфологические и/или генетические отличия, но оставаться целостным видом с точки зрения репродуктивной биологии. При этом следует вести речь о разновидностях (вариететах), но никак не видах. Альтернативная ситуация возникает, когда рассматриваемые экземпляры слабо различаются морфологически и генетически, но представляют собой нескрещивающиеся виды. В таком случае мы как раз и говорим о криптических/полукриптических видах.

Экологические исследования могут предоставить дополнительную важную информацию для изучения видовых комплексов. Например, виды из рода *Pseudo-nitzschia*, которые, как показывают исследования, проведенные в Неаполитанском заливе [211], представляют собой криптический комплекс, достигают массового развития в разные периоды года. Комплекс *Navicula phyllepta* sensu lato Kützing включает разные виды, присутствующих в эстуарии Вест-Эршельде (Нидерланды) и занимающих разные экологические ниши,

наблюдается разная устойчивость к низкой солености и разные предпочтения к концентрации аммония [246].

В нашей работе использование критерия репродуктивной совместимости/изоляции позволило доказать широкое распространение *Ulnaria acus* на территории Евразии и установить существование четырех, а может, и более криптических видов из видового комплекса *U. cf. ulna*. Несмотря на то, что все упомянутые виды относятся к одному роду и обитают на территории одного континента, между популяциями *U. cf. ulna*, в отличие от *U. acus*, возникла пре- и постзиготическая репродуктивная изоляция, разделившая вид *U. ulna* на несколько генетических линий. Таким образом, близкородственные виды могут по-разному проявлять себя в отношении эндемизма и космополитизма.

Скрещивание клонов в лабораторных условиях позволило нам выявить редкие для диатомовых случаи образования межвидовых гибридов *U. ulna* и *U. danica*. Чтобы рассматривать гибридизацию как путь видообразования, должны быть выполнены три условия: гибрид должен быть репродуктивно изолирован от родительского вида, барьер для потока генов должен возникать в результате гибридизации (а не вследствие действия других факторов, таких как временная или пространственная изоляция), и гибридная природа вновь сформировавшихся видов должна быть геномно подтверждена [218]. В нашем случае мы не можем рассматривать получившиеся гибриды как новый вид или этап видообразования, поскольку они полностью стерильны и не способны к дальнейшей передаче генетической информации.

Сочетание гетеро- и гомоталлического путей воспроизведения может иметь особую роль для аллопатрического видообразования. Способность к гомоталлическому воспроизведению существенно расширяет возможности расселения видов, позволяя даже одной клетке дать начало полноценной популяции, в которой присутствуют мужские и женские особи. Такая популяция, поскольку она подвергается "эффекту основателя", имеет высокие шансы дать начало новому виду [178]. Ярким примером, подтверждающим

вышеизложенное, служат популяции *U. cf. ulna* и *U. acus* из островного индонезийского оз. Матано. *U. acus*, демонстрирующая исключительно гетероталлический путь воспроизведения, сохранила способность к скрещиванию с материковыми популяциями, тогда как *U. cf. ulna*, в системе скрещивания которой сочетаются гомо- и гетероталлизм, приобрела такие генетические отличия, которые привели к репродуктивной изоляции и разделению видов. Клоны из этой популяции скрещивались только между собой и не скрещивались ни с какими другими популяциями. Таким образом, можно предположить, что система скрещивания определяет возможность видообразования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время среди диатомологов нет единства мнений по поводу многих вопросов, в том числе касающихся проблем идентификации и разграничения видов, их систематического положения и определения видовых границ, космополитизма и/или эндемизма отдельных таксонов. Авторы различных теорий и классификаций вступают в противоречия друг с другом, перемещают виды между родами, описывают новые виды, повышают или, наоборот, понижают ранг уже описанных видов до подвидов (вариететов) или сводят в синонимы. Полезным во всех этих дискуссиях может оказаться использование биологической концепции, которая позволяет объективно установить границы между видами, разделить криптические/полукриптические виды. На примере представителей рода *Ulnaria* нами доказано, с одной стороны, широкое распространение на территории Евразийского континента *U. acus*, а с другой стороны, правомерность и необходимость выделения новых видов из комплекса криптических видов *U. cf. ulna*. Слабые морфологические отличия между видами *U. cf. ulna* создают трудности и могут приводить к ошибкам при их определении в изучаемых водоемах. На основании данных проверки репродуктивной совместимости/изоляции клонов *U. cf. ulna*, мы можем констатировать, что на территории Евразии обитает несколько видов: в западной части континента – *U. ulna*, в восточной – *U. danica* и *U. pilum*, в индонезийском оз. Матано – новый для науки вид *Ulnaria*.

Работая с клоновыми культурами и используя подходы репродуктивной биологии, мы подошли к вопросам межвидовой гибридизации, возможность которой для диатомовых ранее была показана на примере всего двух родов. Межвидовая гибридизация *U. ulna* и *U. danica* с образованием жизнеспособных потомков не открывает пути для формирования новых видов, поскольку полученные гибриды стерильны.

Содержание диатомовых водорослей в лабораторных культурах значительно расширяет возможности изучения морфологии и биологии видов, что также подразумевает подбор оптимальных условий для роста. Проведенные эксперименты позволили нам отработать протокол содержания изучаемых водорослей в культуре и подобрать для них оптимальные условия для проведения экспериментов по скрещиванию.

В нашей работе мы не только изучили морфологию створок представителей рода *Ulnaria*, но и показали значительную внутривидовую вариабельность таких параметров как ширина створки, плотность расположения штрихов и ареол.

Установлено, что представители рода *Ulnaria* являются раздельнополыми, основной путь воспроизведения гетероталлический, но у *U. ulna* и *U. danica* отдельные клоны, независимо от пола, способны к гомоталлическому воспроизведению. При этом для женских клонов характерна педогамия, а для мужских – аллогамия.

Изучение пола потомства, полученного в результате внутриклонового воспроизведения, позволило доказать, что мужской пол является гетерогаметным, а женский – гомогаметным. Помимо того, клоны мужского и женского пола различаются на морфологическом уровне (по способу образования гамет в процессе гаметогенеза) и по поведению гамет. В отличие от центрических диатомовых водорослей у представителей рода *Ulnaria* пол детерминирован генотипически, так же как и у остальных изученных пеннатных диатомовых.

Установлено, что доставка гамет к месту сингамии осуществляет за счет образования тонких цитоплазматических выростов (аксоподий), которые формируются периодически и существуют в течение коротких промежутков времени. Выросты формируется только в мужских гаметах, обеспечивая их вращение и движение на расстояния, превышающие диаметр самих гамет. Такой способ движения гамет ранее был показан и для других представителей бесшовных пеннатных диатомей.

Для всех изученных видов рода *Ulnaria* получены данные о кардинальных пунктах их жизненного цикла и соотношении размеров родительских и дочерних клеток при половом воспроизведении. Изучение жизненного цикла, его критических точек, дало возможность проанализировать распределение размеров клеток в природных популяциях и получить информацию о динамике и эффективной доле популяции в конкретный момент времени.

Таким образом, в работе изучено половое воспроизведение, жизненный цикл, система скрещивания и биогеография представителей рода *Ulnaria*. Полученные данные расширяют представление о биологии видов, их распространении и возможности идентификации с помощью комплексного подхода, включающего в себя морфологические, генетические методы и методы репродуктивной биологии.

ВЫВОДЫ

1. Система скрещивания *Ulnaria ulna* и *U. danica* включает в себя гетеро- и гомоталлический способы воспроизведения, тогда как у *U. acus* случаев гомоталлизма не отмечено.
2. При гетероталлическом воспроизведении у всех изученных представителей рода *Ulnaria* половой процесс проходит по единой схеме.
3. Проблема доставки гамет к месту сингамии у представителей рода *Ulnaria* решается за счет перемещения, обусловленного периодическим формированием на поверхности мужских гамет цитоплазматических выростов.
4. Установлено генотипическое определение пола у представителей рода *Ulnaria*. Показано, что мужской пол является гетерогаметным, а женский – гомогаметным в отношении половых детерминант.
5. На Евразийском континенте географически удаленные популяции *U. acus* репродуктивно совместимы, что доказывает широкое распространение вида.
6. Установлено, что слабо отличающиеся морфологически виды *U. ulna* и *U. danica*, репродуктивно изолированы друг от друга. Западная часть Евразийского континента заселена *Ulnaria ulna*, восточная – *U. danica*.
7. Клоны из популяций *U. ulna* и популяций *U. danica*, расположенных на территории от Западно-Сибирской низменности до оз. Байкал, способны к гибридизации с образованием жизнеспособных, но стерильных потомков. Клоны из популяций *U. danica*, расположенных на востоке Евразийского континента, не вступают в процесс полового воспроизведения с клонами *U. ulna*.
8. На примере представителей рода *Ulnaria* показано, что критерий репродуктивной совместимости/изоляции является одним из важнейших при решении вопросов идентификации и разграничения видов, как в таксономическом, так и в биогеографическом плане.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДИК – дифференциально-интерференционный контраст

СМ – световая микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

dH₂O – дистиллированная вода

и др. – и другие

см. – смотри

р. – река

оз. – озеро

г. – город

п-ов. – полуостров

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

rbcl – ген хлоропластной ДНК, кодирующий большую субъединицу
рибулозы-1,5-бифосфат карбоксилазы/оксигеназы

psbA –

ITS –

18S –

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

N – число измерений

делений·сут⁻¹ – делений в сутки

кл·мм² – число клеток на квадратный миллиметр

мг – миллиграмм

с – секунда

мин – минута

г – грамм

мл – миллилитр

мкм – микрометр

млн – миллион

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы / Н.И. Абрамсон // Вестник Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 307–331.
2. Андреева С.А. Молекулярно-генетическое исследование диатомовых водорослей из родов *Diadesmis* и *Humidophila* (Bacillariophyceae) / С.А. Андреева, М.С. Куликовский, Е.И. Мальцев, Ю.А. Подунай, Е.С. Гусев // Ботанический журнал. – 2016. – Т. 101, № 5. – С. 21 – 28.
3. Бедошвили Е.Д. Ультраструктура хлоропластов нескольких видов диатомовых водорослей из разных классов / Е.Д. Бедошвили, Т.П. Попкова, Е.В. Лихошвай // Цитология. – 2009. – Т.51, №4. – С. 346–357.
4. Верещагин А.Л. Культивирование пресноводной *Synedra acus* в столитровом фотобиореакторе и оценка состава биомассы / А.Л. Верещагин, О.Ю. Глызина, Т.Н. Башарина, Т.А. Сафонова, Н.А. Латышев [и др.] // Биотехнология. – 2008. – № 4. – С. 55–63.
5. Генкал С.И. Диатомовые водоросли водоемов и водотоков Карелии / С.И. Генкал, Т.А. Чекрыжева, С.Ф. Комулайнен. – М.: Научный мир, 2015. – 202 с.
6. Генкал С.И. Диатомовые водоросли слабоизученных водных экосистем крайнего севера Западной Сибири / С.И. Генкал, М.И. Ярушина. – М.: Научный мир, 2017. – 212 с.
7. Гогорев Р.М. Русский и английский терминологический словарь по морфологии диатомовых водорослей / Р.М. Гогорев, Д.А. Чудаев, В.А. Степанова, М.С. Куликовский // Новости систематики низших растений. – 2018. – Т. 52, ч. 2. – С. 265–309.
8. Грант В. Видообразование у растений: пер. с англ. / В. Грант. – М.: Мир, 1984. – 528 с.

9. Грачев М.А. Элементы активного центра белков транспорта кремниевой кислоты в диатомовых водорослях / М.А. Грачев, Н.Н.Деникина, С.И. Беликов, Е.В. Лихошвай, М.М. Усольцева, И.В. Тихонова, Р.В. Адельшин, С.А. Клер, Т.А. Щербакова // Молекулярная биология. – 2002. – Т. 36, №4. – С. 1–3.
10. Давидович Н.А. Коллекция культур диатомовых водорослей Карадагской научной станции (Крым) / Н.А. Давидович, О.И. Давидович, Ю.А. Подунай // Морской биологический журнал. – 2017. – Т. 2, №1. – С. 18–28.
11. Давидович Н.А. Лимитированный объем среды как фактор, ограничивающий половое воспроизведение диатомовых водорослей в культуре / Н.А. Давидович // Карадаг. Гидробиологические исследования. (Сборник научных трудов, посвященный 90-летию Карадагской научной станции им. Т.И.Вяземского и 25-летию Карадагского природного заповедника НАН Украины) / Под ред. А.Л. Морозова, В.Ф. Гнубкин. Книга 2-я. – Симферополь: Сонат, 2004. – С.181–188.
12. Давидович Н.А. Определения и понятия репродуктивной биологии диатомовых водорослей (терминологический словарь) / Н.А. Давидович // Новости систематики низших растений. – 2017. – Т. 51. – С. 71–105.
13. Давидович Н.А. Половая гетерогенность клонов *Nitzschia longissima* (Bréb.) Ralfs (Bacillariophyta) / Н.А.Давидович // Альгология. – 2002. – Т. 12, № 3. – С. 279–289.
14. Давидович Н.А. Репродуктивная биология диатомовых водорослей: 170-летняя история и перспективы исследований / Н.А. Давидович // Труды Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН. – 2019. – Вып. 1 (9). – С. 86–96.
15. Давидович Н.А. Репродуктивные особенности диатомовых водорослей: значение для культивирования и биотехнологии / Н.А. Давидович, О.И. Давидович, Ю.А. Подунай, К.И. Шоренко, М.С. Куликовский // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 2. – С. 167–175.

16. Давидович Н.А. Фоторегуляция полового воспроизведения у *Bacillariophyta* (Обзор) / Н.А. Давидович // Альгология. – 2002. – Т. 12, № 2. – С. 259–272.
17. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г.Н. Зайцев. – М.: Наука, 1984. – С. 424 с.
18. Захарова Ю.Р. Таксономическая характеристика микроорганизмов, ассоциированных с культивируемой диатомеей *Synedra acus* из озера Байкал / Ю.Р. Захарова, Р.В. Адельшин, В.В. Парфенова, Е.Д. Бедошвили, Е.В. Лихошвай // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 5. – С. 688–695.
19. Караева Н.И. Новый род из семейства *Naviculaceae* West / Н.И. Караева // Ботанический журнал. – 1978. – Т. 63. – С. 1593–1596.
20. Куликовский М.С. Биogeография пресноводных *Bacillariophyta*. Основные концепции и подходы / М.С. Куликовский, И.В. Кузнецова // Альгология. – 2014. – Т. 24, № 2. – С. 125–146.
21. Куликовский М.С. Новые данные к флоре *Bacillariophyta* Беларуси. 2. Сем. *Fragilariaceae* (Kütz.) De Tony, *Diatomaceae* Dumort., *Tabellariaceae* F. Schütt / М.С. Куликовский, С.И. Генкал, Т.М. Михеева // Альгология. – 2011. – Т. 21, № 3. – С. 357–373.
22. Куликовский М.С. Определитель диатомовых водорослей России / М.С. Куликовский, А.М. Глущенко, С.И. Генкал, И.В. Кузнецова. – Ярославль: Филигрань, 2016. – 804 с.
23. Лухтанов В.А. Делимитация видов и анализ криптического видового разнообразия в XXI веке / В.А. Лухтанов // Энтомологическое обозрение. – 2019. – Т. 98, № 2. – С. 358–370.
24. Майр Э. Популяции, виды и эволюция / Э. Майр. – Москва: Мир, 1974. – 460 с.
25. Паламарь-Мордвинцева Г.М. Биogeография водорослей Украины, ее особенности, проблемы и перспективы / Г.М. Паламарь-Мордвинцева, П.М. Царенко // Альгология. – 2010. – Т. 20, № 3. – С. 253–265.

26. Подунай Ю.А. Дефицит силиката натрия в среде как фактор ингибирования культуры диатомовых водорослей на примере рода *Ulnaria* / Ю.А. Подунай, Н.А. Давидович // Водные биоресурсы и аквакультура юга России: материалы Всероссийской научно-практической конференции, приуроченной к 20-летию открытия в Кубанском государственном университете направления подготовки "Водные биоресурсы и аквакультура" / Ред. Г.А. Москул. – Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2018. С. 370–375.
27. Подунай Ю.А. Морфологическая вариабельность клонов *Ulnaria ulna* (Bacillariophyceae) из удаленных популяций Евразийского континента / Ю.А. Подунай, К.И. Шоренко, С.А. Андреева, Н.А. Давидович // Вопросы современной альгологии. – 2017. – Т. 13, № 1. <http://algology.ru/1103>
28. Подунай Ю.А. Особенности полового воспроизведения и система скрещивания *Ulnaria acus* (Bacillariophyta) / Ю.А. Подунай, Н.А. Давидович, М.С. Куликовский, Е.С. Гусев // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2018. – Т.11, № 1. – С. 75–87.
29. Полякова С.Л. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей / С.Л. Полякова, О.И. Давидович, Ю.А. Подунай, Н.А. Давидович // Морской биологический журнал. – 2018. – Т. 3, № 2. – С. 73–80.
30. Поповская Г.И. К экологии и морфологии байкальской *Synedra acus* subsp. *radians* (Kütz.) Skabitsch. (Bacillariophyta) / Г.И. Поповская, С.И. Генкал // Биология внутренних вод. – 1998. – № 1. – С. 92–96.
31. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. — Минск: Высшейш. школа, 1973. – С. 320 с.
32. Рощин А.М. Аллогамный половой процесс и гаплоидный партеногенез у двудомной водоросли *Licmophora ehrenbergii* (Kütz.) Grun. (Bacillariophyta) / А.М. Рощин, В.А. Чепурнов // Альгология. – 1994 – Т. 4, № 4. – С. 3–10.

33. Рощин А.М. Диатомовая водоросль с однодомным и двудомным воспроизведением / А.М. Рощин // Журнал общей биологии – 1987. – Т. 48, № 6. – С. 771–783.
34. Рощин А.М. Жизненные циклы диатомовых водорослей / А.М. Рощин. – Киев: Наук. думка, 1994. – 171 с.
35. Рощин А.М. Сочетание однодомности и двудомности у диатомовой водоросли *Nitzschia lanceolata* W. Sm. / А.М. Рощин // Журнал общей биологии. – 1990. – Т. 51, № 5. – С. 699–708.
36. Седова Т.В. Кариология водорослей / Т.В. Седова. – СПб.: Наука, 1996. – 386 с.
37. Федин Л.А. Микрофотография / Л.А. Федин, И.Я. Барский. – Ленинград: Наука, 1971. – 220 с.
38. Ходоровская Н.И. Исследование влияния концентраций кремния и фосфора на развитие диатомовой микрофлоры водоема / Н.И. Ходоровская, М.В. Стурова // Известия Челябинского научного центра. – 2002. – Т. 15, вып. 2. – С. 50–53.
39. Чудаев Д.А. Диатомовые водоросли озера Глубокого (Московская область) / Д.А. Чудаев, М.А. Гололобова. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. – 447с.
40. Abdo S.M. Potential production of omega fatty acids from microalgae / S.M. Abdo, G.H. Ali, F.K. El-Baz // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. – 2015. – Vol. 34, iss. 2. – P. 210 – 215.
41. Ács É. Investigation of benthic algal communities, especially diatoms of some Hungarian streams in connection with reference conditions of the water framework directives / É. Ács, K. Szabó, B. Tóth, K.T. Kiss // Acta Botanica Hungarica. – 2004. – Vol.46, iss. 3–4. – P. 255–277.
42. Adl S.M. The new higher level classification of eukaryotes and taxonomy of protists. / S.M. Adl, A.G.B. Simpson, M.A. Farmer, R.A. Andersen, O.R. Anderson [et al.] // Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2005. – Vol. 52, N 5. – P. 399–451.

43. Alverson A.J. Comments on recent progress toward reconstructing the diatom phylogeny / A.J. Alverson, E.C. Theriot // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2005. – Vol. 5. – P. 57–62.
44. Amato A. Diatom reproductive biology: living in a crystal cage / A. Amato // *The International Journal of Plant Reproductive Biology*. – 2010. – Vol. 2, iss. 1. – P. 1–10.
45. Amato A. Rare interspecific breeding in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) / A. Amato, L. Orsini // *Phytotaxa*. – 2015. – Vol. 271, iss. 2. – P. 145–154.
46. Amato A. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms / A. Amato, W.H.C.F. Kooistra, J.H. Levaldi Ghiron, D.G. Mann, T. Pröschold, M. Montresor // *Protist*. – 2007. – Vol. 158, iss. 2. – P. 193–207.
47. Amato A. Species concepts and definitions: reproductive isolation as a tool to reveal species boundaries / A. Amato // *The International Journal of Plant Reproductive Biology*. – 2010. – Vol. 2, iss. 2. – P. 114–126.
48. Andersen R.A. Recipes for freshwater and seawater media / R.A. Andersen, J.A. Berges, P.J. Harrison, M.M. Watanabe // *Algal culturing techniques* / Ed. R.A. Andersen — Elsevier Academic Press. 2005. — P. 429–538.
49. Armbrust E.V. Identification of a new gene family expressed during the onset of sexual reproduction in the centric diatom *Thalassiosira weissflogii* / E.V. Armbrust // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 65, iss. 7. P. 3121–3128.
50. Armbrust E.V. Rapid evolution of a sexual reproduction gene in centric diatoms of the genus *Thalassiosira* II / E.V. Armbrust, H.M. Galindo // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67. – P. 3501–3513.
51. Armbrust E.V. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism / E.V. Armbrust, J.A. Berges, C. Bowler, B.R. Green, D. Martinez [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – P. 79–86.
52. Armbrust E.V. The life of diatoms in the world's oceans / E.V. Armbrust // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – P. 185–192.

53. Beakes G.W. Zoospore ultrastructure of *Zygorhizidium affluens* and *Z. planktonicum*, two chytrids parasitizing the diatom *Asterionella formosa* / G.W. Beakes, H.M. Canter, G.H.M. Jaworski // Canadian Journal of Botany. – 1988. – Vol. 66. – P. 1054–1067.
54. Behnke A. Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta) / A. Behnke, T. Friedl, V.A. Chepurinov, D.G. Mann // Journal of Phycology. – 2004. – Vol. 40, iss. 1. – P. 193–208.
55. Benoiston A.-S. The evolution of diatoms and their biogeochemical functions / A.-S. Benoiston, F.M. Ibarbalz, L. Bittner, L. Guidi, O. Jahn, S. Dutkiewicz, C. Bowler // Philosophical Transactions of the Royal Society B. – 2017. – Vol. 372, iss. 1728. – P. 1 – 10.
56. Beszteri B. Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity / B. Beszteri, É. Ács, L.K. Medlin // Protist. – 2005. – Vol. 156. – P. 317–333.
57. Bory de Saint-Vincent J.-B.G.M. Encyclopédie méthodique. Histoire naturelle des zoophytes ou animaux Rayonnés / M. Bory de Saint-Vincent / Eds. J.V.F. Lamouroux, J.-B.G.M Bory de Saint-Vincent, J.A. Eudes-Deslongchamps. – Paris: Veuve Agasse, 1827. – pp. 377–819.
58. Bourne C.M. Organization of the chloroplast genome of the centric diatom *Cyclotella meneghiniana* / C.M. Bourne, J.D. Palmer, E.F. Stoermer // Journal of Phycology. – 1992. – Vol. 28. – P. 347–355.
59. Bowler C. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes / C. Bowler, A.E. Allen, J.H. Badger, J. Grimwood, K. Jabbari [et al.] // Nature. – 2008. – Vol. 456. – P. 239–244.
60. Bozarth A. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications / A. Bozarth, U.-G. Maier, S. Zauner // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 82. – P. 195–201.
61. Brzezinski M.A. Control of silica production by iron and silicic acid during the Southern Ocean Iron Experiment (SOFEX) / M.A. Brzezinski, J.L. Jones, M.S.

- Demarest // Limnology and Oceanography. – 2005. – Vol. 50, iss. 3. – P. 810–824.
62. Bukhtiyarova L.N. New taxonomical combinations in some genera of Bacillariophyta / L.N. Bukhtiyarova, P. Compère // Algologia. – 2006. – Vol. 16, iss. 2. – P. 280–283.
 63. Cantonati M. Freshwater benthic diatoms of Central Europe: over 800 common species used in ecological assessments / M. Cantonati, M.G. Kelly, H. Lange-Bertalot. – Schmitten-Oberreifenberg: KoeltzBotanical Books, 2017. – 942 pp.
 64. Cantonati M. Taxonomic and ecological characterization of two *Ulnaria* species (Bacillariophyta) from streams in Cyprus / M. Cantonati, H. Lange-Bertalot, M.G. Kelly, N. Angeli // Phytotaxa. – 2018. – Vol. 346. – P. 78–92.
 65. Casteleyn G. *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? / G. Casteleyn, V.A. Chepurnov, F. Leliaert, D.G. Mann, S.S. Bates, N. Lundholm, L. Rhodes, K. Sabbe, W. Vyverman // Harmful Algae. – 2008. – Vol. 7, iss. 2. – P. 241–257.
 66. Chepurnov V.A. Auxosporulation of *Licmophora communis* (Bacillariophyta) and a review of mating systems and sexual reproduction in araphid pennate diatoms / V.A. Chepurnov, D.G. Mann // Phycological Research. – 2004. – Vol. 52. – P. 1–12.
 67. Chepurnov V.A. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms / V.A. Chepurnov, D.G. Mann, K. Sabbe, W. Vyverman // International Review of Cytology. – 2004. – Vol. 237. – P. 91–154.
 68. Chepurnov V.A. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North sea (Bacillariophyta) / V.A. Chepurnov, D.G. Mann, K. Sabbe, K. Vannerum, G. Casteleyn, E. Verleyen, L. Peperzak, W. Vyverman // European Journal of Phycology. – 2005. – Vol. 40. – P. 379–395.
 69. Chepurnov V.A. Variation in the sexual behaviour of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta). II. Inbred monoecious lineages / V.A. Chepurnov, D.G. Mann // European Journal of Phycology. – 1999. – Vol. 34, iss. 1. – P. 1–11.

70. Chepurnov V.A. Variation in the sexual behaviour of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta). III. Progeny of crosses between monoecious and unisexual clones / V.A. Chepurnov, D.G. Mann // European Journal of Phycology. – 2000. – Vol. 35, iss. 3. – P. 213–223.
71. Chepurnov V.A. Variation in the sexual behaviour of natural clones of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta) / V.A. Chepurnov, D.G. Mann // European Journal of Phycology. – 1997. – Vol. 32, iss. 2. – P. 147–154.
72. Cholnoky B.J. Über die Auxosporenbildung von *Rhoicosphenia curvata* (Kütz.) Grunow / B.J. von Cholnoky // Archiv für Protistenkunde. – 1927. – Vol. 60. P. 8–33.
73. Compère P. *Ulnaria* (Kütz.) Compère, a new genus name for *Fragilaria* subgen. *Altera-synedra* Lange-Bertalot with comments on the typification of *Synedra* Ehrenb. / P. Compère // Lange-Bertalot Festschrift. Studies on diatoms dedicated to Prof. Dr. h.c. Horst Lange-Bertalot on the occasion of his 65th birthday / Eds. R. Jahn, J.P. Kociolek, A. Witkowski, P. Compère. – Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2001. – P. 97–101.
74. Cox E.J. Identification of Freshwater Diatoms from Live Material / E.J. Cox. – London: Chapman & Hall, 1996. – 158p.
75. Coyne J.A. Speciation / J.A. Coyne, H.A. Orr Sunderland. – Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. – 545 p.
76. Cracraft J. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation / J. Cracraft // Speciation and its Consequences / Ed D. Otte J.A. – Sunderland: Endler. Sinauer Associates, 1989. – P. 28–59.
77. Davidovich N. Sexual reproduction in *Schizostauron* / N. Davidovich, O. Davidovich, E. Górecka, M Krzywda, P. Dąbek, A. Witkowski // 9th Central European Diatom Meeting, 10-13th March 2015, Bremerhaven, Germany: Abstr. Book. – Bremerhaven, 2015. – P. 42.
78. Davidovich N.A. *Ardissonea crystallina* has a type of sexual reproduction that is unusual for centric diatoms / N.A. Davidovich, O.I. Davidovich, Y.A. Podunay,

- R. Gastineau, I. Kaczmarska, A. Poulíčková, A. Witkowski // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. Article number: 14670 [Electronic resource]. — Mode of access: <http://doi:10.1038/s41598-017-15301-z>. (Date of reference: 02.09.2020).
79. Davidovich N.A. Heterothallic and homothallic sexual reproduction in *Tabularia fasciculata* (Bacillariophyta) // N.A. Davidovich, I. Kaczmarska, J.M. Ehrman // Fottea. – 2010. – Vol. 10. – P. 251–266.
 80. Davidovich N.A. Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta) / N.A. Davidovich, J.-L. Mouget, P. Gaudin // European Journal of Phycology. – 2009. – Vol. 44, iss. 2. – P. 251–261.
 81. Davidovich N.A. Mechanism of male gamete motility in araphid pennate diatoms from the genus *Tabularia* (Bacillariophyta) / N.A. Davidovich, I. Kaczmarska, S.A. Karpov, O.I. Davidovich, M.L. MacGillivray, L. Mather // Protist. – 2012b. – Vol. 163, iss. 3. – P. 480–494. (online 21 November 2011, <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.09.002>).
 82. Davidovich N.A. Patterns of sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudonitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* / N.A. Davidovich, S.S. Bates // Harmful microalgae / Eds. B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernandez, T. Wyatt. – Paris: Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, 1998. – P. 152–155.
 83. Davidovich N.A. Sexual reproduction and mating system of the diatom *Tabularia tabulata* (C. Agardh) Snoeijs (Bacillariophyta) / N.A. Davidovich, O.I. Davidovich // International Journal on Algae. – 2011. – Vol. 13, iss. 1. – P. 18–36.
 84. Davidovich N.A. Sexual reproduction in *Schizostauron* (Bacillariophyta) and a preliminary phylogeny of the genus / N.A. Davidovich, O.I. Davidovich, A. Witkowski, C. Li, P. Dąbek, D.G. Mann, I. Zgłobicka, K.J. Kurzydłowski, E. Gusev, E. Górecka, M. Krzywda // Phycologia. – 2017. – Vol. 56, iss. 1. – P. 77–93.
 85. Davidovich N.A. Species specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms / N.A. Davidovich: Proc. 16th Int. Diatom Symp. Athens and Aegean

- Islands, Aug. 25–Sept. 1, 2000 / Athens: University Athens, 2001. – P. 191–196.
86. Davidovich N.A. The sexual structure of a natural population of the diatom *Nitzschia longissima* (Bréb.) Ralfs / N.A. Davidovich, I. Kaczmarska, J.M. Ehrman // Proceedings of the 18th International Diatom Symposium (Miedzyzdroje, Poland, 2–7 September, 2004) / Ed. A. Witkowski. – Bristol: Biopress Limited, 2006. – P. 27–40.
 87. Davis C.O. Continuous culture of marine diatoms under silicon limitation. 3. A model of Si-limited diatom growth / C.O. Davis, N.F. Breitner, P.J. Harrison // Limnology and Oceanography. – 1978. – Vol. 23, iss. 1. – P. 41–52.
 88. Diatom [электронный ресурс] URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Diatom> (дата обращения 24.05.2021).
 89. Dobzhansky T. Genetics and the Origin of Species. 1st edition / T. Dobzhansky. – New York: Columbia University Press, 1937. – 364 pp.
 90. Drebes G. Sexuality / G. Drebes // The Biology of Diatoms. // Botanical Monographs / Ed. Werner. – Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. – Vol. 13. – P. 250–283.
 91. Edlund M.B. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories / M.B. Edlund, E.F. Stoermer // J. Phycol. – 1997. – Vol. 33, iss. 6. – P. 897–918.
 92. Edlund M.B. Intra- and inter-specific differences in gametangial and initial cell size in diatoms / M.B. Edlund, R.J. Bixby: Proceedings of the 16th International Diatom Symposium (25 August - 1 September 2000, Athens, Aegean Islands): Ed. A. Economou-Amilli, – 601 pp. University of Athens, Greece, 2001 – P. 169–190.
 93. Egge J.K. Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition / J.K. Egge, D.L. Aksnes // Marine Ecology Progress Series. – 1992. – Vol. 83. – P. 281–289.

94. Ehrenberg C.G. Organisation, Systematik und geographisches Verhältniss der Infusionsthierchen. Zwei Vortrage / C.G. Ehrenberg – Berlin: Druckerei der Koniglichen Akademie der Wissenschaften, 1830. – 108 pp.
95. Ehrenberg C.G. Über die Entwicklung und Lebensdauer der Infusionsthier; nebst fernerer Beiträgen zu einer Vergleichung ihrer organischen Systeme / C.G. Ehrenberg. – Berlin: Abhandlungen der Königlich Akademie Wissenschaften zu Berlin, Physikalische Klasse, 1832. – 154 pp.
96. Evans M.K. A Molecular systematic approach to explore diversity within the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta) / M.K. Evans, A.H. Wortley, G.E. Simpson, V.A. Chepurnov, D.G. Mann // Journal of Phycology. – 2008. – Vol. 44. – P. 215–231.
97. Field C.B. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components / C.B. Field, M.J. Behrenfeld, J.T. Randerson, P.G. Falkowski // Science. – 1998. – Vol. 281. – P. 237–240.
98. Fox J.M. Minerals and trace elements in microalgae / J.M. Fox, P.V. Zimba // Microalgae in health and disease prevention / Eds.: I. Levine, J. Fleurence. – Academic Press, 2018. – P. 177 – 193.
99. Franck V.M. Iron and silicic acid concentrations regulate Si uptake north and south of the Polar Frontal Zone in the Pacific Sector of the Southern Ocean / Franck V.M., Brzezinski M.A., Coale K.H., Nelson D.M. // Deep-Sea Research. – 2000. – Vol. 47, iss. 15–16. – P. 3315–3338.
100. Galachyants Yu. P. Complete Chloroplast Genome Sequence of Freshwater Araphid Pennate Diatom Alga *Synedra acus* from Lake Baikal / Yu.P. Galachyants, A.A. Morozov, A.V. Mardanov, A.V. Beletsky, N.V. Ravin, D.P. Petrova, Ye.V. Likhoshway // International Journal of Biology. – 2012. – Vol. 4, iss. 1. – P. 27–35.
101. Gastineau R. A new blue – pigmented hasleoid diatom, *Haslea provincialis*, from the Mediterranean Sea. / R. Gastineau, G. Hansen, N.A. Davidovich, O. Davidovich, J-F. Bardeau, I. Kaczmarska, J.M. Ehrman, V. Leignel, Y.

- Hardivillier, B. Jacquette, M. Poulin, M. Morançais, J. Fleurence, J-L. Mouget// European Journal of Phycology. – 2016. – Vol. 51, iss. 2. – P. 156–170.
102. Gastineau R. *Haslea ostrearia*-like Diatoms: Biodiversity out of the Blue / R. Gastineau, N. Davidovich, G. Hansen, J. Rines, A. Wulff [et al.] // Advances in Botanical Research: Sea Plants / Ed. N. Bourgoignon. – United Kingdom: Academic Press. – 2014. – Vol. 71. – P. 441–465.
 103. Gastineau R. *Haslea silbo*, A Novel Cosmopolitan Species of Blue Diatoms / R. Gastineau, G. Hansen, M. Poulin, C. Lemieux, M. Turmel [et al.] // Biology (Basel). – 2021. – Vol. 10, no 4. Article number: 328. <https://doi.org/10.3390/biology10040328>
 104. Gastineau R. Inheritance of mitochondrial DNA in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Naviculaceae) during auxosporulation suggests a uniparental transmission / R. Gastineau, V. Leignel, B. Jacquette, Y. Hardivillier, A. Wulff, P. Gaudin, D. Bendahmane, N.A. Davidovich, I. Kaczmarska, J.-L. Mouget // Protist. – 2013. – Vol. 164, iss. 3. – P. 340–351.
 105. Geitler L. Auxosporenbildung und systematik bei pennaten diatomeen und die cytologie von *Cocconeis*-Sippen / L. Geitler // Österreichische Botanische Zeitschrift. – 1973. – V. 122. –P. 299–321.
 106. Geitler L. Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen) / L. Geitler // Archiv für Protistenkunde. – 1932. – Vol. 78. – S. 1–226.
 107. Geitler L. Die Auxosporenbildung von *Synedra ulna* / L. Geitler // Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. – 1939. – Vol. 57. – P. 432–436.
 108. Geitler L. Gameten- und Auxosporenbildung von *Synedra ulna* im Verleich mit anderen pennaten Diatomeen / L. Geitler // Planta, Archiv für Wiss. Bot. – 1939. – Vol. 30, iss. 3. – P. 551–566.
 109. Geitler L. Kopulation Und Formwechsel Von *Eunotia arcus* / L. Geitler // Österreichische Botanische Zeitschrift. –1951a. – Vol. 98. – S. 292–337.
 110. Geitler L. Neue Untersuchungen über die Sexualität der pennaten Diatomeen / L. Geitler // Biologisches Zentalblatt. – 1928. – Vol. 48. – P. 648–663.

111. Geitler L. Reproduction and life history in diatoms / L. Geitler // Botanical Review. – 1935. – Vol. 1, iss. 5. – P. 149–161.
112. Geitler L. Sexueller Dimorphismus bei einer Konjugate (*Mougeotia heterogama* n.sp.) / Geitler L. // Österreichische Botanische Zeitschrift. – 1958. – Vol. 105, iss. 4. – P. 301–322.
113. Geitler L. Somatische Teilung, Reduktionsteilung, Copulation und Parthenogenese bei *Cocconeis placentula* / Geitler L. // Archiv für Protistenkunde. – 1927. – Vol. 59. – P. 506–549.
114. Gillard J. Metabolomics Enables the Structure Elucidation of a Diatom Sex Pheromone / J. Gillard, J. Frenkel, V. Devos, K. Sabbe, C. Paul, M. Rempt, D. Inze, G. Pohnert, M. Vuylsteke, W. Vyverman // Angewandte Chemie International Edition. – 2013. – Vol. 52. – P. 854–857.
115. Grachev M.A. A Hight-rezolution diatom record of the palaeoclimates of East Siberia for the last 2.5 My from Lake Baikal / M.A. Grachev, S.S. Vorobyova, Ye.V. Likhoshway, O.M. Khlystov, E.V. Bezrukova, E.V. Veinberg, E.L. Goldberg, L.Z. Granina, E.G. Kornakova, F.I. Lazo // Quaternary Science Reviews. – 1998. – Vol. 17. – P. 1101–1106.
116. Guillou L. Bolidomonas: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta) / L. Guillou, M.-J. Chrétiennot-Dinet, L.K. Medlin, H. Claustre, S. Loiseaux-de Goër, D. Vaultot // Journal of Phycology. – 1999. – Vol. 35. – P. 368–381.
117. Guiry M.D. AlgaeBase/ M.D. Guiry, G.M. Guiry. – World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> 2021.
118. Halabowski D. Distribution and ecology of two interesting diatom species *Navicula flandriae* Van de Vijver et Mertens and *Planothidium nanum* Bąk, Kryk et Halabowski in rivers of Southern Poland and their spring Areas / D. Halabowski, M. Bąk, I. Lewin // Oceanological and Hydrobiological Studies. – 2021. – Vol. 50, iss. 2. – P. 1387–149.

119. Handbook of Protoctista / Eds. L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian, D.J. Chapman. – Jones, Bartlett Publishers: Boston, MA, 1990. – 914 pp.
120. Harper M. Diatoms as markers of atmospheric transport // The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences / Eds. E. Stoermer, J. Smol. – Cambridge: Cambridge University Press, 1999. – P. 429–435
121. Harrison H.P.J. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. III. Cellular chemical composition and morphology of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida* / H.P.J. Harrison, H.L. Conway, R.W. Holmes, C.O. Davis // Marine Biology. – 1977. – Vol. 43, issue 1. – P. 19–31
122. Heudre D. On the identity of the rare *Fragilaria subconstricta* (Fragilariaceae), with *Fragilaria* species forming ribbon-like colonies shortly reconsidered / D. Heudre, C.E. Wetzel, L. Moreau, B. Van de Vijver, L. Ector // Plant Ecology and Evolution. – 2019. – Vol. 152, no 2. – P. 327–339.
123. Hildebrand M. Cloning And functional characterization of ammonium transporters from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae) / M. Hildebrand // Journal of Phycology. – 2005. – Vol. 41. – P. 105–113.
124. Hoffmann L.J. Co-limitation by iron, silicate, and light of three Southern Ocean diatom species / L.J. Hoffmann, I. Peeken, K. Lochte // Biogeosciences Discuss. – 2007. Vol. 4. – P. 209–247.
125. Hustedt F. Systematische und ökologische Untersuchungen über die Diatomeen-Flora von Java, Bali und Sumatra nach dem Material der Deutschen Limnologischen Sunda-Expedition. 'Tropische Binnengewässer, Band VII' / F. Hustedt // Archiv für Hydrobiologie, Supplement. – 1937. – Vol. 15, iss. 2. – P. 155–157.
126. Idei M. Sexual reproduction and auxospore structure in *Diploneis papula* (Bacillariophyta). / M. Idei, S. Sato, T. Watanabe, T. Nagumo, D.G. Mann // Phycologia. – 2013. Vol. 52, iss. 3. – P. 295–308.

127. Jensen K.G. Ultrastructure of the male gametes from two centric diatoms, *Chaetoceros laciniosus* and *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae) / K.G. Jensen, Ø. Moestrup, A-M.M. Schmid // Phycologia. – 2003. – Vol. 42. – P. 98–105.
128. Jiroutová K. A gene in the process of endosymbiotic transfer / K. Jiroutová, L. Kořený, C. Bowler, M. Oborník // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, iss. 10. – P. 1–9.
129. Johnson R.K. Detection of ecological change using multiple organism groups: metrics and uncertainty / R.K. Johnson, D. Hering, M.T. Furse, K.E. Clarke // Hydrobiologia. – 2006. – Vol. 566, iss. 1. – P. 115–137.
130. Jones H.M. Life history and systematics of *Petroneis* (Bacillariophyta), with special reference to British waters / H.M. Jones, G.E. Simpson, A.J. Stickle, D.G. Mann // European Journal of Phycology. – 2005. – Vol. 40. – P. 43–71.
131. Kaczmarska I. Phenotypic and genetic structure of interbreeding populations of the diatom *Tabularia fasciculata* (Bacillariophyta) / I. Kaczmarska, J.M. Ehrman, M.B.J. Moniz, N. Davidovich // Phycologia. – 2009. – Vol. 48, iss. 5. – P. 391–403.
132. Kaczmarska, I. Proposals for a terminology for diatom sexual reproduction, auxospores and resting stages / I. Kaczmarska, A. Pouličková, S. Sato, M.B. Edlund, M. Idei, T. Watanabe, D.G. Mann // Diatom Research. – 2013. – Vol. 28, iss. 3. – P. 263–294.
133. Karsten G. Neuere Untersuchungen ueber die Auxosporenbildung der Diatomeen / G. Karsten // Annales du Jardin botanique de Buitenzorg. – 1898. – Suppl. 2. – P. 47–52.
134. Karsten G. Über die Reduktionsteilung bei der Auxosporenbildung von *Surirella saxonica* / G. Karsten // Zeitschrift für Botanik. – 1912. – Vol. 4. – P. 417–426.
135. Katoh K. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program / K. Katoh, H. Toh // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. – P. 1899–1900.

136. Keeling P.J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids / P.J. Keeling // Philosophical Transactions of the Royal Society B. – 2010. – Vol. 365, iss.1541. – P. 729 – 748.
137. Kermarrec L. Next-Generation Sequencing to Inventory Taxonomic Diversity in Eukaryotic Communities: A Test for Freshwater Diatoms / L. Kermarrec, A. Franc, F. Rimet, P. Chaumeil, J.-F. Humbert, A. Bouchez // Molecular Ecology Resources. – 2013. – Vol. 13. – P. 607–619.
138. Klapper F. Pheromone Mediated Sexual Reproduction of Pennate Diatom *Cylindrotheca closterium* / F. Klapper, S. Audoor, W. Vyverman, G. Pohnert // Journal of Chemical Ecology. – 2021. – Vol. 47. – P. 504–512. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01277-8>
139. Kobayasi H. *Fragilaria pseudogaillonii* sp. nov., a freshwater pennate diatom from Japanese river / H. Kobayasi, M. Idei // Japanese Journal of Phycology. – 1979. – Vol. 27. – P. 193–199.
140. Kociolek J.P. Centric and araphid diatoms / J.P. Kociolek, E.C. Theriot, D.M. Williams, M. Julius, E.F. Stoermer, J.C. Kingston // Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification, second ed. / Eds. J.D. Wehr, R.G. Sheath, J.P. Kociolek. – London: Academic Press, 2015. – P. 653–708.
141. Kociolek J.P. Freshwater diatom biogeography/ J.P. Kociolek, S.A. Spaulding // Nova Hedwigia. – 2000. – Vol. 71. – P. 223–241.
142. Kociolek J.P. Variation and polymorphism in diatoms: the triple helix of development, genetics and environment and our understanding of diatom systematics. A review of the literature / J.P. Kociolek, E.F. Stoermer // Vie et Milieu. – 2010. – Vol. 60. – P. 75–87.
143. Kooistra W.H.C.F. Adaptations of araphid pennate diatoms to a planktonic existence / W.H.C.F. Kooistra, G. Forlani, M. De Stefano // Marine Ecology. – 2008. – Vol. 30, iss. 1. – P. 1–15.
144. Krammer K. Bacillariophyceae. 2/3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae / K. Krammer, H. Lange-Bertalot // Süßwasserflora von Mitteleuropa / Eds. H. Ettl,

- J. Gerloff, H. Heynig, D. Möllenhauer. – Stuttgart: G. Fischer; Jena: G. Fischer, 1991. – 576 s.
145. Kulikovskiy M. Morphological and molecular evidence support description of two new diatom species from the genus *Ulnaria* in Lake Baikal / M. Kulikovskiy, H. Lange-Bertalot, N. Annenkova, E. Gusev, J.P. Kociolek // Fottea, Olomouc. – 2016. – Vol. 16, 1. – P. 34–42.
 146. Kulikovskiy M. Phylogenetic position of the diatom genus *Geissleria* Lange-Bertalot & Metzeltin and description of two new species from Siberian mountain lakes / M. Kulikovskiy, E. Gusev, S. Andreeva, N. Annenkova // Phytotaxa. – 2014. – Vol. 177, iss. 5. – P. 249–260.
 147. Kützing F.T. Die Kieselalgen. Bacillarien oder Diatomeen / F.T. Kützing. – Nordhausen: W. Kohn, 1844. – 152 pp.
 148. Lange-Bertalot H. Contributions to the taxonomy of needle-shaped *Fragilaria* and *Ulnaria* species / H. Lange-Bertalot, S. Ulrich // Lauterbornia. – 2014. – Vol. 78. – P. 1–73.
 149. Lange-Bertalot H. Indicators of Oligotrophy. 800 taxa representative of three ecologically distinct lake types: carbonate buffered - oligotrophic - weakly buffered soft water / H. Lange-Bertalot, D. Metzeltin // Iconographia Diatomologica. – 1996. – Vol. 2. – 390 pp.
 150. Leblanc K. Fe and Zn effects on the Si cycle and diatom community structure in two high and low-silicate HNLC areas / K. Leblanc, C.E. Hare, P.W. Boyd, K. Bruland, B. Sohst, S. Pickmere, M. Lohan, K. Buck, M. Ellwood, D.A. Hutchins // Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers. – 2005. – Vol. 52. – P. 1842–864.
 151. Levialdi Ghiron J.H. Plastid inheritance in the planktonic raphid pennate diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) / J.H. Levialdi Ghiron, A. Amato, M. Montresor, W.H.C.F. Kooistra // Protist. – 2008. – Vol. 159. P. 91–98.

152. Liu B. Three new species of *Ulnaria* (Bacillariophyta) from the Wuling Mountains Area, China / B. Liu, D.M. Williams, W. Tan // *Phytotaxa*. – 2017. – Vol. 306. – P. 241–258.
153. Liu B., Three species of *Ulnaria* (Bacillariophyceae) from China, with reference to the valve central area and apices / B. Liu, D.M. Williams, Q. Liu, X. Yang // *Diatom Research*. – 2019. – Vol. 34, iss. 1. – P. 49–65.
154. Lundholm N. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses / N. Lundholm, Ø. Moestrup, Y. Kotaki, K. Hoef-Emden, C. Scholin, P. Miller // *Journal of Phycology*. – 2006. – Vol. 42. – P. 464–481.
155. MacDonald J.D. On the structure of the diatomaceous frustule, and its genetic cycle / J.D. MacDonald // *The Annals and magazine of natural history; zoology, botany, and geology*. Ser. 4. – 1869. – Vol. 3. – P. 1–8.
156. Mann D.G. An inordinate fondness? The number, distributions and origins of diatom species / D.G. Mann, P. Vanormelingen // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2013. – Vol. 60. – P. 414–420.
157. Mann D.G. Auxospore formation, reproductive plasticity and cell structure in *Navicula ulvacea* and the resurrection of the genus *Dickieia* (Bacillariophyta) / D.G. Mann // *European Journal of Phycology*. – 1994. – Vol. 29, iss. 3. – P. 141–157.
158. Mann D.G. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms / D.G. Mann, S.J.M. Droop // *Hydrobiology*. – 1996. – Vol. 336. – P. 1–32.
159. Mann D.G. Discovering diatom species: is a long history of disagreements about species-level taxonomy now at an end? / D.G. Mann // *Plant Ecology and Evolution*. – 2010. – Vol. 143, iss. 3. – P. 251–264.
160. Mann D.G. Life history and systematics of *Lyrella* / D.G. Mann, A.J. Stickle // *Nova Hedwigia*. – 1993. – Vol. 106. – P. 43–70.
161. Mann D.G. Mating system, sexual reproduction, and auxosporulation in the anomalous raphid diatom *Eunotia* (Bacillariophyta) / D.G. Mann, V.A.

- Chepurnov, M. Idei // Journal of Phycology. – 2003. – Vol. 39, iss. 6. – P. 1067–1084.
162. Mann D.G. Meiosis, nuclear cyclosis, and auxospore formation in *Navicula* sensu stricto (Bacillariophyta) / D.G. Mann, A.J. Stickle // British Phycological Journal. – 1989. – Vol. 24, no. 2. – P.167–181.
 163. Mann D.G. Methods of sexual reproduction in *Nitzschia*: systematic and evolutionary implications. (Notes for a mono graph of the Bacillariaceae) / D.G. Mann // Diatom Research. – 1986. – Vol. 1. – P. 193–203.
 164. Mann D.G. Patterns of sexual reproduction in diatoms / D.G. Mann // Hydrobiologia. – 1993a. – Vol. 269/270. – P. 11–20.
 165. Mann D.G. Revision of the diatom genus *Sellaphora*: a first account of the larger species in the British Isles / D.G. Mann, S.J. Thomas, K.M. Evans // Fottea, Olomouc. – 2008. – Vol. 8, iss. 1. – P. 15–78.
 166. Mann D.G. Sexual reproduction in a marine member of the Bacillariaceae / D.G. Mann // Diatom Research. – 1993. – Vol. 8, iss. 1. – P. 109–116.
 167. Mann D.G. Size and Sex / D.G. Mann // The Diatom World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology / Eds. J. Seckbach, J.P. Kociolek. – 2011. – Vol.19, iss.2. – P. 145–166.
 168. Mann D.G. Structure, life history and systematics of *Rhoicosphenia* (Bacillariophyta). II. Auxospore formation and perizonium structure of *Rh. curvata* / D.G. Mann // Journal of Phycology. – 1982. – Vol. 18. – P. 264–274.
 169. Mann D.G. The diatom genus *Sellaphora*: separation from *Navicula* / D.G. Mann // British Phycological Journal. – 1989. – Vol. 24. – P. 1–20.
 170. Mann D.G. The species concept and cryptic diversity / D.G. Mann, K.M. Evans // Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO / Ed. Ø. Moestrup. – Copenhagen, 2008. – pp. 262–268.
 171. Mann D.G. The species concept in diatoms (Phycological Reviews 18) / D.G. Mann // Phycologia. – 1999. – Vol. 38, iss. 6. – P. 437–495.

172. Mann D.G. The species concept in diatoms: evidence for morphologically distinct, sympatric gamodemes in four epipelagic species / D.G. Mann // *Plant Systematics and Evolution*. – 1989. – Vol. 164. – P. 215–237.
173. Mann D.G. The systematics of *Stauroneis* (Bacillariophyta): sexual reproduction and auxospore development in *S. anceps* var. *siberica* / D.G. Mann // *Nova Hedwigia. Beiheft*. – 1996. – Vol. 112. – P. 307–319.
174. Mann D.G. What have the Romans ever done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematics / D.G. Mann, V.A. Chepurinov // *Nova Hedwigia*. – 2004. – Vol. 79. – P. 237–291.
175. Mann D.G. Why didn't Lund see sex in *Asterionella*? A discussion of the diatom life cycle in nature / D.G. Mann // *Algae and the Aquatic Environment* / Ed. F.E. Round. – Bristol, UK: Biopress Ltd., 1988. – P. 384–412.
176. Manton I. Observations on the fine structure of the male gamete of the marine centric diatom *Lithodesmium undulatum* / I. Manton, H.A. von Stosch // *Journal. Royal Microscopical Society*. – 1966. – Vol. 85. – P. 119–134.
177. Mayr E. *Animal Species and Evolution* / E. Mayr. – Cambridge: Belknap Press, 1963. – 797 pp.
178. Mayr E. Change of genetic environment and evolution / E. Mayr // *Evolution as a process* / Eds. J. Huxley, A.C. Hardy, E.B. Ford. – L.: Allen and Unwin, 1954. – P. 157–180.
179. Mayr E. What is a species, and what is not? / E. Mayr // *Philosophy of Science*. – 1996. – Vol. 63. P. 262–277.
180. McNeill J. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005 / J. McNeill, F.R. Barrie, H.M. Burdet, V. Demoulin, D.L. Hawksworth [et al.] // *Regnum Vegetabile*, Vol. 146. / Ed. N.J. Turland – Liechtenstein: Gantner Verlag, Ruggell, 2006. – 568 p.
181. Medlin L.K. A review of the evolution of the diatoms from the origin of the lineage to their populations / L.K. Medlin // *The Diatom World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* / Eds. J. Seckbach, J.P. Kociolek. –

- London New York: Springer Science+Business Media B.V., 2011. – Vol. 19. – P. 93–118.
182. Medlin L.K. Diatoms (Bacillariophyta) / L.K. Medlin // The timetree of life. – Oxford: Oxford Univ. Press. – 2009. – P.127–130.
 183. Medlin L.K. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): II. Nuclear-encoded small-subunit rRNA sequences comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatoms / L.K. Medlin, R. Gersonde, W.H.C.F. Kooistra, U. Wellbrock // Molecular Biology and Evolution. – 1996. – Vol. 13. – P. 67–75.
 184. Medlin L.K. Evolution of the diatoms.VII. Four gene phylogeny assesses the validity of selected araphid genera / L.K. Medlin, I. Yang, S. Sato // Nova Hedwigia. Beiheft. – 2012. – Vol. 141. –P. 505–514.
 185. Medlin L.K. Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence / L.K. Medlin // Phycologia. – 2016. – Vol. 55. – P. 79–103.
 186. Medlin L.K. Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision / L.K. Medlin, I. Kaczmarek // Phycologia. – 2004. – Vol. 43, iss. 3. – P. 245–270.
 187. Medlin L.K. The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions / L.K. Medlin, D.M. Williams, P.A. Sims // European Journal of Phycology. – 1993. – Vol. 28. – P. 261–275.
 188. Mizuno M. Sexual auxosporulation of the marine diatom *Navicula directa* var. *directa* / Mizuno M. // Phycological Research. – 2000. – Vol. 48. P. 103–106.
 189. Mizuno M. Sexual reproduction and auxospore formation in *Achnanthes javanica* f. *subconstricta* / Mizuno M. // Diatom Research. – 1994. – Vol. 9, iss. 1. – P. 133–141.
 190. Mizuno M. Sexual reproduction of *Melosira* sp. from Oshoro Bay, Hokkaido / M. Mizuno // Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 1977. Vol. 25 (Suppl.). – P. 149–157.

191. Morales E.A. *Fragilaria pennsylvanica*, a new diatom (Bacillariophyceae) species from North America, with comments on the taxonomy of genus *Synedra* Ehrenberg / E.A. Morales // Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. – 2003. – Vol. 153. – P. 155–166.
192. Mouget J.-L. Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia* / J.-L. Mouget, R. Gastineau, O. Davidovich, P. Gaudin, N.A. Davidovich // FEMS Microbiology Ecology. – 2009. – V. 69. – P. 194–201.
193. Moustafa A. Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms / A. Moustafa, B. Beszteri, U.G. Maier, C. Bowler, K. Valentin, D. Bhattacharya // Science. – 2009. – Vol. 324. – P. 1724–1726.
194. Nakov T. Accelerated diversification is related to life history and locomotion in a hyperdiverse lineage of microbial eukaryotes / T. Nakov, J.M. Beaulieu, A.J. Alverson // New Phytologist. – 2018. – Vol. 219, iss. 1. – P. 462–473.
195. Nakov T. Comparative analysis of the interaction between habitat and growth form in diatoms/ T. Nakov, M. Ashworth, E.C. Theriot // The ISME Journal. – 2014. – Vol. 9, iss. 1. – P. 1–10.
196. Paasche E. Silicon and the ecology of marine plankton diatom s.l. *Thalassiosira pseudonana* (*Cyclotella nanu*) grown in a chemostat with silicate as limiting nutrient. 2. Silicate-uptake kinetics in five diatom species / E. Paasche // Marine Biology. – 1973. – Vol. 19. – P. 117–126, 262–269.
197. Paasche E. Silicon content of five marine plankton diatom species measured with a rapid filter method / E. Paasche // Limnology and Oceanography. – 1980. – Vol. 25, no 3. – P. 474–480.
198. Patrick R. The Diatoms of the United States: Vol. 1: Fragilariaceae, Eunotiaceae, Achnanthaceae, Naviculaceae / Patrick, R & C.W. Reimer // Monographs of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. – Philadelphia: Academy of Natural Sciences, 1966. – 688 pp.
199. Peraman M. Identification and quantification of fucoxanthin in selected carotenoid-producing marine microalgae and evaluation for their

- chemotherapeutic potential / M. Peraman, S. Nachimuthu // *Pharmacognosy Magazine*. – 2019. – Vol. 15, iss. 64. – P. 243 – 249.
200. Pfitzer E. Über den Bau und Zeilteilung der Diatomeen / E. Pfitzer // *Botanische Zeitung*. – 1869. – Vol. 27, iss. 46. – P. 774–776.
 201. Podunay Y.A. The Sexual Reproduction and Life Cycle of the Pennate Diatom *Entomoneis* cf. *paludosa* (W. Smith) Reimer (Bacillariophyta) / Y.A. Podunay, N.A. Davidovich, O.I. Davidovich, A. Witkowski, R. Gastineau, C.N. Solak // *Russian Journal of Marine Biology*. – 2021. – Vol. 47. – P. 19–28.
 202. Podunay Yu.A. Effect of culture density on sexual reproduction of *Ardissonea crystallina* (Bacillariophyta) inhabiting the Black Sea / Yu.A. Podunay, O.I. Davidovich, N.A. Davidovich // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2016. – Vol. 71, iss. 2. – P. 82–86.
 203. Podunay Yu.A. Mating system and two types of gametogenesis in the fresh water diatom *Ulnaria ulna* (Bacillariophyta) / Yu.A. Podunay, O.I. Davidovich, N.A. Davidovich // *Algologia*. – 2014. – Vol. 24, iss. 1. – P. 3–19.
 204. Popovskaya G.I. Diatoms of the plankton of Lake Baikal / G.I. Popovskaya, S.I. Genkal, Ye.V. Likhoshway. – Nauka, Novosibirsk, 2002. – 168 pp.
 205. Poulíčková A. Autogamous auxosporulation in *Pinnularia nodosa* (Bacillariophyceae) / A. Poulíčková, D.G. Mann // *Journal of Phycology*. – 2008 – Vol. 44, iss. 2. – P. 350–363.
 206. Prasetya F.S *Haslea nusantara* (Bacillariophyceae), a new blue diatom from the Java Sea, Indonesia: Morphology, biometry and molecular characterization / F.S. Prasetya, R. Gastineau, M. Poulin, C. Lemieux, M. Turmel, A.D. Syakti, Y. Hardivillier, I. Widowati, Y. Risjani, I. Iskandar, T. Subroto, C. Falaise, S. Arsad, I. Safitri, J.-L. Mouget, V. Leignel *Plant Ecology and Evolution*. – 2019. – Vol. 152. P. 188–202.
 207. Ravin N. Complete sequence of the mitochondrial genome of a diatom alga *Synedra acus* and comparative analysis of diatom mitochondrial genomes / N. Ravin, Yu.P. Galachyants, A.V. Mardanov, A.V. Beletsky, D.P. Petrova, T.A.

- Sherbakova, Yu.R. Zakharova, Ye.V. Likhoshway, K.G. Skryabin, M.A. Grachev // *Current Genetics*. – 2010. – Vol. 56. – P. 215–233.
208. Ronquist F. MrBayes: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models / F. Ronquist, J.P. Huelsenbeck // *Bioinformatics*. – 2003. – Vol. 19. – P. 1572–1574.
209. Rose D.T. Some diatom species do not show a gradual decrease in cell size as they reproduce / D.T. Rose, E.J. Cox // *Fundamental and Applied Limnology*. – 2013. – Vol. 182. – P. 117–122.
210. Round F.E. The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera / F.E. Round, R.M. Crawford, D.G. Mann. – Cambridge: Cambridge University Press, 1990. – 747 pp.
211. Ruggiero M.V. Diversity and temporal pattern of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) through the molecular lens / M.V. Ruggiero, D. Sarno, L. Barra, M. Montresor, W.C.H.F. Kooistra, A. Zingone // *Harmful Algae* / – 2015. – Vol. 42. – P. 15–24.
212. Sato S. Auxospore fine structure and variation in modes of cell size changes in *Grammatophora marina* (Bacillariophyta) / S. Sato, D.G. Mann, T. Nagumo, J. Tanaka, T. Tadano, L.K. Medlin // *Phycologia*. – 2008. – Vol. 47, iss. 1. – P. 12–27.
213. Sato S. Auxospore formation and the morphology of the initial cell of the marine araphid diatom *Gephyria media* (Bacillariophyceae) / S. Sato, T. Nagumo, J. Tanaka // *Journal of Phycology*. – 2004. – Vol. 40, iss. 4. – P. 684–691.
214. Sato S. Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms / S. Sato, G. Beakes, M. Idei, T. Nagumo, D.G. Mann // *PLoS ONE*. – 2011. Vol. 6, iss. 10. – e26923.
215. Schlichting H.E. Dispersal of algae and protozoa by Antarctic flying birds / H.E.Jr. Schlichting, B.J. Speziale, R.M. Zink // *Antarctic journal of the United States*. – 1978. – Vol. 13. – P. 147–149.

216. Schmid A.-M.M. Geitler's "Plattenband" in the diatom *Synedra* cf. *ulna* in the light of TEM investigations / A.-M.M. Schmid // Plant Systematics and Evolution. – 1989. – Vol. 164. – P. 239–252.
217. Schultz M.E. Production of male gametes and auxospores in the centric diatoms *Cyclotella meneghiniana* and *C. cryptica* / M.E. Schultz, F.R. Trainor // Journal of Phycology. – 1968. – Vol. 4. – P. 85–88.
218. Schumer M. How common is homoploid hybrid speciation? / M. Schumer, G.G. Rosenthal, P. Andolfatto // Evolution. – 2014. – Vol. 68. – P. 1553–1560.
219. Sharma N. Diatoms biotechnology: various industrial applications for a greener tomorrow / N. Sharma, D.P. Simon, A.M. Diaz-Garza, E. Fantino, A. Messaabi, F. Meddeb-Mouelhi, H. Germain, I. Desgagné-Penix // Frontiers in Marine Science. – 2021. [Electronic resource]. — Mode of access: <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.636613> (Date of reference: 11.06.2021).
220. Sheath R.G. Biogeography of freshwater algae / R.G. Sheath // Encyclopedia of life sciences. – Chichester: John Wiley et Sons, Ltd., 2006. – P. 1–5.
221. Shorenko K.I. The variability of the morphological and structural elements of the frustule in genetically homogeneous and heterogeneous groups of the diatom *Nitzschia rectilonga* Takano, 1983 (Bacillariophyta) / K.I. Shorenko, N.A. Davidovich, M.S. Kulikovskiy // Russian Journal of Marine Biology. – 2014. – Vol. 40, iss. 5. – P. 354–363.
222. Sims P.A. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data / P.A. Sims, D.G. Mann, L.K. Medlin // Phycologia. – 2006. – Vol. 45, iss. 4. – P. 361–402.
223. Siver P.A. Observations on *Fragilaria longifusiformis* comb. nov. et nom. nov. (Bacillariophyceae), a widespread planktic diatom documented from North America and Europe / P.A. Siver, E.A. Morales, B. Van de Vijver, M. Smits, P.B. Hamilton, H. Lange-Bertalot, J. Hains // Phycological Research. – 2006. – Vol. 54. – P. 183–192.
224. Skabitschewsky A.P. Planktonic diatoms of freshwater ecosystems of USSR / A.P. Skabitschewsky. – Moscow: Moscow State University, 1960. – 349 pp.

225. Slate J. The diatom flora of phosphorus-enriched and unenriched sites in a Everglades marsh/ J. Slate, R.J. Stevenson // *Diatom Research*. – 2007. – Vol. 22, iss. 2. – P. 355–386
226. Smol J.P. The diatoms: applications for the environmental and earth sciences / J.P. Smol, E.F. Stoermer. – Cambridge: Cambridge University Press, 2010. – 667 pp.
227. Soininen J. Macroecology of unicellular organisms – patterns and processes / J. Soininen // *Environmental Microbiology Reports*. – 2012. – Vol. 4. – P. 10–22.
228. Stosch H.A. Kann die oogame Araphidee *Rhabdonema adriaticum* als Bindeglied zwischen den beiden grossen Diatomeengruppen angesehen werden? / H.A. von Stosch // *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. – 1958. – Vol. 71, iss. 6. – P. 241–249.
229. Stosch H.A. On auxospore envelopes in diatoms / H.A. von Stosch // *Bacillaria*. – 1982. – Vol. 5. – P. 127–156.
230. Stosch H.A. Über das Perizonium der Diatomeen / H.A. von Stosch // *Vorträgen aus dem Gesamtgebiet der Botanik*. – 1962. Vol. 1. – P. 43–52.
231. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.
232. Theriot E.C. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research / E.C. Theriot, M. Ashworth, E. Ruck, T. Nakov, R.K. Jansen // *Plant Ecology and Evolution*. – 2010. – P. – 278–296.
233. Theriot E.C. The limits of nuclear-encoded SSU rDNA for resolving the diatom phylogeny / E.C. Theriot, A.J. Alverson, R. Gutell // *European Journal of Phycology*. – 2009. – Vol. 44. – P. 277–290.
234. Tilman D. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous

- culture / D. Tilman, S.S. Kilham // *Journal of Phycology*. – 1976. – Vol. 12, iss. 4. – P. 375–383
235. Trobajo R. Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae) / R. Trobajo, E. Clavero, V.A. Chepurnov, K. Sabbe, D.G. Mann, S. Ishihara, E.J. Cox // *Phycologia*. – 2009. – Vol. 48, iss. 6. – P. 443–459.
236. Tuchman M.L. Effects of increased salinity on the diatom assemblage in Fonda Lake, Michigan / M.L. Tuchman, E.F. Stoermer, H.J. Carney // *Hydrobiologia*. – 1984. – Vol. 109. – P. 179–188.
237. Tuchman M.L. Effects of low level salinity concentrations on the growth of *Cyclotella meneghiniana* Kütz. (Bacillariophyta) / M.L. Tuchman, E.C. Theriot, E.F. Stoermer // *Archiv fur Protistenkunde*. – 1984. – Vol. 128. – P. 319–326.
238. Tuji A. Examination of the type material of *Synedra rumpens* = *Fragilaria rumpens*, Bacillariophyceae / A. Tuji, D.M. Williams // *Phycological Research*. – 2006. – Vol. 54, iss. 2. – P. 99–103.
239. Tuji A. The transfer of two Japanese *Synedra* species (Bacillariophyceae) to the genus *Ulnaria* / A. Tuji // *Bulletin of the National Science Museum, Series B (Botany)*, Tokyo. – 2009. – Vol. 35. – P. 11–16.
240. Van de Vijver B. Analysis of the type of *Synedra acus* var. *ostenfeldii* (Bacillariophyta) and its transfer to the genus *Fragilaria* / B. Van de Vijver, E.E. Alexson, E.D. Reavie, F. Straub, G.S. Jónsson, L. Ector // *Botany Letters*. – 2021. – Vol. 168, iss. 1. – P. 85–95.
241. Van de Vijver B. Four new diatom species from La Calera Hot Spring in the Peruvian Andes (Colca Canyon) / B. Van de Vijver, C. Cocquyt // *Diatom Research*. – 2009. – Vol. 29. – P. 209–223.
242. Van de Vijver B. *Ulnaria verhaegeniana*, a new diatom (Bacillariophyta) species from Belgium / B. Van de Vijver, M. De Haan, A. Mertens, C. Cocquyt // *Phytotaxa*. – 2017. – Vol. 326, iss. 3. – P. 221–226.

243. Van den Hoek C. *Algae: An Introduction to Phycology* / C. van den Hoek, D.G. Mann, H.M. Jahns. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 623p.
244. Van Heurck H. *Synopsis des Diatomees de Belgique, Atlas: Planches* / H. Van Heurck – Anvers.: Ducaju & Cie, 1881. – 235 pp.
245. Van Heurck H. *A treatise on the Diatomaceae* / H. Van Heurck. – London: W. Wesley & Son, 1896. – 538 pp.
246. Vanelslander B. Ecological differentiation between sympatric pseu-docryptic species in the estuarine benthic diatom *Navicula phyllepta* (Bacillariophyceae) / B. Vanelslander, V. Créach, P. Vanormelingen, A. Ernst, V.A. Chepurnov, E. Sahan, G. Muyzer, L.J. Stal, W. Vyverman, K. Sabbe // *Journal of Phycology*. – 2009. – Vol. 45. – P. 1278–1289.
247. Vanormelingen P. Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta) / P. Vanormelingen, V.A. Chepurnov, D.G. Mann, K. Sabbe, W. Vyverman // *Protist*. – 2008. – Vol. 159, iss. 1. – P. 73–90.
248. Vanormelingen P. Heterothallic sexual reproduction in the model diatom *Cylindrotheca* / P. Vanormelingen, B. Vanelslander, S. Sato, J. Gillard, R. Trobajo, K. Sabbe, W. Vyverman // *European Journal of Phycology*. – 2013. – Vol. 48. – P. 93–105.
249. Vanormelingen P. Congruence of morphological, reproductive and ITS rDNA sequence data in some Australasian *Eunotia bilunaris* (Bacillariophyta) / P. Vanormelingen, V.A. Chepurnov, D.G. Mann, S. Cousin, K. Sabbe, W. Vyverman // *European Journal of Phycology*. – 2007. – Vol. 42, iss. 1. – P. 61–79.
250. Venkatachalapathy R. *Synedra* species morphological observation at Bhavani region in Cauvery river, Tamil Nadu, India / R. Venkatachalapathy, P. Karthikeyan // *International Journal of Earth Sciences*. – 2013. – Vol. 1, iss. 6. – P. 1-5

251. Vereshchagin A.L. Culturing of a fresh-water diatomic alga *Synedra acus* in a 100-l photobioreactor and analysis of biomass composition / A.L. Vereshchagin, O.Yu. Glyzina, T.N. Basharina, T.A. Safonova, N.A. Latyshev, S.A. Liubochko, E.S. Korneeva, D.P. Petrova, V.V. Annenkov, E.N. Danilovtseva, E.P. Chebykin, N.A. Volokitina, M.A. Grachov // *Biotechnology in Russia*. – 2008. – Vol. 4. – P. 77–90.
252. Vyverman W. The Indo-Malaysian North-Australian phycogeographical region revised / W. Vyverman // *Hydrobiologia*. – 1996. – Vol. 336, iss. 1–3. – P. 107–120.
253. Williams D.M. An overview of diatom classification with some prospects to the future. *The Diatom World* / D.M. Williams, J.P. Kociolek // *Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*. – 2011. – Vol. 19. – P. 49–91.
254. Williams D.M. Comparative morphology of some species of *Synedra* Ehrenb. with a new definition of the genus / D.M. Williams // *Diatom Research*. – 1986. – Vol. 1, iss. 1. – P. 131–152.
255. Williams D.M. Revision of the genus *Fragilaria* / D.M. Williams, F.E. Round // *Diatom Research*. – 1987. – Vol. 2, iss. 2. – P. 267–288.
256. Williams D.M. *Synedra*, *Ulnaria*: definitions and descriptions-a partial resolution / D.M. Williams // *Diatom Research*. – 2011. – Vol. 26. – P. 149–153.
257. Williams D.M. The correct use of the names *Synedra* Ehrenberg and *Catacombas* Williams & Round, a note on the name '*Hystrix* Bory 1822', and some suggestions how to tackle the taxonomic relationships of *Synedra* / D.M. Williams, K. Balasubramanian // *Diatom Research*. – 2021. – Vol. 26, iss.2. – P. 107–118.