

УДК 582.261.1+581.162

ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ПЕННАТНОЙ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *ENTOMONEIS* CF. *PALUDOSA* (W. SMITH) REIMER (BACILLARIOPHYTA)

© 2021 г. Ю. А. Подунай^{1, *}, Н. А. Давидович^{1, 2}, О. И. Давидович¹, А. Витковский², Р. Гастиньо², Ч. Н. Солак³

¹Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, филиал Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Феодосия 298188, Россия

²Институт морских и экологических наук, Щецинский университет, Щецин 70-383, Польша

³Университет Думлупинар, биологический факультет, Кютахья 43000, Турция

*e-mail: grab-ua@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.04.2019 г.

После доработки 10.08.2020 г.

Принята к публикации 24.09.2020 г.

Впервые описаны половое воспроизведение и жизненный цикл морской пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*. Установлено, что в половом процессе участвуют два гаметангия, каждый производит по две гаметы. Для этого вида характерна морфологическая и поведенческая изогамия. Система скрещивания включает гетероталлический способ воспроизведения; случаи гомоталлизма не отмечены. Тип полового процесса близок к категории IC в системе Гайтлера.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, половое воспроизведение, жизненный цикл, гамета, ауксо-спора, зигота, *Entomoneis paludosa*

DOI: 10.31857/S0134347521010083

Изначально под названием *Entomoneis* Эренберг описал подрод (Ehrenberg, 1845a), который затем повысил до уровня рода (Ehrenberg, 1845b). Типовым видом нового рода стал *Entomoneis alata* Ehrenberg (ранее *Navicula alata* Ehrenberg). В настоящее время семейство Entomoneida-seae состоит из двух родов – *Entomoneis* и *Platicthyis* (Lange-Bertalot et al., 2015). Раунд с соавторами (Round et al., 1990) определили *Entomoneis* как род каналошовных пеннатных диатомовых водорослей, обитающих преимущественно в морских и солоноватых водоемах, изредка в пресных водах. Современные исследования показывают, что видовое разнообразие рода *Entomoneis* недооценено (Clavero et al., 1999; Paillès et al., 2014; Mejdandžić et al., 2017; Liu et al., 2018, и др.), а диапазоны ареалов, в которых можно найти его представителей, гораздо шире: *E. vertebralis* E. Clavero, J.O. Grimalt & M. Hernández-Mariné и *E. reimeri* D.C. Reinke & Wujek встречаются в естественных соляных болотах (Clavero et al., 1999); *E. gigantea* (Grunow) Nizamuddin и *E. kjellmanii* (Cleve) Poulin & Cardinal обитают в морских льдах (Poulin et al., 2011; Kudryavtseva et al., 2017); *E. triundulata* Bing Liu & D.M. Williams описан из пресноводного озера (Liu et al., 2018).

Entomoneis paludosa (W. Smith) Reimer – эпипеллический вид диатомей, обитающий в морских и солоноватоводных водоемах (Dalu et al., 2015). Голотип *E. paludosa* в оригинальной публикации Смита (Smith, 1853) описан как *Amphiprora paludosa*, а в 1975 г. переведен Реймером (Guiry, Guiry, 2020) в род *Entomoneis*. К настоящему времени сведения об этом виде дополнены описанием его морфологии и распространения в водах африканского континента (Dalu et al., 2015). Изучено влияние на рост и биохимический состав культур *E. paludosa* некоторых бактерий (Jauffrais et al., 2017), а также добавления цинка (Nguyen-Deroche et al., 2012).

Ауксоспорообразование у *Amphiprora alata* (в настоящее время *Entomoneis alata*) впервые отмечено Карстеном (Karsten, 1899), который привел рисунок пары инициальных клеток внутри оболочек ауккоспор, окруженных пустыми теками родительских клеток. Однако изменение размеров в жизненном цикле вида и особенности полового воспроизведения на этапах гаметогенеза и сингамии до сих пор не описаны.

Диатомовые водоросли отличаются от других одноклеточных водорослей не только наличием кремниевого панциря, но и уникальным измене-

нием его размеров в жизненном цикле. С каждым вегетативным делением длина клеток прогрессивно уменьшается и возникает необходимость восстановления первоначальных размеров. Реституция обычно достигается в процессе полового размножения. Переход от вегетативного размножения к половому происходит после достижения клеткой определенной длины, которая у большинства видов составляет 45–55% от максимального видоспецифического размера (Davidovich, 2001). Таким образом, половое воспроизведение у диатомей – это обязательная жизненная стадия, необходимая для появления поколения с новыми генетическими комбинациями и для восстановления максимального видоспецифического размера клеток (Round et al., 1990; Edlund, Stoermer, 1997; Mann, 2011).

Представители рода *Entomoneis* широко распространены, встречаются постоянно, иногда достигают значительной численности и играют далеко не последнюю роль в морских экосистемах. Благодаря крупным размерам и необычной форме клеток, виды этого рода легко отличить в пробах. Однако данных о их биологии, как и сведений об этапе жизненного цикла, связанном с появлением новых поколений, крайне мало. Цель настоящей работы состояла в описании полового воспроизведения, жизненного цикла и системы скрещивания черноморского представителя рода *Entomoneis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Виды рода *Entomoneis* обнаружены в эпилимнотоне и перифитоне Чёрного моря и изолированы из проб, собранных у побережья Крымского полуострова (клоны 7.0525-А, 7.0525-В, 7.0525-С – в Двухкорной бухте; клон 7.0428-В – в Карадагской бухте около насосной станции; клоны 8.0727-А и 8.0727-В – на глубине 17 м у п-ва Тарханкут), а также у берега на набережной г. Сочи (клоны 7.0601-А, 7.0601-В, 7.0601-С, 7.0601-Д) и около г. Акчакоча, провинция Дюздже (Düzce Akçakoca) на северо-западе Турции (клон 7.0906-Д).

Клоны культивировали в среде, по составу близкой к среде ESAW (Andersen et al., 2005), модифицированной (Полякова и др., 2018) и разбавленной дистиллированной водой до необходимой солености (20‰). Клетки для клоновых культур выделяли микропипеточным методом (Andersen, Kawachi, 2005) под микроскопом МБС-9 (ЛОМО, СССР) и очищали путем многократного пересева в свежую среду. Культивирование проводили в стеклянных чашках Петри диаметром 5–9 см и высотой 0.9–1.4 см при наполнении среды от 8 до 45 мл в соответствии с размером чашки. Экспоненциальную фазу роста поддерживали, еженедельно пересевая культуры в свежую питательную среду. Чашки находились в изолированной

комнате с постоянной температурой $20 \pm 2^\circ\text{C}$ на полках у окон, обращенных на север, что обеспечивало естественные периодичность и уровень освещения.

Монокультуры регулярно просматривали под микроскопом для обнаружения случаев гомоталлического воспроизведения. Каждую неделю экспоненциально растущие культуры попарно смешивали для инициирования гетероталлического полового размножения; смешанные культуры в течение недели ежедневно просматривали под микроскопом, контролируя начало гаметогенеза и появление половых клеток. Обильность воспроизведения оценивали в баллах: 0 – случаи полового размножения не отмечены; 1 – наблюдаются единичные случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования; 2 – случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования встречаются часто, но их нельзя назвать массовыми; 3 – наблюдается массовое ауксоспорообразование.

Для исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) клетки диатомовых водорослей очищали от органического материала кипячением в 35% перекиси водорода (H_2O_2) в течение 6 ч. Затем клеточную суспензию центрифугировали и 7–8 раз промывали дистиллированной водой. Несколько капель полученной суспензии помещали на алюминиевые столики, высушивали на воздухе и напыляли золотом. Препараты просматривали и фотографировали на СЭМ Hitachi SU8020.

За живыми клетками наблюдали под микроскопом Violar PI (PZO, Польша), настроенным по методам дифференциально-интерференционного контраста и освещения по Кёлеру (Федин, Барский, 1971). Клетки фотографировали с помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot A640. Размеры клеток определяли, используя окулярную линейку, калиброванную по объект-микрометру.

Для филогенетического анализа полные кодирующие области *rbcL* (рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы большой субъединицы рРНК) получали из предварительных сборок полного пластидного генома. Все анализы выполнены на платформе MEGAX (Kumar et al., 2018). С помощью программы ClustalW полученные последовательности гена *rbcL* выравнивали с 48 последовательностями, доступными в базе данных BLAST для разных видов *Entomoneis*/*Amphiprora*. В качестве внешней группы использовали *Rhopalodia gibba* (Ehrenberg) O. Müller и *Epithemia parallela* (Grunow) Ruck & Nakov. Последовательности “обрезали” до конечной длины 1081 пара нуклеотидов. Филогенетическое дерево строили по методу максимального правдоподобия на основе модели GTR+I+G, используя

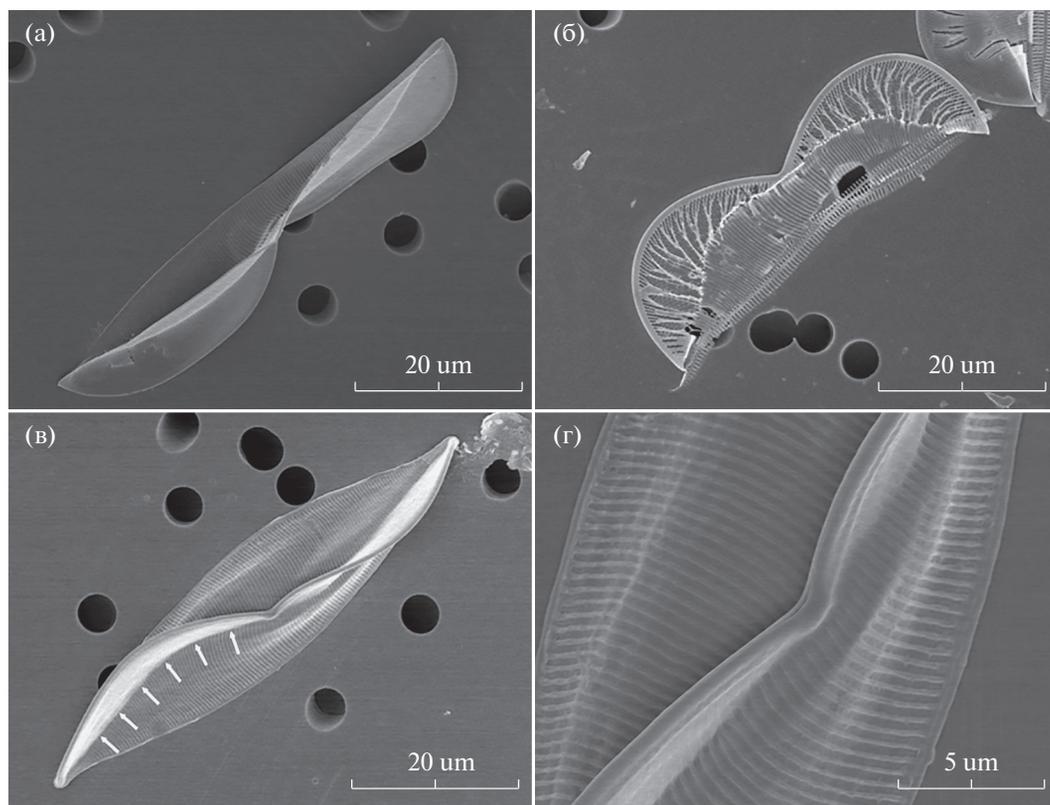


Рис. 1. Микрофотографии клеток морской пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis cf. paludosa* (СЭМ). Стрелками обозначена разделительная линия между килем и лицевой поверхностью створки.

1000 повторностей бутстрепа для определения поддержки ветвей.

Последовательности гена *rbcL* клонов, использованных в данной работе, депонированы в базе данных GenBank под номерами MT424815 (клон 7.0525-A), MT424816 (клон 7.0428-B) и MT424817 (клон 7.0906-D).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Таксономическая характеристика

Клетки в выделенных клонах одиночные, с пояска прямоугольные или гитаровидные, перетянутые в средней части и скрученные по продольной оси (рис. 1). Клетка содержит один хлоропласт, образующий две лопасти. Створки линейно-ланцетные с перетяжкой, несущие узкий киль, уменьшающийся или исчезающий в центре створки и уменьшающийся у ее концов. Штрихи двухрядные и многорядные; образованы небольшими круглыми ареолами, закрытыми гименом снаружи и открытыми внутри. Шов S-образный, на проксимальном и дистальном концах клетки, как правило, прямой; расположен в трубчатом канале, перфорированном небольшими ареолами. Фибулы присутствуют. Вставочные ободки многочисленные, перфорированные.

Изолированные в культуру клетки имели ряд признаков, характерных для *Entomoneis paludosa*. Сравнение характеристик клонов с результатами исследования голотипа *E. paludosa* (W. Smith) Reimer (Dalu et al., 2015) показало, что клоны из культуры соответствовали голотипу *E. paludosa* по длине створки (41–63.5 мкм) и плотности штрихов (20–23 в 10 мкм) (рис. 1в–1г). Однако клетки выделенных нами штаммов имели гладкую (плавную) разделительную линию между килем и лицевой поверхностью створки (рис. 1в), тогда как у всех проиллюстрированных образцов голотипа линия разделения имела отчетливую выпуклость (Dalu et al., 2015).

Молекулярно-филогенетический анализ, выполненный с использованием гена *rbcL*, показал, что клоны, изолированные из проб с крымского и турецкого побережья Черного моря, образуют единый кластер внутри большой клады рода *Entomoneis* (рис. 2). При этом клоны, определенные разными авторами как *E. paludosa*, рассеяны по всему дереву и не образуют единой клады. Подобное положение штаммов свидетельствует о том, что под названием “*paludosa*” скрывается комплекс видов.

Размер вегетативных клеток *E. cf. paludosa*, содержащихся в культуре, варьировал от 18 до 128 мкм

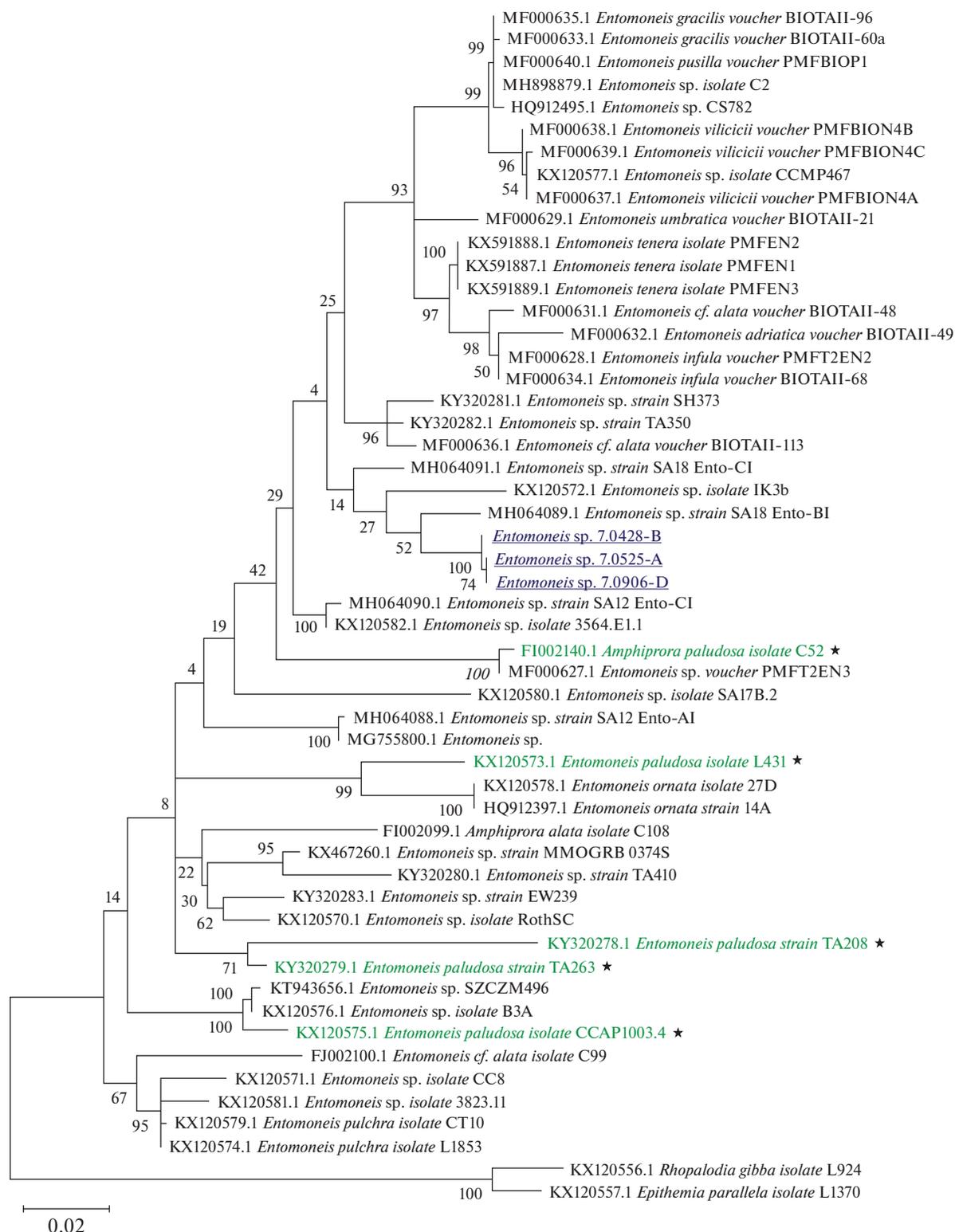


Рис. 2. Филогенетическое дерево пеннатных диатомовых водорослей рода *Entomoneis*, построенное методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей гена *rbcL*. Значение над ветвями – байесовские апостериорные вероятности. Подчеркиванием отмечены клоны, последовательности нуклеотидов которых получены нами. Звездочкой отмечены штаммы из базы данных GenBank, которые другие исследователи определили как *Entomoneis paludosa*.

Таблица 1. Апикальная длина клеток пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*

Стадия жизненного цикла	Длина клеток, мкм		N
	Min	Max	
Вегетативные клетки	18	128	522
Гаметангии	18	64	290
Инициальные клетки	88	128	171

Примечание. Min – минимальная, Max – максимальная длина клеток, N – количество измерений.

(табл. 1). Между размером родительских клеток, участвовавших в половом процессе, и размером образовавшихся инициальных клеток корреляция не отмечена ($R^2 = 0.114$). Для клонов *E.* cf. *paludosa*, содержащихся в культуре, скорость уменьшения размеров составила 3.4 ± 0.4 мкм/мес.

При длительном (более 10 сут) содержании клонов без пересева в свежую среду в культуре, находившейся в стационарной фазе или в фазе деградации, появлялись шарообразные образования (рис. 3), которые с первого взгляда можно было принять за гаметы или зиготы. Однако они имели разные размеры и иногда “неровную” форму. Раскрывшихся створок гаметангиев возле них не отмечено. Наблюдение за дальнейшими превращениями этих шаровидных образований показало, что в течение первых 3 сут они в разной степени увеличивались в диаметре, а через 5 сут начали разрушаться.

Половое воспроизведение

В смешанных посевах в гетероталлическом половом процессе сначала участвует небольшое количество гаметангиев. В парах клонов аллогамный половой процесс можно наблюдать в разных местах чашки Петри на вторые-третьи сутки после скрещивания. На начало полового воспроизведения указывает появление в чашке групп клеток, находящихся в движении (рис. 4а). Деление содержимого гаметангиев проходит в трансапикальной плоскости (рис. 4б, 4в). В каждом гаметангии образуются две гаметы. Гаметы, округляясь и слегка увеличиваясь в размерах, раздвигают створки гаметангия и выходят в среду. Каждая гамета содержит по одному хлоропласту и окружена слабозаметной слизистой оболочкой (рис. 4г). Процесс копуляции гамет отследить сложно. Как только в одной из клеток начинается гаметогенез, к ней подползают клетки (иногда несколько десятков) обоих клонов, постепенно образуя по-

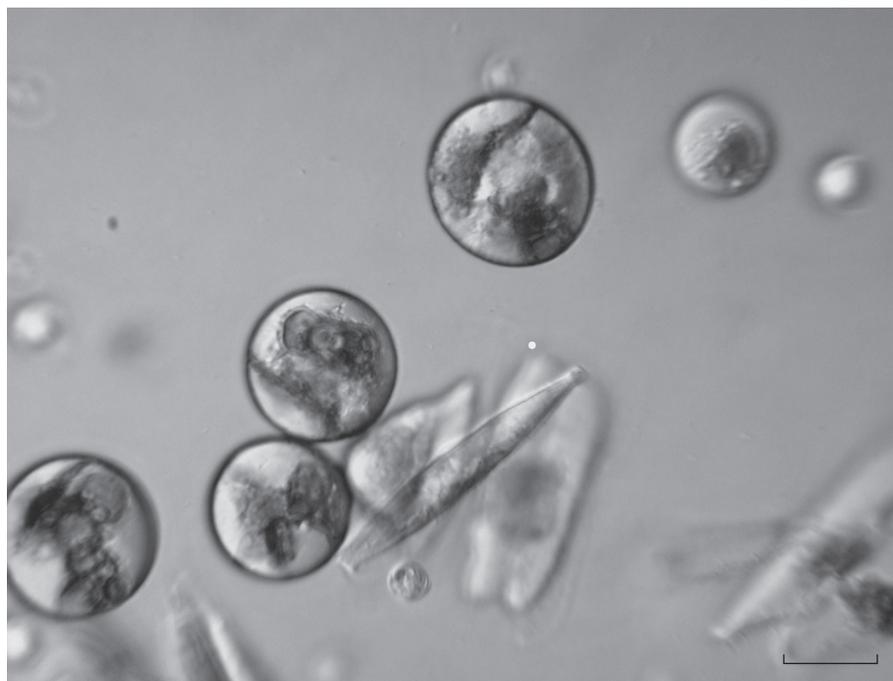


Рис. 3. Сферические структуры, образовавшиеся в переросшей культуре пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*. Шкала 20 мкм.

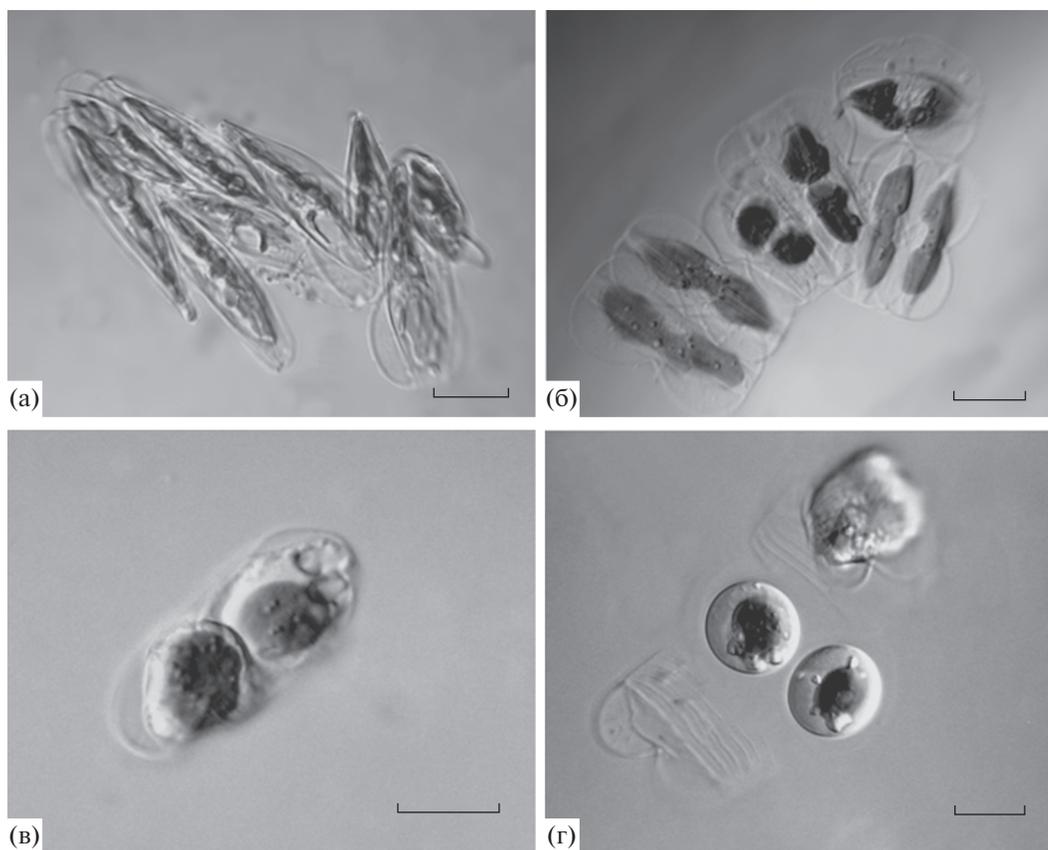


Рис. 4. Гаметогенез пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*. а – группа клеток в начале процесса гаметогенеза; б – клетки на разных этапах деления содержимого гаметангиев и образования гамет; в – сформировавшиеся гаметы готовы к выходу из гаметангия; г – сферические гаметы после выхода из гаметангия. Шкала 20 мкм.

движную и все увеличивающуюся группу, в которой кроме клеток на разных этапах гаметогенеза могут находиться гаметы и уже образовавшиеся зиготы.

Образовавшиеся после сингамии сферические зиготы содержат 2 хлоропласта и располагаются рядом со створками гаметангия, но не имеют с ними тесной связи (рис. 5а). Через некоторое время зиготы биполярно удлиняются (рис. 5а–5в), превращаясь в ауксоспору. Ауксоспоры формируются как вблизи створок одного из гаметангиев, так и поодаль. Перизониум ауксоспоры хорошо развит, с различимыми в световой микроскоп поперечными полосами (рис. 5г). У ауксоспоры, завершившей рост, внутри перизониума откладываются створки инициальной клетки, форма которых не повторяет форму ауксоспоры и характерна для вегетативных клеток (рис. 5д). Когда инициальная клетка выходит из перизониума, его хорошо видно в световой микроскоп (рис. 5е). Инициальные клетки заметно больше материнских клеток (рис. 5ж).

Система скрещивания

За два года наблюдений и экспериментов по скрещиванию ни у одного клона *E. cf. paludosa* не обнаружен гомоталлический способ воспроизведения, тогда как во всех парах клонов (репродуктивно совместимых, подходящих по размеру и находящихся в экспоненциальной фазе роста) на вторые-третьи сутки начинался активный половой процесс. Все черноморские популяции, в том числе удаленные друг от друга популяции с крымского и турецкого побережья, оказались репродуктивно совместимыми. Клоны свободно скрещивались между собой в соответствии с условно выделенными типами спаривания (*mt1* и *mt2*) (табл. 2). Были изолированы инициальные клетки – потомки первого поколения (F1), образовавшиеся в результате гетероталлического воспроизведения клонов из двух популяций. Они оказались жизнеспособными и фертильными, и после достижения необходимого размера при содержании в культуре проявили способность к возвратному скрещиванию.

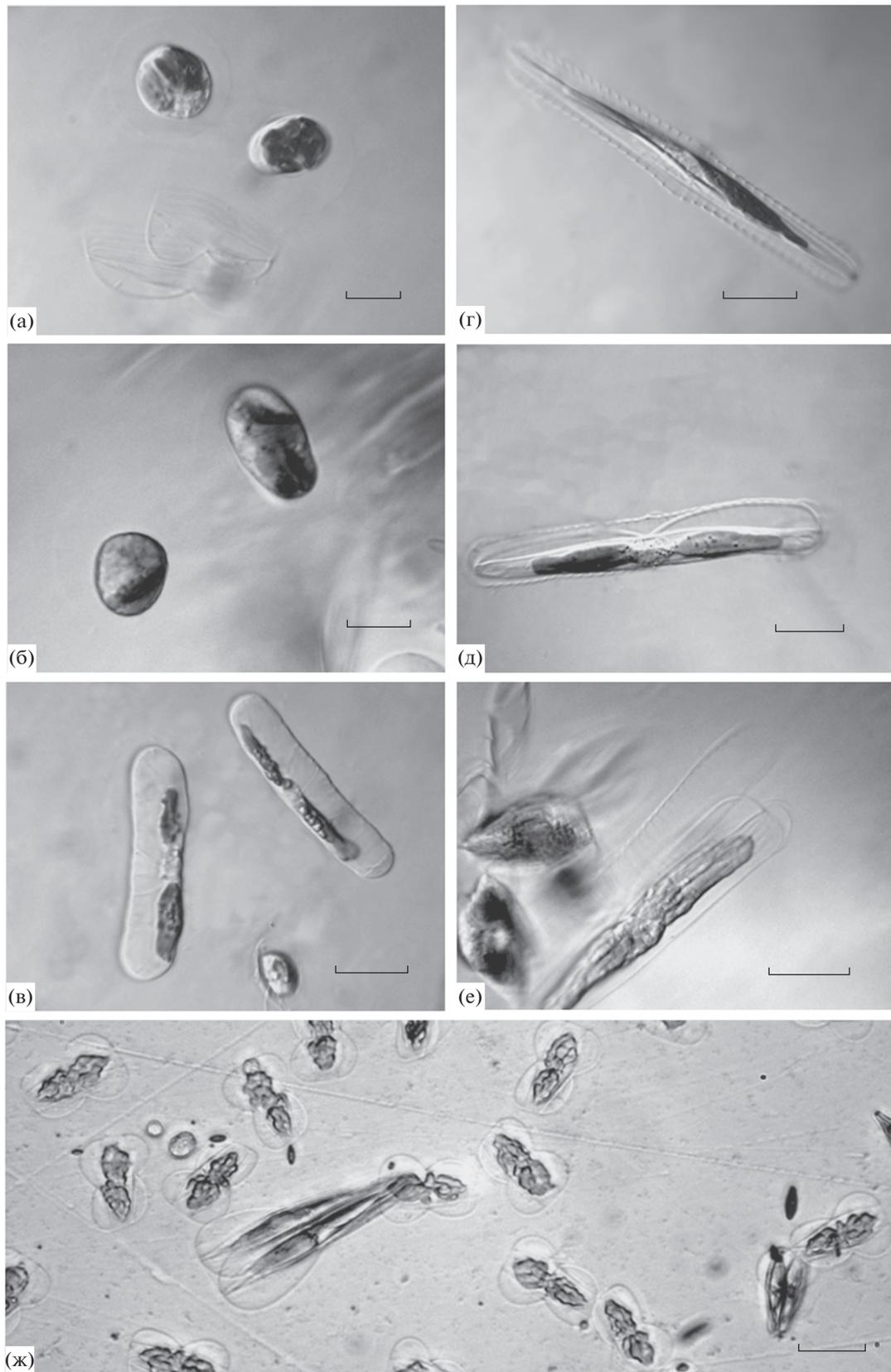


Рис. 5. Стадии формирования аукоспоры у *Entomoneis cf. paludosa*. а, б — образовавшиеся зиготы содержат два хлоропласта и начинают удлиняться; в — аукоспоры; г, д — внутри перизонима откладываются створки инициальной клетки; е — пустой перизоний и вышедшая из него инициальная клетка; ж — инициальные клетки по длине сильно отличаются от окружающих родительских клеток. Шкала 40 мкм.

Таблица 2. Гетероталлическое воспроизведение черноморских клонов пеннатной диатомовой водоросли *Entomoneis* cf. *paludosa*

Клоны	Место отбора проб	Происхождение клонов	Тип спаривания	Клоны												
				7.0525-A	7.0525-B	7.0525-C	7.0601-A	7.0601-B	7.0601-C	7.0601-D	7.0906-D	8.0727-A	8.0727-B	8.0228-A	8.0228-B	
7.0525-A	Крым	w	mt1													
7.0525-B	Крым	w	mt2	3												
7.0525-C	Крым	w	mt1	0	3											
7.0601-A	Крым	w	mt1	0	3	0										
7.0601-B	Крым	w	mt2	2	0	3	2									
7.0601-C	Крым	w	mt2	2	0	3	3	0								
7.0601-D	Крым	w	mt2	3	0	3	2	0	0							
7.0906-D	Турция	w	mt2	3	0	3	3	0	0	0						
8.0727-A	Крым	w	mt2	2	0	3	—	—	—	—	0					
8.0727-B	Крым	w	mt1	0	—	0	—	—	2	—	3	—				
8.0228-A		F1	mt1	0	2	0	0	—	3	—	3	—	—			
8.0228-B		F1	mt1	0	3	0	0	—	2	—	3	—	—	—		

Примечание. Бальная шкала обильности воспроизведения: 0 — случаи полового размножения не отмечены; 1 — наблюдаются единичные случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования (не отмечены); 2 — случаи гаметогенеза/ауксоспорообразования встречаются часто, но их нельзя назвать массовыми; 3 — наблюдается массовое ауксоспорообразование; "—" — клоны не проверяли на наличие полового воспроизводства; w — клоны, выделенные из природной популяции; F1 — потомки первого поколения; mt1 и mt2 — условные типы спаривания; клоны 8.0228-A и 8.0228-B — потомки от скрещивания клонов из разных популяций (7.0525-A и 7.0906-D).

ОБСУЖДЕНИЕ

В диатомологии установление видовой принадлежности зачастую представляет собой довольно сложную задачу ввиду ограниченного набора критериев, наличия видовых комплексов и внутривидового варьирования. Исследователи указывают видовую принадлежность, опираясь, как правило, на собственный опыт, а также на имеющиеся в литературе описания и иллюстрации. В большинстве случаев типовое описание вида само по себе не является достаточным для верной идентификации. Вид *Entomoneis paludosa* отмечен во многих районах Мирового океана, иногда значительно удаленных. Места обитания популяций различаются по экологическим характеристикам. Основанная на едином подходе верификация принадлежности всех отмеченных представителей к виду *E. paludosa* не проводилась. Вместе с тем, как показано выше, при сравнении популяций и типового материала (Dalu et al., 2015) могут быть обнаружены определенные морфологические различия.

Сопоставление генетических последовательностей также не дает ответа на вопрос о видовой принадлежности исследуемых клонов. Выделенные нами клоны принадлежат одному кластеру с высокой поддержкой. Эта клада оказалась родственной для *Entomoneis* sp. из Красного моря (штамм SA18 Ento-B1, инвентарный номер GenBank: MN064089.1). Однако другие ранее исследованные клоны *E. paludosa* не объединяются в

единый кластер, а представлены в разных частях построенного филогенетического дерева (см. рис. 2).

Впервые образование ауксоспор у представителя рода *Entomoneis* отмечено в конце XIX века (Karsten, 1899). В соответствии со своей классификацией Карстен отнес половой процесс у *Amphiprora alata* (= *E. alata*) к типу II: в размножении участвуют две материнские клетки, при этом образуются четыре гаметы и две ауксоспоры. К такому же типу Карстен относил половое воспроизведение у *Achnanthes longipes* C. Agardh, *Amphora cymbelloides* Grunow, *Nitzschia hybrida* Grunow и у ряда других диатомей (Karsten, 1899). По системе Карстена половой процесс, характерный для *E. paludosa*, также можно отнести к типу II. Согласно современным представлениям, воспроизведение, при котором в разных гаметах образуются одинаковые по морфологии и поведению гаметы, называется изогамией (Mann, 1993) и можно отнести к категории IC в системе Гейтлера (Geitler, 1973). Такой тип полового процесса ранее описан, например, у *Nitzschia reversa* W. Smith sensu Krammer & Lange-Bertalot (Mann, 1993), *Achnanthes longipes* (Chepurnov, Mann, 1997), *Navicula protracta* Grunow (Mann, 1988) и у ряда других видов шовных диатомей.

Клетки *E. cf. paludosa* приобретают способность воспроизводиться половым путем при апикальной длине 64 мкм, что составляет 50% от максимального видоспецифического размера (128 мкм) и соответствует тенденции, характерной для большинства пеннатных диатомей (Davi-

dovich, 2001). Для сравнения, у бесшовной *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère этот показатель составляет около 40% от максимального видоспецифического размера (Podunay et al., 2014), у шовных *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget и *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle – соответственно 54% (Davidovich et al., 2012) и 63% (Bates, Davidovich, 2002).

Гаметы, продуцируемые как женскими, так и мужскими клонами *E. cf. paludosa*, изогамны морфологически (имеют сферическую форму) и поведенчески (не проявляют способности к движению). Полная изогамия характерна также для *Amphora arcus* Gregory (Mann, 1994; Sabbe et al., 2004), *Achnanthes longipes* (Chepurnov, Mann, 1997) и *Haslea ostrearia* (Bory) Simonsen (Davidovich et al., 2009). У представителей рода *Nitzschia* встречается полная изогамия, как, например, у *N. reversa* (Mann, 1993), поведенческая анизогамия при морфологической изогамии, как у *N. recta* Hantzsch ex Rabenh (Mann, 1986), а также сочетание морфологической и поведенческой анизогамии, как у *N. longissima* (Brébisson ex Kützing) Grunow (Davidovich et al., 2006). У планктонных *P. multiseriis* и *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle отмечена морфологическая изогамия, однако подвижность гамет, относящихся к клонам разных полов, была разной, что указывает на поведенческую анизогамию (Davidovich, Bates, 1998).

В связи с полной изогамией и неподвижностью гамет, а также из-за специфической формы створки, которая не позволяет гаметангиям приблизиться друг к другу вплотную, у *E. cf. paludosa* возникает проблема доставки гамет к месту сингамии. У гамет *E. cf. paludosa* не отмечено образования псевдоподиальных выростов, характерных для некоторых бесшовных диатомей, таких как *Tabularia fasciculata* (C. Agardh) D.M. Williams & Round, *T. tabulata* (C. Agardh) Snoeijs (Davidovich et al., 2012), *Pseudostaurosira trainorii* E.A. Morales (Sato et al., 2011) и *Ulnaria ulna* (см.: Podunay et al., 2014). Гаметы этой водоросли не обладают амёбидным движением, при котором активная пара гамет движется к пассивной, как, например, у представителей *Pseudo-nitzschia* (Davidovich, Bates, 1998).

Для облегчения копуляции гаметы *E. cf. paludosa* после выхода из гаметангиев увеличиваются в размерах в 1.5 раза. Увеличение размера гамет как фактор, способствующий облегчению сингамии, описан у *Schizostauron* Grunow (Davidovich et al., 2017). Вторым механизмом, обеспечивающим сингамию у *E. cf. paludosa*, является сбор гаметангиев в подвижные группы. Поступательное движение клеток группы и их обороты вокруг своей оси облегчают сближение и слияние гамет.

Гаметангии *E. cf. paludosa*, как и гаметангии *Haslea ostrearia* (Davidovich et al., 2009), *Navicula*

directa var. *directa* (W. Smith) Ralf in Pritchard (Mizuno, 2000) и ряда других диатомей, при копуляции не образуют заметной слизистой оболочки в отличие, например, от *A. arcus*, вокруг гаметангиальной пары которой видна хорошо развитая слизистая оболочка (Mann, 1994).

Ауксоспоры *E. cf. paludosa* имеют перизониум с хорошо различимыми в световом микроскопе поперечными полосами. Внутри полностью сформировавшегося перизониума откладывается инициальная клетка, створки которой уже имеют характерную для вегетативной клетки форму. Хорошо видимый перизониум формируют многие представители пеннатных диатомей, в том числе каналшовные *Pseudo-nitzschia* (Davidovich, Bates, 1998) и *Nitzschia* (Mann, 1986; Davidovich et al., 2006).

Система скрещивания *E. cf. paludosa* гетероталлическая, ни в одном из исследованных клонов не отмечено случаев гомоталлического воспроизведения. Гетероталлизм характерен для многих диатомей, как шовных, например, *Pinnularia cf. gibba* (Pouličková et al., 2007), так и бесшовных, например, *U. acus* (Kützing) M. Aboal (Подунай и др., 2018). У некоторых видов (*A. longipes*, *N. longissima* и др.) наряду с гетеро- может происходить и гомоталлический половой процесс (Chepurnov, Mann, 1997; Davidovich et al., 2006).

Таким образом, получены данные о половом воспроизведении и жизненном цикле представителя рода *Entomoneis*, важные не только для установления видовых границ с использованием биологического критерия вида, но и для успешного его культивирования и использования в биотехнологии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания КНС–ПЗ РАН филиала ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”, номер гос. регистрации АААА-А19-119012490045-0; отбор проб на турецком побережье поддержан Программой обмена “TR-YÖK-Proje Tabanlı Değişim Programı” (грант № MEV-2016-46).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Подунай Ю.А., Давидович Н.А., Куликовский М.С., Гусев Е.С. Особенности полового воспроизведения и система скрещивания *Ulnaria acus* (Bacillariophyta) // Журн. Сиб. фед. ун-та. Биология. 2018. С. 1–13.
- Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // Мор. биол. журн. 2018. Т. 3. № 2. С. 73–80.
- Федин Л.А., Барский И.Я. Микрофотография. Л.: Наука. 1971. 220 с.
- Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. Recipes for freshwater and seawater media // Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 2005. P. 429–538.
- Andersen R.A., Kawachi M. Traditional microalgae isolation techniques // Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. 2005. P. 83–100.
- Bates S.S., Davidovich N.A. Factors affecting the sexual reproduction of diatoms, with emphasis on *Pseudo-nitzschia* spp. // LIFEHAV: Life histories of microalgal species causing harmful blooms. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2002. P. 31–36. (Research in Enclosed Seas Series; № 12. Eur 20361).
- Chepurnov V.A., Mann D.G. Variation in the sexual behaviour of natural clones of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta) // Eur. J. Phycol. 1997. V. 32. № 2. P. 147–154.
- Clavero E., Grimalt J.O., Hernández–Mariné M. *Entomoneis vertebralis* sp. nov. (Bacillariophyceae); a new species from hypersaline environments // Cryptogam.: Algol. 1999. V. 20. P. 223–234.
- Dalu T., Taylor J.C., Richoux N.B., Froneman W. A re-examination of the type material of *Entomoneis paludosa* (W. Smith) Reimer and its morphology and distribution in African waters // Fottea. 2015. V. 15. P. 11–25.
- Davidovich N.A. Species specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms // Proc. 16th Int. Diatom Symp. (25 Aug.–1 Sept. 2000). Athens: University of Athens. 2001. P. 191–196.
- Davidovich N.A., Bates S.S. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pseudo-delicatissima* (Bacillariophyceae) // J. Phycol. 1998. V. 34. № 1. P. 126–137.
- Davidovich N.A., Davidovich O.I., Witkowski A. et al. Sexual reproduction in *Schizostauron* (Bacillariophyta) and a preliminary phylogeny of the genus // Phycologia. 2017. V. 56. № 1. P. 77–93.
- Davidovich N.A., Kaczmarek I., Ehrman J.M. The sexual structure of a natural population of the diatom *Nitzschia longissima* (Bréb.) Ralfs // Proc. 18th Int. Diatom Symp. (Miedzyzdroje, Poland. 2–7 September, 2004). Bristol: Biopress Ltd. 2006. P. 27–40.
- Davidovich N.A., Kaczmarek I., Karpov S.A. et al. Mechanism of male gamete motility in araphid pennate diatoms from the genus *Tabularia* (Bacillariophyta) // Protist. 2012. V. 163. № 3. P. 480–494.
- Davidovich N.A., Mouget J.-L., Gaudin P. Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta) // Eur. J. Phycol. 2009. V. 44. № 2. P. 251–261.
- Edlund M.B., Stoermer E.F. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories // J. Phycol. 1997. V. 33. P. 897–918.
- Ehrenberg C.G. Neue Untersuchungen über das kleinste Leben als geologisches Moment. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 1845a. P. 53–88.
- Ehrenberg C.G. Vorläufige zweite Mittheilung über die weitere Erkenntnifs der Beziehungen des kleinsten organischen Lebens zu den vulkanischen Massen der Erde. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 1845b. P. 133–157.
- Geitler L. Auxosporenbildung und Systematik bei pennaten Diatomeen und die Cytologie von Cocconeis-Sippen // Österr. Bot. Z. 1973. V. 122. P. 299–321.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication. Nat. Univ. Ireland. Galway. 2020. <http://www.algaebase.org>; searched on 28 May 2020.
- Jauffrais Th., Agogue H., Gemin M. et al. Effect of bacteria on growth and biochemical composition of two benthic diatoms *Halamphora coffeaeformis* and *Entomoneis paludosa* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2017. V. 495. P. 65–74.
- Karsten G. Die Diatomeen der Kieler Bucht // Wiss. Meeresunters. (Kiel). New Ser. 1899. V. 4. P. 17–205.
- Kudryavtseva V.A., Belevich T.A., Zhitina L.S. Diatoms in the ice of Velikaya Salma strait, the White Sea, before the spring algal bloom // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. V. 72. № 2. P. 52–58.
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Lange-Bertalot H., Witkowski A., Kulikovskiy M. et al. Taxonomy, frustular morphology and systematics of *Platichthys*, a new genus of canal raphe bearing diatoms within the Entomoneidaceae // Phytotaxa. 2015. V. 236. № 2. P. 135–149.
- Liu B., Williams D.M., Ector L. *Entomoneis triundulata* sp. nov. (Bacillariophyta), a new freshwater diatom species from Dongting Lake, China // Cryptogam.: Algol. 2018. V. 39. № 2. P. 239–253.
- Mann D.G. Methods of sexual reproduction in *Nitzschia*: systematic and evolutionary implications. (Notes for a monograph of the Bacillariaceae) // Diatom Res. 1986. V. 1. № 2. P. 193–203.
- Mann D.G. Sexual reproduction and systematics of *Navicula protracta* // Diatom Res. 1988. V. 3. № 2. P. 227–236.
- Mann D.G. Patterns of sexual reproduction in diatoms // Hydrobiologia. 1993. V. 269/270. P. 11–20.
- Mann D.G. The systematics of amphoroid diatoms: the life history of *Amphora arcus* // Nova Hedwigia. 1994. V. 58. № 3–4. P. 335–352.
- Mann D.G. Size and sex // The diatom world. Dordrecht: Springer. 2011. P. 145–166. (Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology; V. 19. Part 2).
- Mejdandžić M., Bosak S., Orlić S. et al. *Entomoneis tenera* sp. nov., a new marine planktonic diatom (Entomoneidaceae, Bacillariophyta) from the Adriatic Sea // Phytotaxa. 2017. V. 292. P. 1–18.

- Mizuno M. Sexual auxosporulation of the marine diatom *Navicula directa* var. *directa* // *Phycol. Res.* 2000. V. 48. P. 103–106.
- Nguyen-Deroche T.L.N., Caruso A., Trung Le T. et al. Zinc affects differently growth, photosynthesis, antioxidant enzyme activities and phytochelatin synthase expression of four marine diatoms // *Sci. World J.* 2012. V. 2012. Artic. ID 982957.
- Paillès C., Blanc-Valleron M.M., Poulin M. et al. *Entomoneis calixasini* sp. nov., a new fossil diatom from the Turkish Marmara Sea sediments // *Diatom Res.* 2014. V. 29. P. 411–422.
- Podunay Yu.A., Davidovich O.I., Davidovich N.A. Mating system and two types of gametogenesis in the fresh water diatom *Ulnaria ulna* (Bacillariophyta) // *Algologia.* 2014. V. 24. № 1. P. 3–19.
- Pouličková A., Mayama S., Chepurnov V.A., Mann D.G. Heterothallic auxosporulation, incunabula and perizonium in *Pinnularia* (Bacillariophyceae) // *Eur. J. Phycol.* 2007. V. 42. № 4. P. 367–390.
- Poulin M., Daugbjerg N., Gradinger R. et al. The pan-Arctic biodiversity of marine pelagic and sea-ice unicellular eukaryotes: a first-attempt assessment // *Mar. Biodiversity.* 2011. V. 41. P. 13–28.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 1990. 747 p.
- Sabbe K., Chepurnov V.A., Mann D.G., Vyverman W. Sexual behaviour, auxosporulation and chloroplast dynamics in a marine *Amphora* (Bacillariophyceae) studied in culture // *Bot. Mar.* 2004. V. 47. № 1. P. 53–63.
- Sato S., Beakes G., Idei M. et al. Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. e26923.
- Smith W. Synopsis of British Diatomaceae. London: John Van Voorst. 1853. 89 p.

Sexual Reproduction and Life Cycle of the Pennate Diatom *Entomoneis* cf. *paludosa* (W. Smith) Reimer (Bacillariophyta)

Yu. A. Podunay^a, N. A. Davidovich^{a, b}, O. I. Davidovich^a, A. Witkowski^b,
R. Gastineau^b, and C. N. Solak^c

^aT.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS – Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Feodosia 298188, Russia

^bInstitute of Marine and Environmental Sciences, University of Szczecin, Szczecin 70-383, Poland

^cDumlupınar University, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya 43100, Turkey

The sexual reproduction and life cycle of the marine pennate diatom *Entomoneis* cf. *paludosa* have been described for the first time. The sexual process has been found to involve two gametangia, each producing two gametes. This species is characterized by morphological and behavioral isogamy. Its mating system includes the heterothallic mode of reproduction, with no cases of homothallic reproduction recorded. The type of sexual process is close to the category IC in the Geitler's system.

Keywords: diatoms, sexual reproduction, life cycle, gamete, auxospore, zygote, *Entomoneis paludosa*