

УДК [582.261.1-11:551.311.8](292.471)

БИОЛОГИЯ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *NITZSCHIA CF. THERMALOIDES*, НАСЕЛЯЮЩЕЙ ГРЯЗЕВЫЕ ВУЛКАНЫ КРЫМА

© 2023 г. Н. А. Давидович, О. И. Давидович, Ю. А. Подунай

Карадагская научная станция имени Т. И. Вяземского — природный заповедник РАН —
филиал ФИЦ ИнБЮМ, Феодосия, Российская Федерация
E-mail: nickolaid@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.01.2021; после доработки 17.02.2021;
принята к публикации 16.02.2023; опубликована онлайн 31.05.2023.

В биологии актуально изучение способности организмов к существованию в экстремальных условиях, к которым особенно чувствительна фаза жизненного цикла, связанная с половым размножением и возможностью оставить следующее поколение. В пробах, которые были взяты из луж и озёр, образующихся в местах действия грязевых вулканов Булганакского сопочного поля (Керченский полуостров, Крым), обнаружена в большом количестве *Nitzschia cf. thermaloides* Hustedt. Из проб микропипеточным способом выделены и введены в культуру отдельные клоны, скрещивание которых позволило инициировать гетероталлическое половое воспроизведение. Целью работы было изучить биологию воспроизведения и жизненный цикл водоросли из биотопа с экстремально высокими уровнями освещённости, температуры и солёности. Впервые для данного вида приведено описание полового процесса, соответствующего типу IB2a по классификации Гайтлера. Определены кардинальные пункты — критические размеры клеток, обуславливающие переход из одной фазы жизненного цикла в другую. Приведён полный диапазон размеров клеток — от инициальных, появившихся в результате полового воспроизведения, до самых маленьких, наблюдавшихся при содержании в культуре. Рассмотрены основные положения теории жизненного цикла диатомовых водорослей, позволяющие выполнить анализ их природной популяции. Установлено, что популяция *N. cf. thermaloides* существует в месте отбора проб длительное время и представлена клетками, находящимися во всех фазах жизненного цикла.

Ключевые слова: диатомовые, *Nitzschia cf. thermaloides*, грязевые вулканы, половое воспроизведение, жизненный цикл

Диатомовые водоросли известны не только своим большим видовым разнообразием, но и значительной эволюционной пластичностью, позволившей им приспособиться к существованию на дне и в толще морских и пресных водоёмов, в почвах, на влажных поверхностях. Некоторые виды диатомей толерантны к экстремальным условиям температуры [Никулина, 2010], солёности [Неврова, Шадрин, 2005; Сеничева и др., 2008], высокой освещённости, включая ультрафиолет [Peletier et al., 1996], в отсутствие света способны к миксотрофному питанию [Абдуллин, Багмет, 2016]. В пробах воды, вытекшей из грязевых вулканов Булганакского сопочного поля (Керченский полуостров, Крым), было обнаружено 15 видов микроводорослей, среди них 6 относящихся к отделу Bacillariophyta, в том числе *Nitzschia cf. thermaloides* Hustedt, 1955 [Рябушко, Бондаренко, 2020]. В связи с указанной находкой возник ряд вопросов, которые касаются

фундаментальных аспектов биологии этих видов, обитающих в уникальных условиях температуры, солёности и инсоляции. Прежде всего нас интересовали биология воспроизведения диатомей и их отношение к экстремальным условиям. Какова продолжительность существования популяций, обнаруженных в грязевых вулканах? Каковы темпы деления диатомовых в данных биотопах? Способны ли виды в этих условиях возобновляться в поколениях, проходя все этапы жизненного цикла, включая процесс полового воспроизведения? Поставленные вопросы определили цель настоящей работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследования выделены из проб, которые были отобраны 15 октября 2020 г. на Булганакском сопочном поле в точках с координатами, указанными в табл. 1.

Таблица 1. Точки отбора проб 15.10.2020 на Булганакском поле грязевых вулканов (Керченский полуостров, Крым) и солёность воды в пробах

Table 1. Sampling points in the Bulganak mud volcano field (Kerch Peninsula, Crimea), 15.10.2020; water salinity in the samples

Сопка	Координаты GPS		Солёность воды, ‰
	с. ш.	в. д.	
Андрусова	45°25'35.9"	36°28'38.9"	30, 35, 68
Павлова	45°25'33.0"	36°28'44.1"	18, 35, 56
Тищенко	45°25'33.3"	36°28'25.4"	20
Центральное озеро	45°25'23.7"	36°28'38.4"	19, 26

Обследовано четыре грязевых вулкана — грязевые сопки Андрусова (рис. 1А), Павлова (рис. 1В), Тищенко (рис. 1С) и Центральное озеро (рис. 1D). Булганакское сопочное поле относится к грязевулканическим образованиям с рассредоточенными центрами извержений (рис. 2), где на сравнительно небольшой территории расположены сопки и грифоны (локальные центры грязевулканической деятельности). При этом можно встретить сопки, незначительно возвышающиеся над окружающим ландшафтом, из которых выделяются газ и жидкий ил, растекающийся тонким слоем и образующий неглубокие лужи, и грязевые озёра меньшей или большей площади (например, вулканоид Центральное озеро). Второй морфотип вулканов — конусовидные холмы, выделяющие достаточно вязкую грязь, которая стекает по склонам (сопка Тищенко).

Рассолы грязевых вулканов относятся к гидрокарбонатно-натриевому типу (гидрокарбонатно-хлоридные натриевые или хлоридно-гидрокарбонатные натриевые), в них повышено содержание брома ($85\text{--}210\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) и йода ($23\text{--}45\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) [Матюнина, 2019]. Отмечено непостоянство химического состава рассолов грязевых вулканов: он может существенно изменяться даже в течение нескольких часов. Минерализация извергаемых рассолов не превышает $20\text{--}23\text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ [Каюкова, 2018; Куришко и др., 1968]. Однако следует указать, что в условиях высокой инсоляции и интенсивных ветров из-за испарения воды в вытекших рассолах локально зарегистрированы заметное повышение концентрации и осаждение солей. Минерализация может достигать $110\text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ [Куришко и др., 1968].

В лужах и грязевых озёрах диатомовые образуют плёнку обрастаний характерного бурозелёного цвета (рис. 1А). Плёнка обрастаний располагается как на поверхности жидкой фазы, так и на дне в тех местах, где толщина воды невелика, а основная часть взвеси оказывается осевшей. В зависимости от места нахождения площадь сплошного обрастания может составлять несколько квадратных дециметров и более.

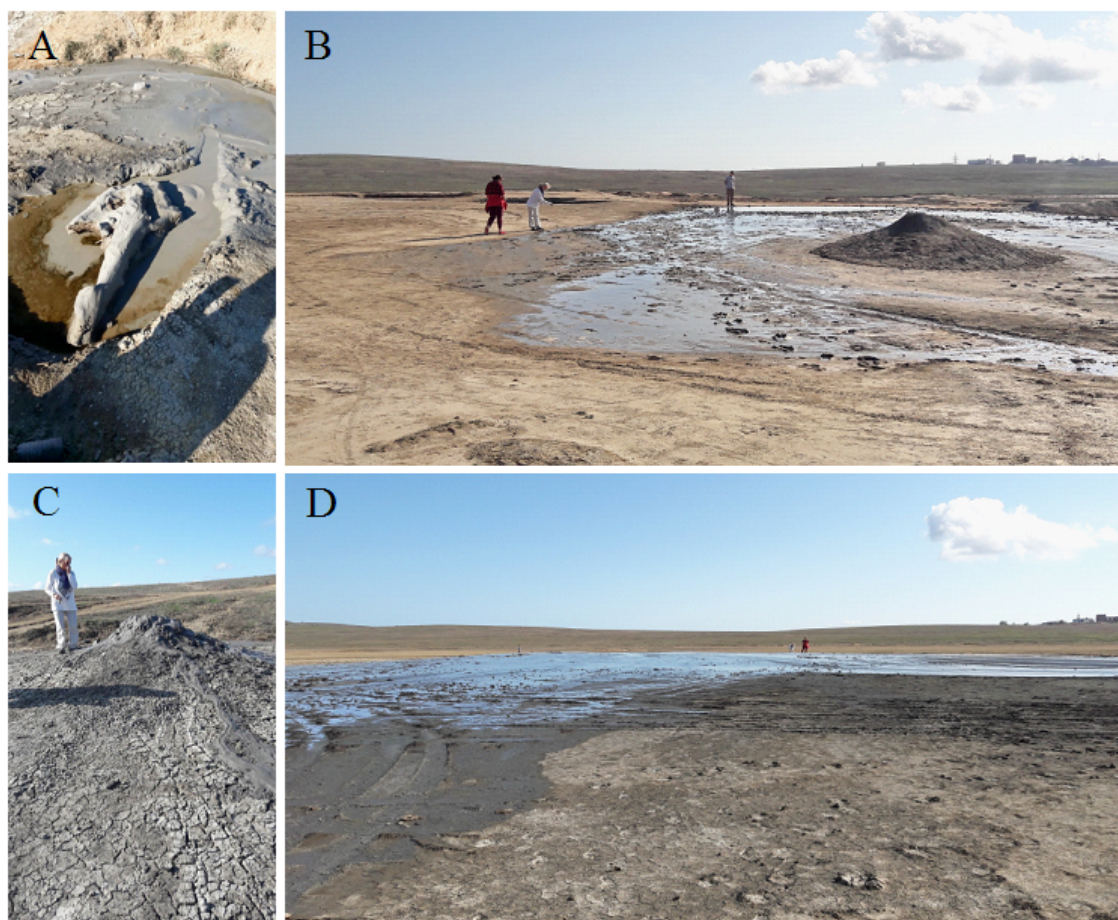


Рис. 1. Грязевые вулканы — сопки Андрусова (А), Павлова (В), Тищенко (С) и Центральное озеро (D) — Булганакского сопочного поля в период отбора проб (Керченский полуостров, Крым)

Fig. 1. The mud volcanoes – Andrusov (A), Pavlov (B), Tishchenko (C), and Central Lake (D) – of the Bulganak mud volcano field during the sampling period (Kerch Peninsula, Crimea)

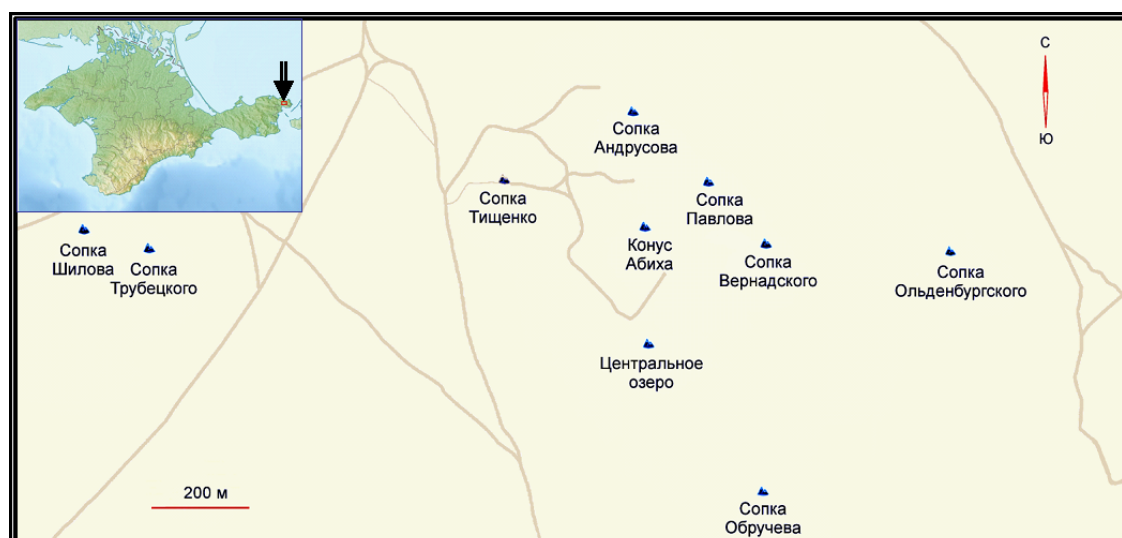


Рис. 2. Схема расположения грязевых вулканов Мало-Тарханского (слева) и Булганакского (справа) сопочных полей (Керченский полуостров, Крым)

Fig. 2. Location map of the mud volcanoes of the Malo-Tarkhan (left cluster) and the Bulganak (right cluster) mud volcano fields (Kerch Peninsula, Crimea)

Из проб, доставленных в лабораторию, используя инвертированные микроскопы Nib-100 (Китай) и «Альтами ИНВЕРТ 3» (Россия), микропипеточным способом выделили одиночные клетки *N. cf. thermaloides* (рис. 3), давшие начало 15 клоновым культурам. Культуры содержали в стеклянных колбах Эрленмейера объёмом 100 мл в модифицированной среде ESAW [Полякова и др., 2018], раз в 10–14 дней осуществляя пересевы в свежую среду. Условия содержания и порядок наименования клонов более подробно описаны в работе [Давидович и др., 2017]. Клоны содержали и скрещивали в стеклянных чашках Петри (диаметр — 40–50 мм) в среде с той же солёностью, при которой они находились во взятых пробах. Исходную солёность модифицированной среды ESAW (36 ‰) доводили до необходимого уровня, разбавляя её дистиллированной водой либо добавляя в неё хлорид натрия. Солёность измеряли рефрактометром RHS-10ATC (Китай). В пробах солёность заметно различалась в зависимости от точки отбора (см. табл. 1). Так, в трёх пробах грязи, вытекшей из вулканической сопки Андрусова, которые были взяты на площади менее 1 м², солёность составила 30, 35 и 68 ‰. Возможно, столь существенные различия обусловлены попавшими в пробу солями, откладывающимися на подстилающей поверхности в связи с испарением воды. В пробе, взятой непосредственно из жерла (вулкан Тищенко), солёность составила 20 ‰.

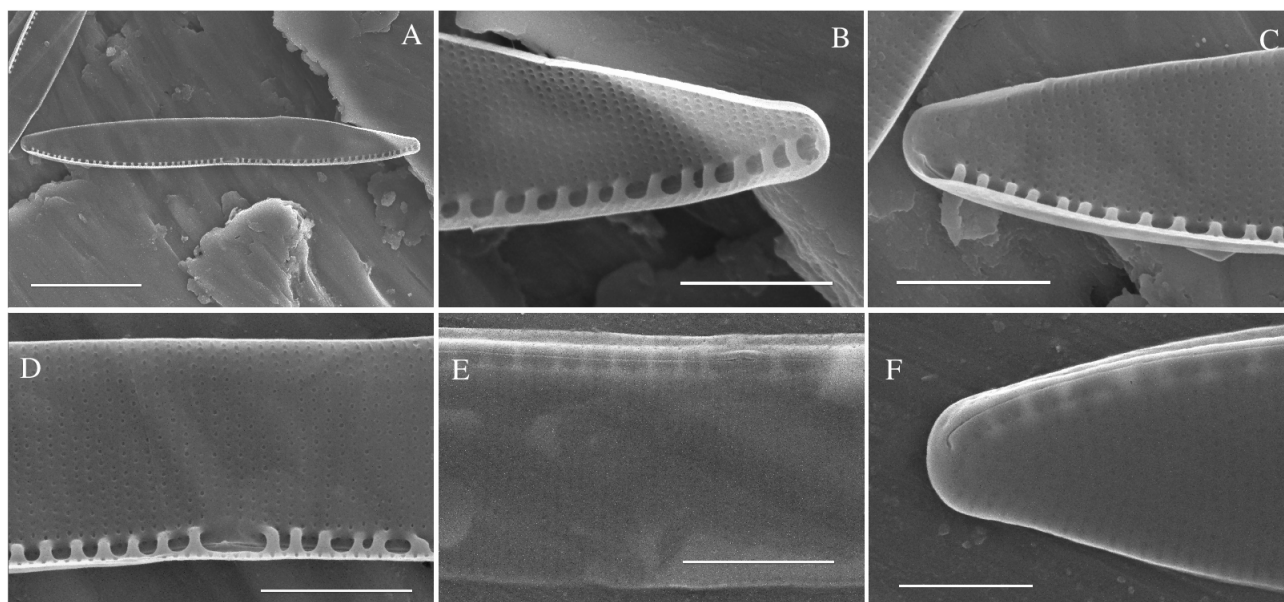


Рис. 3. *Nitzschia cf. thermaloides*, сканирующая электронная микроскопия. Вид створок изнутри (A–D) и снаружи (E–F). Масштабная линейка: A — 10 мкм; B–E — 3 мкм; F — 2 мкм

Fig. 3. *Nitzschia cf. thermaloides*, scanning electron microscopy. Internal (A–D) and external (E–F) valve view. Scale bar: A, 10 μm; B–E, 3 μm; F, 2 μm

Для электронной микроскопии панцири вываривали в перекиси водорода (35 %) и промывали (7–8 раз) дистиллированной водой; затем очищенные створки наносили на предметный столик и покрывали напылением золота. Микрофотографирование проведено с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония). Длину и ширину клеток измеряли с использованием откалиброванной окулярной линейки при непосредственном наблюдении под микроскопом либо с помощью цифровой камеры Moticam 1080 (Китай) и прилагаемого программного обеспечения. Статистическая обработка полученных данных выполнена в Microsoft Excel. Средние значения (M) представлены с указанием ошибки среднего (standard error, SE) и объёма выборки (N): $M \pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Впервые половое воспроизведение *N. cf. thermaloides* отмечено нами в пробах, залитых питательной средой, ещё до выделения отдельных клонов. Найдены и измерены 17 инициальных клеток, средний апикальный размер которых оказался равным ($68,7 \pm 0,5$) мкм (максимум — 71,0 мкм). Длина лежащих рядом с ними створок пустых раскрывшихся панцирей родительских клеток составила в среднем ($37,4 \pm 0,7$) мкм ($N = 14$; максимум — 40 мкм). Уже по этим предварительным данным можно было заключить, что в процессе полового воспроизведения зарегистрировано двукратное увеличение размера, а длина клеток немногим более 70 мкм, очевидно, близка к максимальной видоспецифической. Последующие измерения клеток (не только из природной популяции, но и полученных в ходе скрещивания выделенных клонов) позволили на значительно большей выборке уточнить размеры, определяющие фазы жизненного цикла *N. cf. thermaloides* (табл. 2).

Таблица 2. Апикальный размер вегетативных, гаметангиальных и инициальных клеток *Nitzschia cf. thermaloides*

Table 2. The apical size of *Nitzschia cf. thermaloides* vegetative, gametangial, and initial cells

Клетки	Объём выборки (N)	Длина клеток, мкм	
		min	max
Вегетативные	1190	15	84
Гаметангиальные	103	33	43
Инициальные	202	56	84

По результатам измерения клеток из природной популяции ($N = 502$) установлено, что их длина варьировала от 15 до 74 мкм. Гистограмма распределения размеров клеток по частоте встречаемости в природной популяции представлена на рис. 4. При скрещивании выделенных клонов получены инициальные клетки, максимальный размер которых составил 84 мкм. Наибольшие гаметангиальные клетки имели длину 43 мкм (52 % максимального размера); это граница перехода из дорепродуктивной в репродуктивную фазу жизненного цикла.

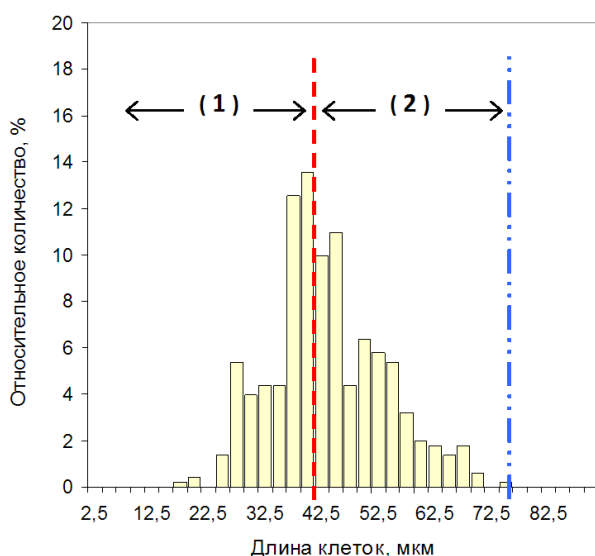


Рис. 4. Распределение длины клеток *Nitzschia cf. thermaloides* ($N = 502$) по частоте встречаемости в природной популяции грязевых вулканов Булганакского сопочного поля. Штрихпунктирная линия определяет максимальный видоспецифический размер. Клетки, размер которых меньше критической границы (штриховая линия), находятся в репродуктивной фазе (1) и представляют собой эффективную долю популяции. Более крупные клетки, размер которых попадает в диапазон между штриховой и штрихпунктирной линиями, находятся в дорепродуктивной фазе жизненного цикла (2)

Fig. 4. Distribution of *Nitzschia cf. thermaloides* cell length ($N = 502$) by frequency of occurrence in the natural population of the mud volcanoes of the Bulganak mud volcano field. The dash-dotted line defines the maximum species-specific size. Cells smaller than the critical limit (a dashed line) are in the reproductive phase (1) and represent the effective fraction of the population. Larger cells, the size of which is between a dashed and a dash-dotted line, are in the pre-reproductive phase of the life cycle (2)

Зарегистрирована прямая корреляция между длиной родительских и дочерних клеток (рис. 5). После выделения клоны в парных сочетаниях были проверены на предмет скрещиваемости/нескрещиваемости. Случайно выделенные из проб 15 клонов оказались репродуктивно совместимыми строго в соответствии со своими типами спаривания. Для выборки из 10 клонов представлена таблица скрещиваний (табл. 3). Клоны распределились по типам спаривания неравномерно, в соотношении 4 : 11.

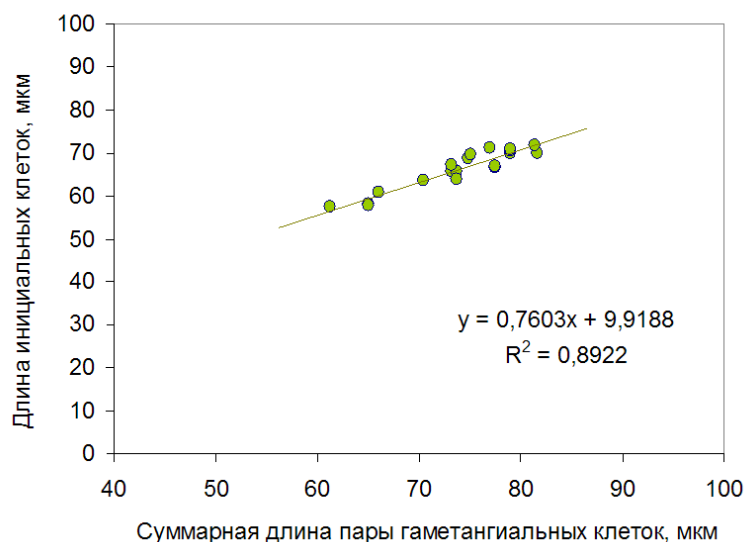


Рис. 5. Зависимость длины инициальных клеток от длины гаметангиальных клеток у *Nitzschia cf. thermaloides* ($N = 18$)

Fig. 5. Dependence of the initial cell length on the gametangial cell length in *Nitzschia cf. thermaloides* ($N = 18$)

Половому процессу у *N. cf. thermaloides* предшествует объединение родительских клеток в пары (рис. 6А), формирование которых можно было наблюдать на вторые сутки после того, как были сделаны смешанные посева. Клетки в парах располагались более или менее параллельно друг другу, показывая устойчивую связь. При этом никакой слизи клетки не выделяли, слизистые капсулы не образовывали. Гаметогенез в родительских клетках (клетках-гаметангиях) обычно начинался на третьи сутки (по завершении полного светотемнового периода) в утренние часы и протекал в парах почти одновременно, но не синхронно. Вначале протопласт клетки сжимался вдоль апикальной оси (рис. 6В). В каждой гаметангиальной клетке в результате трансапикального деления содержимого формировалось по две одинаковых гаметы (рис. 6С). Гаметы слегка увеличивались в размерах, что в большей мере характерно для гамет, сформировавшихся первыми (рис. 6D). По окончании формирования гаметы попарно сливались без какой-либо очерёдности (рис. 6Е, F); в результате образовывались две зиготы. Зиготы начинали биполярный рост, вытягиваясь параллельно апикальной оси створок гаметангиев (рис. 6G). Клетки с этого момента следует называть ауксоспорами (рис. 6H). Растущие ауксоспоры обычно располагались бок о бок более или менее параллельно друг другу и створкам родительских клеток; изредка ауксоспоры выстраивались вдоль одной оси (рис. 6I). Встречались гаметангиальные пары, у которых отсутствовала упорядоченность в ориентации ауксоспор и створок родительских клеток, например вследствие деформации перизониума, обеспечивающего биполярную направленность роста ауксоспор (рис. 6J).

Таблица 3. Таблица скрещиваний (демонстрирует репродуктивную совместимость клонов *Nitzschia cf. thermaloides*, выделенных из грязевых вулканов)

Table 3. Cross-mating table (shows reproductive compatibility of *Nitzschia cf. thermaloides* clones isolated from the mud volcanoes)

Грязевой вулкан	Клон	0.1026-YB	0.1026-YD	0.1020-OA	0.1020-OC	0.1029-YE	0.1029-YF	0.1029-YG	0.1025-YA	0.1020-OE	0.1020-OF
		mt	mt1	mt2	mt1	mt2	mt2	mt2	mt2	mt1	mt2
Андрусова	0.1026-YB	mt1									
Андрусова	0.1026-YD	mt2	3								
Павлова	0.1020-OA	mt1	0	2							
Павлова	0.1020-OC	mt2	2	0	3						
Павлова	0.1029-YE	mt2	3	0	3	0					
Павлова	0.1029-YF	mt2	2	0	–	0	0				
Павлова	0.1029-YG	mt2	3	0	3	0	0	0			
Центральное озеро	0.1025-YA	mt1	0	2	0	2	3	3	3		
Центральное озеро	0.1020-OE	mt2	3	3	3	0	0	0	0	3	
Центральное озеро	0.1020-OF	mt2	2	3	3	0	0	0	0	2	0

Примечание: mt — тип спаривания (mating type); типы спаривания (mt1 и mt2) выделены условно и для удобства восприятия обозначены синим и красным цветом соответственно. В таблице представлены максимальные значения балльной оценки интенсивности аукоспоробразования, полученные в результате 3–5-кратно повторённых экспериментов: 0 — аукоспор не наблюдалось; 1 — единично; 2 — не единично; 3 — массово. Прочерк — нет данных.

Note: mt, mating type; mating types (mt1 and mt2) are distinguished conventionally and marked in blue and red, respectively, for ease of perception. The table shows the maximum scores for the intensity of auxospore formation, obtained as a result of 3–5 times repeated experiments: 0, no auxospores were observed; 1, single auxospores; 2, non-abundant auxospores; 3, mass auxosporulation. Dash indicates lack of data.

При достаточной продолжительности светового периода (октябрь — ноябрь) в этот же день можно было встретить аукоспоры, которые успевали дорасти до максимальных размеров; внутри них начинали откладываться створки инициальных клеток (рис. 6К) — сначала эпитека, а затем, после ацитокинетического митоза, гипотека. Процесс аукоспоробразования продолжался и на четвёртые сутки. Поскольку инициальные клетки переходили к митотическому делению, в смешанных посевах можно было обнаружить как инициальные клетки, недавно покинувшие перизониум (рис. 6L), так и мало отличающиеся от них морфологически первые постинициальные клетки (рис. 6M).

Надо отметить, что сингамия не всегда протекала успешно; иногда сливалась только одна пара гамет, поэтому у некоторых гаметангиальных пар формировалась лишь одна зигота и, соответственно, одна аукоспора. К тому же результату приводило абортное развитие одной из аукоспор. Иногда ни одна пара гамет не могла достичь сингамии, даже в тех редких случаях, когда гаметангиальные клетки образовывали не пары, а триплеты. Однако в целом процесс аукоспоробразования протекал интенсивно; в смешанных посевах можно было наблюдать значительное количество крупных клеток новой генерации.

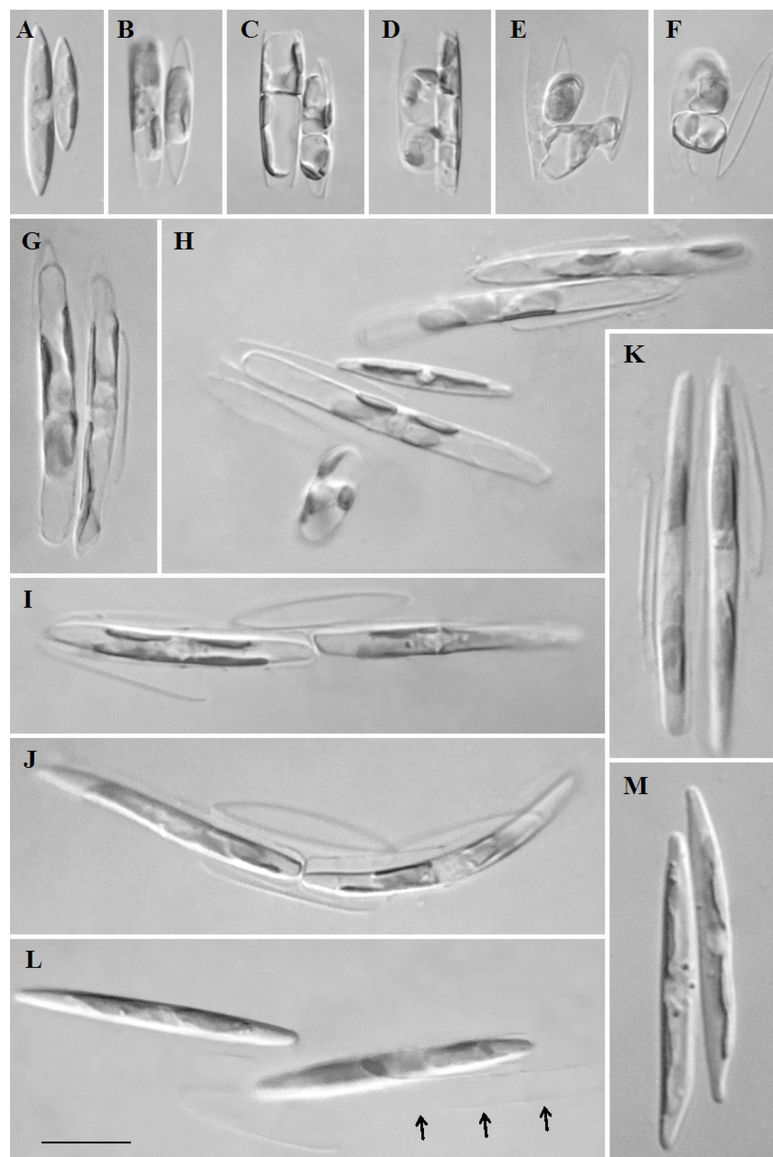


Рис. 6. Процесс полового воспроизведения у *Nitzschia cf. thermaloides*: А — формирование пар гаметангиальных клеток; В — начало формирования гамет, протопласт сжимается вдоль апикальной оси; С — в результате трансапикального деления образуются две одинаковые гаметы; D — гаметы слегка увеличиваются в диаметре; Е, F — гаметы попарно сливаются без какой-либо очерёдности; G — биполярно растущие аукоспоры; H — обычное расположение аукоспор, бок о бок параллельно друг другу и створкам гаметангиев; I — изредка аукоспоры располагаются вдоль одной оси; J — нарушения в развитии ведут к неупорядоченной ориентации аукоспор и створок родительских клеток; K — внутри полностью сформировавшихся аукоспор, достигших размера, близкого к максимальному видоспецифическому, начинают откладываться створки инициальных клеток (вначале эпитека, затем гипотека); L — инициальные клетки, недавно покинувшие перизониум (обозначен стрелками); M — инициальные клетки переходят к нормальным митотическим делениям, давая начало клонам новой генерации. Масштабная линейка: 20 мкм

Fig. 6. The process of *Nitzschia cf. thermaloides* sexual reproduction: A, formation of pairs of gametangial cells; B, the beginning of gamete formation, the protoplast contracts along the apical axis; C, as a result of transapical division, two identical gametes are formed; D, gametes slightly increase in diameter; E, F, gametes fuse in pairs without any order; G, bipolar-growing auxospores; H, usual arrangement of auxospores – side by side and parallel to each other and to the valves of gametangia; I, occasionally, auxospores are located along one axis; J, developmental disorders result in disordered orientation of auxospores and valves of parental cells; K, inside fully formed auxospores, which have reached a size close to the maximum species-specific, the valves of initial cells begin to deposit (first epitheca; then hypotheca); L, initial cells, that recently left the perizonium (indicated by arrows); M, initial cells return to normal mitotic divisions, giving rise to a new generation of clones. Scale bar: 20 μm

ОБСУЖДЕНИЕ

Теория жизненного цикла диатомовых водорослей разработана достаточно хорошо [Рощин, 1994; Chepurnov et al., 2004; Drebes, 1977; Gastineau et al., 2014; Poulíčková, Mann, 2019; Round et al., 1990 и др.]. Основную часть цикла диатомеи проводят в диплоидном состоянии, осуществляя митотические деления, гаплоидны только гаметы. Половое воспроизведение, сопровождающееся мейозом, является обязательным атрибутом жизненного цикла практически у всех диатомовых водорослей, за редкими исключениями. При этом одна из самых примечательных особенностей диатомеи состоит в том, что их жизненный цикл имеет тесную связь с размерами клеток. Следующие основные положения, касающиеся подавляющего числа видов диатомовых водорослей, необходимо принять во внимание для того, чтобы выполнить анализ изучавшейся нами природной популяции:

- Прохождение жизненного цикла обусловлено изменением размеров клеток.
- В силу особенностей строения и способа формирования панциря апикальный размер у пеннатных водорослей и диаметр клеток у центрических уменьшаются при каждом вегетативном делении; в клонах происходят уменьшение среднего размера и увеличение диапазона варьирования размеров клеток.
- Восстановление исходных (максимальных) размеров клеток в популяции осуществляется в процессе полового воспроизведения за счёт быстрорастущих зигот, называемых ауксоспорами.
- В жизненном цикле можно выделить дорепродуктивную, репродуктивную и пострепродуктивную фазы (последнюю отмечают не у всех видов).
- Продолжительность дорепродуктивной фазы жизненного цикла составляет от нескольких месяцев до нескольких лет в зависимости от вида и от темпа деления клеток.
- Переход из дорепродуктивной в репродуктивную фазу связан с преодолением критического размера (один из кардинальных пунктов жизненного цикла), который у большинства диатомовых близок к половине максимального видоспецифического размера.
- Переход в репродуктивную фазу не означает безусловного вступления в половой процесс, для его реализации необходимо благоприятное сочетание факторов среды и наличие полового партнёра (в случае гетероталлического воспроизведения, которое доминирует у большинства пеннатных диатомовых); большинство клеток, достигших репродуктивной фазы, продолжает делиться вегетативно и уменьшаться в размерах.
- Независимо от размера родительских клеток, ауксоспоры обычно дорастают до размера, близкого к максимальному видоспецифическому. Однако у ряда видов размер дочерних (инициальных) клеток зависит от размера родительских. В таких случаях размер появившихся инициальных клеток может оказаться меньше критической границы, что позволяет им сразу же вступить в половой процесс. В итоге наблюдаются случаи двухстадийного ауксоспорообразования.

Таким образом, в процессе полового воспроизведения в популяции диатомовых происходят два важных события — восстановление исходных размеров клеток и появление новой генерации клонов, имеющих новые генетические «пасьянсы». Следует заметить, что у небольшого числа видов Bacillariophyta (крайне незначительного по сравнению с общим количеством изученных) не происходит изменение размеров клеток при вегетативном делении. Видимо, по этой причине у них никогда не наблюдали полового процесса. К таким видам относятся модельные в других отношениях, но представляющие собой исключение в плане половой репродукции *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897 и *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal, 1970 — первые две диатомеи, у которых был секвенирован полный геном [Armbrust et al., 2004; Montsant et al., 2005].

Руководствуясь вышеизложенными принципами, можно проанализировать распределение клеток в природной популяции *N. cf. thermaloides* (см. рис. 3) по фазам жизненного цикла. На момент отбора проб немногим более половины клеток в популяции находились в дорепродуктивной фазе. Эффективная доля популяции составила 46 %. В популяции идёт процесс полового воспроизведения, о чём свидетельствуют находки клеток, размер которых близок к максимальному видоспецифическому. Очевидно, что появиться такие клетки могли только в результате полового воспроизведения. Спектр размеров охватывает все фазы жизненного цикла: в равной мере представлены клетки, находящиеся в дорепродуктивной и репродуктивной фазах. Такое состояние популяции можно назвать сбалансированным. Более того, если учесть, что для прохождения всего жизненного цикла диатомеям требуется обычно несколько лет [Mann, 1988], мы вправе заключить, что популяция *N. cf. thermaloides* не является эфемерной и находится в данном месте уже достаточно продолжительное время.

Ещё раз подтвердилась свойственная большинству диатомовых водорослей тенденция: граница размеров (кардинальный пункт), переходя которую клетки оказываются в репродуктивной фазе, близка к половине максимального видоспецифического размера (у большинства изученных видов она находится в диапазоне от 45 до 55 %) [Davidovich, 2000]. Следствием обнаруженной положительной корреляции между длиной родительских и дочерних клеток (см. рис. 4) будет неодинаковая продолжительность жизненного цикла отдельных клонов.

Изогамное половое воспроизведение, сопровождающееся формированием двух гамет в каждой клетке-гаметангии, отмечено не менее чем у 15 родов диатомовых, филогенетически как близких к роду *Nitzschia* Hassall, 1845 (например, *Achnanthes* Bory, 1822), так и далёких от него (к примеру, *Dickieia* Berkeley ex Kützing, 1844 или *Berkeleya* Greville, 1827), судя по наиболее масштабному на сегодня филогенетическому дереву, построенному по данным для 11 генов у 1151 таксона диатомей [Nakov et al., 2018]. Однако, помимо количества гамет и их поведения, важную роль в классификации типов полового процесса играют такие детали, как наличие или отсутствие копуляционной слизи, выделяемой клетками-гаметангиями; деление протопласта клетки в апикальной или трансапикальной плоскости в процессе формирования гамет и наличие или отсутствие перегруппировки последних; направление движения гамет; взаимная ориентация осей ауксоспор и створок гаметангиальных клеток. Приняв во внимание все детали, половой процесс, наблюдавшийся у *N. cf. thermaloides*, можно отнести к категории IB2a по классификации Гайтлера [Geitler, 1973].

В системе скрещивания вида главенствует гетероталлизм. Возможно, он является единственным путём воспроизведения, если учесть, что до настоящего времени случаев гомоталлизма в клоновых культурах не обнаружено.

В будущем предстоит изучить отношение *N. cf. thermaloides* к достаточно переменным, для многих других диатомовых экстремальным, условиям температуры и высокой солнечной радиации, а также установить пределы галотолерантности этого вида, обитающего в условиях сравнительно высокой солёности, которая характерна для луж и озёр грязевых вулканов.

Заключение. *Nitzschia cf. thermaloides* представлена в водоёмах, образованных выбросами грязевых вулканов Керченского полуострова, стабильной популяцией, в которой присутствуют клетки, находящиеся во всех фазах жизненного цикла: дорепродуктивной, репродуктивной и пострепродуктивной. Анализ размерного распределения клеток в популяции, который стал возможен благодаря установленным кардинальным пунктам жизненного цикла, показал, что популяция не является эфемерной и способна воспроизводиться в поколениях, несмотря на экстремальные условия существования.

Работа выполнена в рамках государственного задания КНС — ПЗ РАН — филиала ФИЦ ИнБЮМ «Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов» (№ гос. регистрации 121032300019-0). Выделение клонов, измерения, наблюдения выполнены с использованием микроскопов, цифровых камер, лабораторной посуды и программного обеспечения, приобретённых за счёт средств грантов Российского фонда фундаментальных исследований «Получение данных о репродуктивной биологии рода *Ardissonaea*, критически важных для понимания филогении диатомовых» (№ 15-04-00237_a) и «Изучение видоспецифичности эволюционного перехода от оогамии к неоогамному половому воспроизведению у полярных центральных диатомей (*Mediophyceae*)» (№ 19-04-00070_a).

Благодарность. Выражаем признательность коллегам из ФИЦ ИнБЮМ, Л. И. Рябушко и её соавторам, за пионерную работу, вдохновившую нас на проведение данного исследования, а также В. Н. Лишаеву — за помощь при микрофотографировании на СЭМ. Благодарны водителю Карадагской научной станции В. В. Сироте — неизменному участнику экспедиций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Абдуллин Ш. Р., Багмет В. Б. Миксотрофия цианобактерий и водорослей в условиях пещер // *Журнал общей биологии*. 2016. Т. 77, № 1. С. 54–62. [Abdullin Sh. R., Bagmet V. B. Mixotrophy of cyanobacteriae and algae inhabiting caves. *Zhurnal obshchei biologii*, 2016, vol. 77, no. 1, pp. 54–62. (in Russ.)]
2. Давидович Н. А., Давидович О. И., Подунай Ю. А. Коллекция культур диатомовых водорослей Карадагской научной станции (Крым) // *Морской биологический журнал*. 2017. Т. 2, № 1. С. 18–28. [Davidovich N. A., Davidovich O. I., Podunay Yu. A. Diatom culture collection of the Karadag scientific station (Crimea). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 18–28. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.1.03>
3. Каюкова Е. П. Химический состав жидкой фазы грязевых сопков северо-восточной части Керченского полуострова (Восточный Крым) // *Геология, геоэкология, эволюционная география* : коллективная монография. Т. 17 / под ред. Е. М. Нестерова, В. А. Снытко. Санкт-Петербург : Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2018. С. 186–190. [Kaiukova E. P. Khimicheskii sostav zhidkoi fazy gryazevykh sopok severo-vostochnoi chasti Kerchenskogo poluostrova (Vostochnyi Krym). In: *Geologiya, geoekologiya, evolyutsionnaya geografiya* : collective monograph. Vol. 17 / E. M. Nesterov, V. A. Snytko (Eds). Saint Petersburg : Izd-vo RGPU im. A. I. Gertsena, 2018, pp. 186–190. (in Russ.)]
4. Куришко В. А., Месяц И. А., Тердодов А. С. Гидрогеология грязевого вулканизма Керченского полуострова // *Геологический журнал*. 1968. Т. 8, вып. 1. С. 49–59. [Kurishko V. A., Mesyats I. A., Terdovidov A. S. Hidrogeologiya gryazevogo vulkanizma Kerchenskogo poluostrova. *Geologicheskii zhurnal*, 1968, vol. 8, iss. 1, pp. 49–59. (in Russ.)]
5. Матюнина В. А. Химический состав рассолов Булганакского и Мало-Тарханского сопочных полей (Восточный Крым) // *Материалы Международного молодёжного научного форума «Ломоносов-2019»* / отв. ред. И. А. Алешковский, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов. Москва : МАКС Пресс, 2019. С. 1–2. [Matyunina V. A. Khimicheskii sostav rassolov Bulganakskogo i Malo-Tarkhanskogo sopochnykh polei (Vostochnyi Krym) // *Materialy Mezhdunarodnogo molodezhnogo nauchnogo foruma "Lomonosov-2019"* / I. A. Aleshkovsky, A. V. Andriyanov, E. A. Antipov (Eds). Moscow : MAKS Press, 2019, pp. 1–2. (in Russ.)]. URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2019/data/15896/92330_uid343668_report.pdf [accessed: 11.11.2020].
6. Неврова Е. Л., Шадрин Н. В. Донные диатомовые водоросли солёных озёр Крыма // *Морской экологический журнал*. 2005. Т. 4, № 4. С. 61–71. [Nevrova E. L., Shadrin N. V. Benthic diatoms in Crimean saline lakes. *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2005, vol. 4, no. 4, pp. 61–71. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/821>
7. Никулина Т. В. Водоросли горячих источников Курильских островов (Россия) // *Альгология*. 2010. Т. 20, № 3. С. 334–356.

- [Nikulina T. V. Biodiversity of algae of hot springs from Kuril Islands (Russia). *Al'gologia*, 2010, vol. 20, no. 3, pp. 334–356. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v12.i4.10>
8. Полякова С. Л., Давидович О. И., Подунай Ю. А., Давидович Н. А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3, № 2. С. 73–80. [Polyakova S. L., Davidovich O. I., Podunay Yu. A., Davidovich N. A. Modification of the ESAW culture medium used for cultivation of marine diatoms. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 73–80. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.2.06>
 9. Рошин А. М. *Жизненные циклы диатомовых водорослей*. Киев : Наукова думка, 1994. 171 с. [Roshchin A. M. *Zhiznennyye tsikly diatomovykh vodoroslei*. Kyiv : Naukova dumka, 1994, 171 p. (in Russ.)]
 10. Рябушко Л. И., Бондаренко А. В. Микроводоросли грязевого вулкана Булганакского сопочного поля Крымского полуострова // *Морской биологический журнал*. 2020. Т. 5, № 1. С. 64–77. [Ryabushko L. I., Bondarenko A. V. Microalgae of mud volcano of the Bulganak sopochnoe field on the Crimean Peninsula. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 64–77. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.1.07>
 11. Сеничева М. И., Губелит Ю. И., Празукин А. В., Шадрин Н. В. Фитопланктон гиперсолёных озёр Крыма // *Микроводоросли Чёрного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования* / под ред. Ю. Н. Токарева, З. З. Финенко, Н. В. Шадрин ; НАН Украины, Институт биологии южных морей. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. С. 93–99. [Senicheva M. I., Gubelit Yu. I., Prazukin A. V., Shadrin N. V. Fitoplankton gipersolenykh ozer Kryma // *The Black Sea Microalgae: Problems of Biodiversity Preservation and Biotechnological Usage* / Yu. N. Tokarev, Z. Z. Finenko, N. V. Shadrin (Eds) ; NAS of Ukraine, Institute of Biology of the Southern Seas. Sevastopol : EKOSI-Gidrofizika, 2008, pp. 93–99. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/5521>
 12. Armbrust E. V., Berges J. A., Bowler Ch., Green B. R., Martinez D., Putnam N. H., Zhou Sh., Allen A. E., Apt K. E., Bechner M., Brzezinski M. A., Chaal B. K., Chiovitti A., Davis A. K., Demarest M. S., Detter J. Ch., Glavina T., Goodstein D., Hadi M. Z., Hellsten U., Hildebrand M., Jenkins B. D., Jurka J., Kapitonov V. V., Kröger N., Lau W. W. Y., Lane T. W., Larimer F. W., Lippmeier J. C., Lucas S., Medina M., Montsant A., Obornik M., Parker M. Sch., Palenik B., Pazour G. J., Richardson P. M., Rynearson T. A., Saito M. A., Schwartz D. C., Thamtrakoln K., Valentin K., Vardi A., Wilkerson F. P., Rokhsar D. S. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 2004, vol. 306, iss. 5693, pp. 79–86. <https://doi.org/10.1126/science.1101156>
 13. Drebes G. Sexuality. In: *The Biology of Diatoms* / D. Werner (Ed.). Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1977, pp. 250–283. (Botanical Monographs ; vol. 13).
 14. Chepurnov V. A., Mann D. G., Sabbe K., Vyverman W. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *International Review of Cytology*, 2004, vol. 237, pp. 91–154. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)37003-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)37003-8)
 15. Davidovich N. A. Species-specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms. In: *Proceedings of the 16th International Diatom Symposium*, Greece, 25 August – 1 September, 2000 / A. Economou-Amilli (Ed.). Greece : University of Athens, 2000, pp. 191–196.
 16. Gastineau R., Davidovich N. A., Hallegraeff G. M. Reproduction in microalgae. In: *Reproductive Biology of Plants* / K. G. Ramawat, J.-M. Mérillon, K. R. Shivanna (Eds). Boca Raton : CRC Press, 2014, pp. 1–28. <https://doi.org/10.1201/b16535>
 17. Geitler L. Auxosporenbildung und Systematik bei pennaten Diatomeen und die Cytologie von *Cocconeis*-Sippen. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 1973, vol. 122, no. 5, pp. 299–321.
 18. Mann D. G. Why didn't Lund see sex in *Asterionella*? A discussion of the diatom life cycle in nature. In: *Algae and the Aquatic Environment: Contributions in Honour of J. W. G. Lund* / F. E. Round (Ed.). Bristol, UK : Biopress Ltd., 1988, pp. 384–412.
 19. Montsant A., Jabbari K., Maheswari U., Bowler C. Comparative genomics of the pennate diatom

- Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, 2005, vol. 137, iss. 2, pp. 500–513. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052829>
20. Nakov T., Beaulieu J. M., Alverson A. J. Accelerated diversification is related to life history and locomotion in a hyperdiverse lineage of microbial eukaryotes (diatoms, Bacillariophyta). *New Phytologist*, 2018, vol. 219, iss. 1, pp. 462–473. <https://doi.org/10.1111/nph.15137>
21. Peletier H., Gieskes W. W. C., Buma A. G. J. Ultraviolet-B radiation resistance of benthic diatoms isolated from tidal flats in the Dutch Wadden Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, vol. 135, pp. 163–168. <https://doi.org/10.3354/meps135163>
22. Poulíčková A., Mann D. G. Diatom sexual reproduction and life cycles. In: *Diatoms: Fundamentals and Applications* / J. Seckbach, R. Gordon (Eds). Hoboken, New Jersey : Wiley ; Salem, Massachusetts : Scrivener Publishing LLC, 2019, pp. 245–272. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch11>
23. Round F. E., Crawford R. M., Mann D. G. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge, UK : Cambridge University Press, 1990, 747 p.

REPRODUCTIVE BIOLOGY AND THE LIFE CYCLE OF THE DIATOM *NITZSCHIA* CF. *THERMALOIDES* INHABITING MUD VOLCANOES OF CRIMEA

N. A. Davidovich, O. I. Davidovich, and Yu. A. Podunay

T. I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS – Branch of IBSS,
Feodosiya, Russian Federation
E-mail: nickolaid@yandex.ru

In biology, it is important to study the ability of organisms to exist under extreme conditions, to which the phase of the life cycle, related to sexual reproduction and the possibility to leave the next generation, is especially sensitive. *Nitzschia* cf. *thermaloides* Hustedt was found in high abundance in samples from puddles and lakes formed in the areas of action of mud volcanoes of the Bulganak mud volcano field (Kerch Peninsula, Crimea). Individual clones were isolated from the samples by the micropipette technique and introduced into a culture; their crossing made it possible to initiate heterothallic sexual reproduction. The aim of this work was to study reproductive biology and the life cycle of the alga from a biotope with extremely high levels of irradiance, temperature, and salinity. For the first time for this species, a description of the sexual process corresponding to IB2a type according to Geitler classification is given. The cardinal points have been defined, which represent critical cell sizes that determine the transition from one phase of the life cycle to another. The full range of cell sizes is given, from the initial ones that appeared as a result of sexual reproduction to the smallest ones observed when kept in the culture. The main postulates of the life-cycle theory are considered allowing to analyze the natural population of the alga. The population of *N. cf. thermaloides* was found to exist in the sampling site for a long time and to be represented by cells in all phases of the life cycle.

Keywords: diatoms, *Nitzschia* cf. *thermaloides*, mud volcanoes, sexual reproduction, life cycle