

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 581.162+582.26

ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ НА ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ
ARDISSONEA CRYSTALLINA (BACILLARIOPHYTA)

Ю.А. Подунай*, О.И. Давидович, Н.А. Давидович

*Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН;
Россия, 298188, г. Феодосия, п. Курортное, ул. Науки, д. 24*** e-mail: grab-ua@yandex.ru*

Наблюдения показывают, что одним из ключевых факторов, влияющих на половое воспроизведение диатомовых водорослей, является характерная для каждого вида концентрация клеток, используемых в скрещенных посевах. От плотности культуры может зависеть концентрация феромонов, инициирующих гаметогенез у клеток противоположного пола. Изучено влияние плотности и характера посева клеток в смешанной культуре на репродукцию интересного в таксономическом смысле вида диатомовых водорослей *Ardissonaea crystallina* (C. Agardh) Grunow, клетки которого были выделены из проб, отобранных в акватории г. Севастополя (Черное море). Исследована зависимость интенсивности полового процесса от начальной концентрации клеток. Показано, что уменьшение плотности посева также может увеличивать время, необходимое для начала гетероталлического полового воспроизведения. Рассчитан оптимум концентрации клеток в объеме среды, наиболее благоприятный для воспроизведения вида. При увеличении объема среды, в которую засеваются репродуктивно совместимые клоны, оптимум концентрации клеток сдвигается к большим значениям. Если же начальная концентрация клеток оказывается выше оптимальной плотности, то чаще всего воспроизведение не наступает, т.к. на культуру, по всей видимости, начинает оказывать влияние перенасыщение среды продуктами метаболизма клеток.

Ключевые слова: *Ardissonaea crystallina*, половое воспроизведение, инициальные клетки, феромоны, концентрация клеток.

Диатомовые водоросли имеют особенности, отличающие их от остальных одноклеточных водорослей. Вегетативное деление клетки приводит к образованию двух дочерних клеток, одна из которых имеет размер, меньший, чем родительская [1]. Поэтому при делении размер клеток диатомовых постепенно уменьшается, и в определенный момент жизненного цикла должно произойти событие, позволяющее вернуться к исходным размерам. У диатомовых восстановление размеров обычно связано с половым воспроизведением, в результате которого происходит формирование особых клеток, получивших название ауксоспоры [2, 3]. Ауксоспоры способны быстро увеличиваться до максимального видоспецифического размера. Изучение полового воспроизведения диатомовых водорослей началось с XVIII века, вскоре после того, как стали доступны микроскопические методы исследования. К настоящему времени накоплены данные о жизненном цикле нескольких сотен диатомовых водорослей, однако это количество выглядит небольшим, если сравнить его с предполагаемыми в природе 100 тысячами видов [4]. На половое воспроизведение диатомовых водорослей в первую очередь оказывает влияние длина родительских клеток, которые должны уменьшиться до определенного размера, так называемой кардинальной точки [1, 2, 5, 6]. Кроме

этого, на интенсивность полового процесса у диатомей влияние также могут оказывать факторы окружающей среды, в частности, условия освещения (интенсивность и фотопериод) [7–9], соленость среды [10], движение воды [6]. Также имеются единичные данные о влиянии на половое воспроизведение диатомовых водорослей фактора начальной плотности посева, т.е. концентрации клеток в смеси родительских клонов при гетероталлическом воспроизведении [11]. Плотность культуры может выступать одним из лимитирующих факторов при проведении экспериментов по изучению полового воспроизведения. Она может быть напрямую связана с выделением клетками родительских клонов феромонов — особой группы веществ, которые инициируют гаметогенез у противоположного пола [12, 13].

Ardissonaea crystallina (C. Agardh) Grunow интересна для исследования своей таксономической позицией. В рамках классической таксономии [14] вид относили к классу Fragilariophyceae, тогда как по результатам молекулярных исследований была показана принадлежность вида к биполярным центрическим диатомовым, или классу Mediophyceae [15, 16]. Для выяснения таксономической позиции этого рода необходимым представляется изучение полового воспроизведения и установление типа полового процесса, который, как известно,

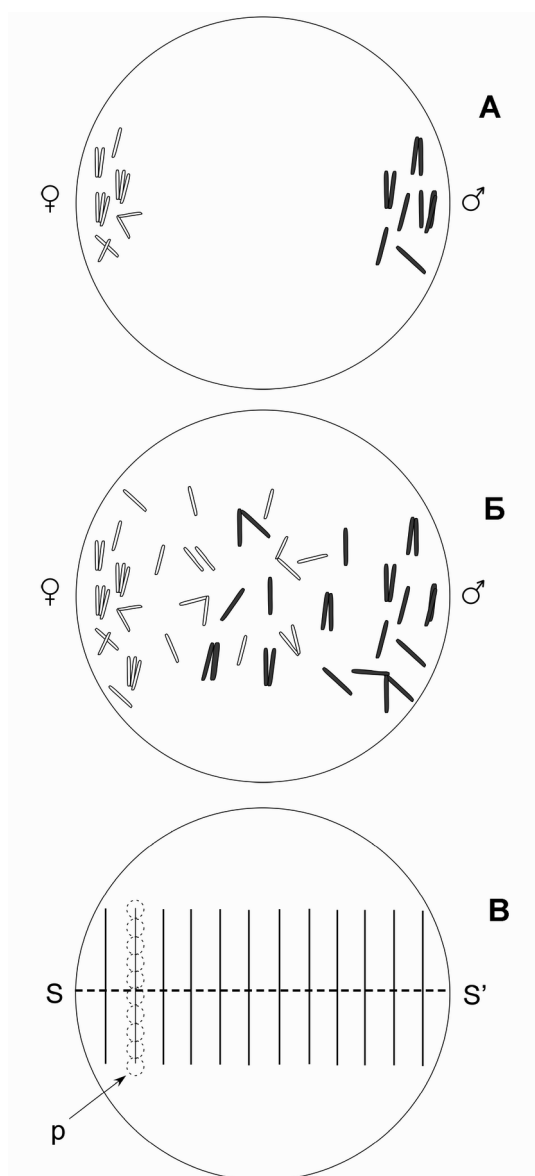


Рис. 1. Схема эксперимента для проверки возможности взаимодействия клеток — половых партнеров, посеянных на удалении друг от друга: **А** — клетки мужского и женского пола посеяны напротив друг друга без возможности их смешивания; **Б** — через 5–6 сут вегетативно размножившиеся клетки обоих полов пришли 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)

принципиально различен у центрических и пеннатных диатомовых [1]. Детальное описание типа полового процесса и анализ таксономического положения рода будут представлены в отдельной статье. Настоящая работа сфокусирована на эколого-физиологических факторах, определяющих успешность полового процесса. Одним из них является плотность посева, при которой воспроизведение возможно. Важно знать также оптимальную плотность, при которой интенсивность полового процесса будет максимальной.

Материалы и методы

Пробы отобраны в бухте Казачья (г. Севастополь, Черное море) в период с 2011 по 2013 г., в двух метрах от берега на глубине около 40 см. Одиночные клетки *Ardissonea crystallina* выделены при помощи микропипетки в клоновые культуры, которые содержались на искусственной морской воде (20‰), приготовленной по рецепту ESAW [17] с небольшими модификациями [18]. Культивирование проводили в стеклянных чашках Петри диаметром 9 см и высотой 1,4 см при наполнении средой 15–20 мл. Чашки находились в изолированной комнате с постоянной температурой $20 \pm 2^\circ\text{C}$ на полках у окон, обращенных на север, — таким образом обеспечивалось естественное освещение. Для скрещивания использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, которую поддерживали еженедельным пересевом в свежую питательную среду. В экспериментах по скрещиванию использованы клоны, средняя длина клеток в которых очевидно различалась, что позволяло при наблюдении в смеси установить принадлежность клетки к конкретному клону.

Для экспериментов по плотности посева репродуктивно совместимые клоны *A. crystallina* 3.0726-D и 3.0711-C скрещивали в начальной концентрации от 150 до 4500 клеток на cm^2 дна чашки. В каждом эксперименте применили 6 различных концентраций посева (максимальная от минимальной отличалась в 32 раза). Также при одинаковой плотности начального посева использовали чашки Петри разного диаметра — 50 и 60 мм, в которые добавляли 10 и 15 мл среды соответственно. Посевы осуществляли утром, исходную концентрацию клеток на площади дна определяли вечером в день посева.

Было проверено взаимодействие клеток — половых партнеров, посеянных на удалении друг от друга. Для этого в чашки диаметром 7 см клоны противоположного пола помещали диаметрально противоположно (рис. 1, А) так, чтобы нараставшие клетки через несколько дней пришли в соприкосновение на середине чашки (рис. 1, Б). Подсчет относительного количества генеративных клеток проводили по диаметральной транссекте чашки с шагом в 5 мм (рис. 1, В). На каждом шаге на отрезке 30 мм поперек транссекты просчитывали клетки в 10–15 полях зрения.

Для определения активности полового воспроизведения оценивали отношение количества половых клеток 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.

Для наблюдения использовали микроскоп Biolag PI (PZO, Польша), настроенный по методу дифференциально-интерференционного контраста и освещении по Кёлеру [19].

Результаты

A. crystallina — это морская диатомовая водоросль, обитающая в прибрежной зоне на дне чаще всего как эпифит на различных макрофитах. Встречаются как одиночные клетки, так и группы клеток (от двух до нескольких десятков клеток). Одним из концов клетки крепятся к субстрату с помощью выделяемой слизи. Образованная слизистая подушка может занимать сравнительно большую площадь, ее размер зависит как от количества клеток в группе, так и от размера самих клеток. Клетки *A. crystallina* довольно крупные (в жизненном цикле их размер меняется в диапазоне 65–680 мкм), имеют вытянутую форму и содержат множество хлоропластов, равномерно распределенных по всей длине клетки.

По результатам экспериментов видно (рис. 2, А), что при гетероталлическом воспроизведении *A. crystallina* оптимальная начальная концентрация составила 800–1200 клеток/см² в изученном диапазоне плотности посева от 120 до 4100 клеток/см² (при объеме среды 1,57 мл на каждый см² дна чашки). Воспроизведение в смешанных посевах начиналось на 4–6-е сут. При концентрации клеток меньше 130 на см² воспроизведение на 6–7-е сут не наблюдали. При увеличении начальной концентрации клеток в чашке свыше 1500 клеток/см² происходило постепенное уменьшение интенсивности полового процесса, которое выражалось в уменьшении количества образовавшихся гамет и ауксоспор.

В чашках с меньшей начальной плотностью посева (от 100 до 3000 клеток/см² воспроизведение начиналось позже, на 9–10-е сут (рис. 2, Б). Следует обратить внимание на то, что ко времени подсчета генеративных клеток общее количество клеток в смеси существенно возросло за счет вегетативного размножения, поэтому максимум интенсивности воспроизведения, приходящийся на меньшую начальную плотность, соответствовал в данном случае относительно высокой конечной плотности.

В одном из экспериментов смешанный посев сделан в чашках Петри с увеличенным объемом добавляемой среды (1,88 мл на см²). При большем объеме среды, приходящемся на единицу площади дна, интенсивность воспроизведения не уменьшалась даже при начальной плотности посева достигающей 4200 клеток/см² (рис. 2, В).

Также был проведен эксперимент, в котором в чашку Петри с диаметром 80 мм репродуктивно совместимые клоны засеяли с двух сторон чашки так, чтобы вначале они не контактировали друг с другом (см. Материалы и методы, рис. 1). В этом эксперименте участвовали две пары клонов. Одна пара клонов 3.0726-Д и 3.0711-С, как было ранее установлено, воспроизводилась гетероталлическим путем, клон 3.0711-С давал мужские гаметы, клон 3.0726-Д — женские; во второй паре клон 3.0722-Е с большим размером клеток сам гамет не продуцировал, однако стимулировал гаметогенез и гомоталлическое воспроизведение у клона 3.0722-А



Рис. 2. Количество генеративных клеток в смеси репродуктивно совместимых клонов 3.0726-Д и 3.0711-С *Ardissoonea crystallina*. А — на 6-е сут эксперимента при различной начальной плотности посева; Б — на 10-е сут эксперимента при различной начальной концентрации родительских клеток; В — на 6-е сут эксперимента при различной начальной плотности посева в увеличенном объеме среды, приходящемся на единицу площади дна

с меньшим размером клеток. В паре клонов 3.0726-Д и 3.0711-С воспроизведение началось на 4–5-е сут после посева. На половине чашки, занятой женским клоном 3.0726-Д с меньшим размером кле-

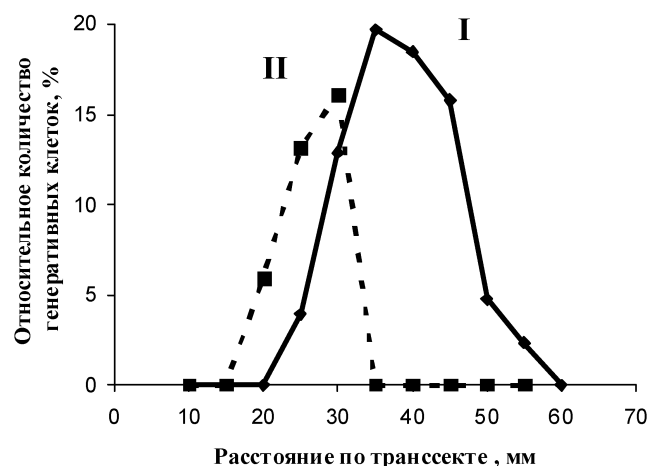


Рис. 3. Количество генеративных клеток в смеси репродуктивно совместимых клонов *Ardissonaea crystallina* на 6-е сут в двух экспериментах при пространственном разделении мужского и женского клона в чашке: I — распределение интенсивности полового процесса при гетероталлическом воспроизведении клонов 3.0726-D и 3.0711-C; II — распределение интенсивности полового процесса при гомоталлическом воспроизведении женского клона 3.0722-A в присутствии мужского клона 3.0722-E

ток можно было видеть гаметы, зиготы и растущие ауксоспоры, на второй половине с длинными мужскими клетками присутствовали только гаметы, никаких зигот и ауксоспор не наблюдалось. На границе клонов — максимальное по интенсивности воспроизведение. Возле стенок на двух противоположных сторонах чашки половых клеток не обнаружено (рис. 3, I).

Во второй паре наблюдалось смещение области максимума интенсивности воспроизведения от середины чашки в сторону гомоталлически воспроизводящегося клона (рис. 3, II).

Обсуждение

Клетки диатомовых водорослей способны перейти от вегетативного деления к половому размножению лишь при достижении ими определенных размеров [1, 2, 5, 20] и при сочетании необходимых внешних факторов [1]. Как показывают проведенные эксперименты, существенное влияние на возникновение и интенсивность полового воспроизведения оказывают начальная концентрация посева родительских клеток и взаимное пространственное расположение последних. При концентрации клеток ниже оптимальной вероятность встречи клеток после осуществления посева слишком мала для интенсивного полового воспроизведения в смеси. Поэтому при начальной плотности посева ниже определенного уровня, для *A. crystallina* — это около 130 клеток/см², половое воспроизведение начиналось гораздо позже — на 9–10-е сут вместо обычных 5–6-х сут, либо не возникало совсем. Объяснение этому, вероятно, следует искать, исходя из представлений о химическом взаимодействии клеток в процессе воспроизведения, которое осуще-

ствляется с помощью особой категории веществ — феромонов, как это было установлено на примере двух видов пеннатных диатомовых водорослей [12, 13, 21]. Показано, что феромоны выделяются клетками как мужских, так и женских клонов в определенной последовательности: выделение феромонов клетками женских клонов инициирует гаметогенез и ответное выделение феромонов у мужских клонов, которое в свою очередь вызывает гаметогенез у женских клонов [12]. В нашем случае задержка воспроизведения могла наблюдаться в связи с тем, что в первые дни плотность культуры не достигла величины, необходимой для адекватного взаимодействия клеток-половых партнеров. По этой же причине, очевидно, положение оптимума интенсивности полового процесса сдвигалось в сторону больших начальных концентраций клеток на единицу площади, если посеы осуществлялись в чашках Петри с большим объемом среды, приходящимся на единицу площади дна (рис. 2, В). Увеличение объема среды “разбавляло” феромоны.

При этом если начальная концентрация клеток оказывалась достаточно большой, но воспроизведение не наступало на 5–6-е сут, на культуру, по всей видимости, начинал оказывать влияние другой фактор — перенасыщение среды продуктами метаболизма клеток. При слишком плотном посеве в среде могут очень быстро накапливаться продукты метаболизма в такой концентрации, что тормозится не только воспроизведение клеток, но и их вегетативное размножение. Происходит нечто вроде “самоотравления”. Внешне это проявляется в переходе культуры в стационарную фазу роста, в то время как известно, что для реализации полового воспроизведения культуры должны находиться в стадии экспоненциального роста [22]. Таким образом, для достижения наибольшей интенсивности полового воспроизведения должно быть подобрано оптимальное сочетание плотности посева и объема среды. При значительном отклонении от оптимальных концентраций половое воспроизведение может не наступить совсем, при том, что будет наблюдаться быстрый рост численности клеток за счет вегетативного размножения.

Гипотезу о влиянии феромонов на половую активность клеток подтверждают результаты экспериментов, в которых клетки клонов различного пола были высажены с разных сторон чашки Петри. При межклоновом воспроизведении *A. crystallina* максимальное количество половых клеток, обнаруженное на границе встречи двух клонов, обусловлено не только увеличившейся вероятностью встречи родительских клеток, но и, очевидно, большей доступностью выделяемых феромонов. Следует упомянуть, что у *A. crystallina* доставка гамет к месту сингамии не может осуществляться за счет родительских клеток в силу их малоподвижности [23]. Чем дальше от границы соприкосновения клонов расположены клетки, тем интенсивность полового процесса оказывается меньшей. В связи с этим

очень показательно внутриклоновое воспроизведение женского клона при пространственно разделенном посеве (рис. 3, II). Если бы внутриклоновое воспроизведение происходило без воздействия феромонов мужского клона, то его интенсивность была бы равномерной по всей площади распространения женского клона. Мы же наблюдаем картину, когда максимальное количество половых клеток отмечено вблизи границы встречи двух клонов. На стороне женского клона у стенки чашки половых клеток не было совсем. Единственной причиной этого могут быть выделяемые клетками мужского клона феромоны, концентрация которых уменьшается с удалением от границы расположения мужского клона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Drebes. G.* Sexuality // *The Biology of Diatoms. Botanical Monographs* / Ed. by D. Werner. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. P. 250–283.
2. *Geitler L.* Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen) // *Archiv für Protistenkunde*. 1932. N. 78. P. 1–226.
3. *Рощин А.М.* Жизненные циклы диатомовых водорослей. Киев: Наукова думка, 1994. 171 с.
4. *Mann D.G., Vanormelingen P.* An inordinate fondness? The number, distributions and origins of diatom species // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2013. Vol. 60. N 4. P. 414–420.
5. *Geitler L.* Reproduction and life history in diatoms // *Bot. Rev.* 1935. Vol. 1. N. 5. P. 149–161.
6. *Bates S.S., Davidovich N.A.* Factors affecting the sexual reproduction of diatoms, with emphasis on *Pseudo-nitzschia* spp. // *LIFENAB: Life histories of microalgal species causing harmful blooms* (October 24–27). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002. P. 31–36.
7. *Давидович Н.А.* Фоторегуляция полового воспроизведения у Bacillariophyta (Обзор) // *Альгология*. 2002. Т. 12. № 2. С. 259–272.
8. *Давидович Н.А., Чепурнов В.А.* Интенсивность аукоспорообразования у двух видов Bacillariophyta в зависимости от освещенности и продолжительности фотопериода // *Альгология*. 1993. Т. 3. № 3. С. 34–41.
9. *Mouget J.-L., Gastineau R., Davidovich O., Gaudin P., Davidovich N.A.* Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009. Vol. 69. N 2. P. 194–201.
10. *Давидович Н.А., Давидович О.И.* Влияние солености на размножение и воспроизведение некоторых видов диатомовых водорослей // *Летопись природы: Том XXIII. 2006 год* / Под ред. А.Л. Морозовой. Симферополь: Н. Оріанда, 2008. С. 344–352.
11. *Gastineau R.* Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type marennine. Le Mans: de l'Université du Maine, 2010. 328 pp.
12. *Sato S., Beakes G., Idei M., Nagumo T., Mann D.G.* Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 10. e26923
13. *Gillard J., Frenkel J., Devos V., Sabbe K., Paul C., Rempt M., Inzé D., Pohnert G., Vuylsteke M., Vyverman W.* Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone // *Angew. Chem. Int. Edit.* 2013. Vol. 52. N 3. P. 854–857.
14. *Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G.* The Diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990. 747 pp.
15. *Medlin L.K., Kaczmarek I.* Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision // *Phycologia*. 2004. Vol. 43. N 3. P. 245–270.
16. *Medlin L.K., Sato S., Mann D.G., Kooistra W.* Molecular evidence confirms sister relationship of *Ardissonea*, *Climacospheia*, and *Toxarium* within the bipolar centric diatoms (Bacillariophyta, Mediophyceae), and cladistic analyses confirm that extremely elongated shape has arisen twice in the diatoms // *J. Phycol.* 2008. Vol. 44. N 5. P. 1340–1348.
17. *Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M.* Recipes for freshwater and seawater media // *Algal culturing techniques* / Eds. Andersen R.A. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. P. 429–538.
18. *Давидович Н.А., Давидович О.И.* Использование среды ESAW в опытах по изучению полового воспроизведения диатомовых водорослей. — Карадаг — 2009 // Сборник трудов, посвященный 95-летию Карадагской научной станции и 30-летию Карадагского природного заповедника Национальной академии наук Украины / Под ред. А.В.Гаевской и А.Л.Морозовой. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009. С. 538–544.
19. *Федин Л.А., Барский И.Я.* Микрофотография. Л.: Наука, 1971. 220 с.
20. *Davidovich N.A.* Species specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms // 16th International Diatom Symposium (25 Aug.–1 Sept. 2000). Athens: University of Athens, 2001. P. 191–196.
21. *Dusenbery D.B., Snell T.W.* A critical body size for use of pheromones in mate location // *J. Chem. Ecol.* 1995. Vol. 21. N 4. P. 427–438.
22. *Чепурнов В.А., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W.* Experimental studies on sexual reproduction in diatoms // *Int. Rev. Cytol.* 2004. Vol. 237. P. 91–154.
23. *Pickett-Heaps J.D., Hill D. R. A., Blaze K. L.* Active gliding motility in an araphid marine diatom, *Ardissonea* (formerly *Synedra*) *crystallina* // *J. Phycol.* 1991. Vol. 27. N 6. P. 718–725.

**EFFECT OF CULTURE DENSITY ON SEXUAL REPRODUCTION
OF *ARDISSONEA CRYSTALLINA* (BACILLARIOPHYTA)**

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

*T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station — Nature Reserve of the RAS,
Nauki ul. 24, Kurortnoe, Feodosia, 298188, Russia*

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

It is well-known that one of the key factors which affect the sexual reproduction of diatoms is the cell concentration in cross-cultures. The concentration of pheromones which probably initiate gametogenesis in the mixture of cells of opposite sexes, depends on the culture density. The influence of the cell concentration on the sexual reproduction has been studied in the experiments with taxonomically important marine diatom *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow. Several clones have been isolated from samples taken near Sevastopol (the Black Sea). The cell concentration which is most favorable for the species reproduction has been estimated. Low initial density may also increase the time required to start heterothallic sexual reproduction. The optimum cell concentration which is most favorable for the species reproduction has been calculated. Bigger volume of the medium allowed reproduction at higher cell concentration. If the initial concentration of cells was greater than optimal density, the reproduction often did not occur, probably due to cell metabolism products accumulated in the culture.

Keywords: *Ardissonea crystallina*, sexual reproduction, initial cells, pheromones, cell concentration.

Сведения об авторах:

Подунай Юлия Александровна — мл. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН”. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: grab-ua@yandex.ru

Давидович Ольга Ивановна — науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН”. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: olivdav@mail.ru

Давидович Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. лабораторией водорослей и микробиоты ФГБУН “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН”. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: karadag-algae@yandex.ru