

ПОДУНАЙ Юлия Александровна

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

1.5.16 – гидробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Севастополь – 2022

Работа выполнена в лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН" (ФИЦ ИнБЮМ), г. Феодосия

Научный руководитель:

Давидович Николай Александрович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН – филиала ФИЦ ИнБЮМ, г. Феодосия

Официальные оппоненты:

Силкин Владимир Арсентьевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории экологии Южного отделения Института океанологии имени П.П. Ширшова РАН, г. Геленджик

Соловченко Алексей Евгеньевич – доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Ведущая организация:

Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр РАН», г. Петрозаводск.

Защита состоится «17» июня 2022 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.221.01 при ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН», по адресу: 299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2. e-mail: dissovet@ibss-ras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», по адресу: 299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2, или на сайте: <https://ibss-ras.ru/science/dissertation-council-24-1-221-01/announcement/1529/>

Автореферат разослан «__»_____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.221.01,
кандидат биологических наук

Наталья Валериевна Поспелова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В современной диатомологии существует ряд проблем, широко обсуждаемых в научной литературе. В первую очередь это проблема идентификации видов и определения видовых границ. Относительно небольшое количество признаков, традиционно используемых для морфологического анализа, иногда оказывается недостаточным для разграничения криптических видов [Amato et al., 2007, 2010; Mann, 1999]. В свою очередь на генетическом уровне выбор необходимого процента различий между генами также субъективен и неоднозначен для делимитации видов и порой противоречит морфологическим данным. С точки зрения биогеографии отсутствие корректной таксономической идентификации может затруднить правильную оценку распространения видов [Soininen, 2012]. С этим связана также проблема космополитизма или эндемизма диатомовых водорослей [Kociolek, Spaulding, 2000, Куликовский, Кузнецова, 2014]. Симпатрическое обитание криптических видов ставит вопрос о возможности межвидовой гибридизации у диатомовых, всего два случая которой были описаны [Amato et al., 2015; Vanormelingen, 2008]. Методы и подходы репродуктивной биологии, базирующиеся на биологической концепции вида, позволяют дать ответ на многие из этих вопросов.

Род *Ulnaria* (Kützing) Compère был предложен для группы пресноводных видов бесшовных диатомей, которые ранее относились к большому и гетерогенному роду *Synedra* Ehrenberg. В настоящее время известно 45 видов рода *Ulnaria* с типовым видом *U. ulna* (Nitzsch) P. Compère. Представитель рода *U. acus* (Kützing) M. Aboal является одним из доминантов фитопланктона и фитобентоса многих пресных водоемов, в частности, озера Байкал [Поповская, Генкал, 1998]. Она вносит существенный вклад в пищевые цепи и круговорот кремния, являясь важным биостратиграфическим маркером байкальской палеолетописи плейстоцена и голоцена [Grachev et al., 1998].

В настоящее время многие авторы подвергают род *Ulnaria* тщательной ревизии с типификацией видов [Lange-Bertalot, Ulrich, 2014], с выделением новых видов, как например, *U. ferefusiformis* Kulikovskiy, Lange-Bertalot, *U. pilum* Kulikovskiy, Lange-Bertalot [Kulikovskiy et al., 2016], *U. verhaegeniana* Van de Vijver, M. de Haan, Mertens & Cocquyt [Van de Vijver et al., 2017], с перемещениями видов между родами *Ulnaria* и *Fragilaria* Lyngbye [Van de Vijver et al., 2021]. Однако описание новых видов нередко проводится только на основании небольших отличий по морфологическим признакам, или даже по

одному из них. При выделении таких морфовидов не берется во внимание ни достаточно широкий диапазон варьирования морфологических признаков [Подунай и др., 2017] ни политипичность рассматриваемых видов, что приводит к возникновению трудностей в определении видовых границ. Широкое распространение *U. ulna* и *U. acus*, несомненно, ставит вопрос о том, действительно ли эти виды являются космополитами, или под одним и тем же названием скрывается комплекс видов.

Степень разработанности темы исследования. Этапы полового воспроизведения и жизненные циклы водорослей остаются слабоизученными, особенно на фоне большого количества описанных видов диатомей. Актуален вопрос изучения систем скрещивания видов, сочетания гомо- и гетероталлического путей воспроизведения у диатомовых водорослей. У центрических пол определяется эпигенетически. В отличие от них, у пеннатных диатомей показано генотипическое определение пола, однако доказательства этому получены на сравнительно небольшом количестве видов.

Проблема разграничения и распространения видов в диатомологии широко обсуждается в научной литературе. Космополитическое распространение одних видов противопоставляется эндемизму других. При этом молекулярно-генетические методы исследования далеко не всегда способны решить вопросы таксономии и порой противоречат данным морфологического анализа. В таких случаях для определения видовых границ целесообразно обратиться к методам репродуктивной биологии, которые применяются немногими исследователями из-за трудоемкости работ, связанной с необходимостью выделения клонов и трудностями их содержания в культуре. Вопросу межвидовой гибридизации у диатомовых водорослей посвящено всего несколько работ.

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

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Исследовать схему полового воспроизведения представителей рода *Ulnaria*.
2. Описать жизненный цикл и систему скрещивания изучаемых видов.
3. Определить способ детерминации пола у изученных представителей бесшовных пеннатных диатомовых водорослей.
4. Определить способ доставки гамет к месту сингамии у видов рода *Ulnaria*.

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

Научная новизна. Впервые изучен половой процесс у бесшовных пеннатных диатомовых *Ulnaria acus* и *U. danica*, показаны различия мужского и женского гаметогенеза у *U. ulna*. Описаны жизненные циклы и системы скрещивания изученных видов, выявлены их видоспецифические размеры и кардинальные пункты. Показана схема детерминации пола у *U. ulna* и *U. danica*, предполагающая диплогенотипический характер наследования, при котором мужские организмы являются гетерогаметными, а женские – гомогаметными в отношении половых факторов. Установлено, что сближение гамет для сингамии у видов рода *Ulnaria* осуществляется за счет особого типа движения мужских гамет с помощью временных цитоплазматических выростов, напоминающих аксоподии.

Впервые с использованием принципов и положений репродуктивной биологии изучено распространение видов рода *Ulnaria* на Евразийском континенте. Установлена репродуктивная совместимость изученных популяций *U. acus* и повсеместное распространение этого вида на территории Евразии. Показана репродуктивная изоляция и пределы распространения видов *U. ulna* и *U. danica*. Установлено, что в зоне перекрытия ареалов этих видов возможна межвидовая гибридизация.

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

Практическая значимость работы заключается в том, что диатомовые водоросли используются в биотехнологических процессах, в связи со способностью синтезировать полезные для человека вещества, включая жиры, мукополисахариды, необычные пигменты, наноразмерные кремнеземные структуры. Например, был отработан метод культивирования *U. acus* в больших

емкостях, для получения биогенного кремнезема, белков и липидов, в том числе эйкозапентаеновой кислоты [Верещагин и др, 2008]. Описана микрофлора, ассоциированная с клетками вида, которая может приводить к их гибели в культуре [Захарова и др, 2010]. Слабая изученность жизненных циклов водорослей и биологии их воспроизведения приводит к возникновению трудностей в их содержании. Знание особенностей полового воспроизведения и системы скрещивания необходимо для сохранения в культуре генетических линий штаммов, используемых в биотехнологии.

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

Положения, выносимые на защиту.

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

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

Апробация результатов работы. Материалы диссертационной работы были представлены на следующих симпозиумах, съездах и конференциях: IV Международная конференция "Актуальные проблемы современной альгологии" (Киев, Украина, 2012), XIII Международная научная конференция альгологов "Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований" (Борок, Россия 2013), 9-th Central European Diatom Meeting (Bremerhaven, Germany, 2015), IX Международная научно-практическая конференция молодых учёных по проблемам водных экосистем "Понт Эвксинский – 2015", посвящённой 100-летию со дня рождения д.б.н. проф., чл.-кор. АН УССР В.Н. Грезе (Севастополь, Россия, 2015), Международная конференция "Проблемы систематики и географии водных растений" (Ярославль, Россия, 2015), 11-th International Philological Congress (Szczecin, Poland, 2017), XV международная научная конференция (XV Диатомовая школа) "Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований" (Ярославль, Россия, 2017), 25th International Diatom Symposium (Berlin, 2018), IV Всероссийская научная конференция с международным участием "Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге" (Санкт-Петербург, 2018), Всероссийская научно-практическая конференция "Водные биоресурсы и аквакультура юга России", приуроченная к 20-летию открытия в Кубанском государственном университете направления подготовки "Водные биоресурсы и аквакультура" (Краснодар, 2018), Всероссийская конференция с международным участием "Микология и альгология в России. XX – XXI век: смена парадигм", посвященная 100-летию кафедры микологии и альгологии, 110-летию со дня рождения Михаила Владимировича Горленко и памяти Юрия Таричановича Дьякова (Москва, 2018), XI Всероссийская научно-практическая конференция для молодых учёных по проблемам водных экосистем "Понт Эвксинский – 2019", посвященная памяти д.б.н., проф. С.Б. Гулина (г. Севастополь, 2019), II Международная научно-практическая конференция "Биологическое разнообразие: изучение, сохранение, восстановление, рациональное использование"

(Керчь, 2020), II Всероссийская научно-практическая школа-конференция "Наземные и морские экосистемы Причерноморья и их охрана" (Курортное, 2020).

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

Публикации. Всего опубликовано 84 научные работы, по теме диссертации – 24, в их числе в изданиях, рекомендованных ВАК РФ – 3, в журналах, индексируемых SCOPUS и WoS – 7. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит в обсуждении и постановке задач, выборе и разработке методов исследования, выполнении экспериментов и участии в написании текста статьи. Права соавторов публикаций не нарушены.

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

Благодарности. Автор выражает особую благодарность научному руководителю, д.б.н. Н.А. Давидовичу за помощь и консультации при постановке цели и задач исследования, обсуждении полученных результатов и изложении текста диссертации; к.б.н. О.И. Давидович за всестороннюю помощь в проведении экспериментальных работ и в процессе работы над рукописью; К.И. Шоренко за помощь в проведении морфологического анализа и всем соавторам за совместные публикации. Соискатель выражает глубокую признательность д.б.н. М.С. Куликовскому, к.б.н. Е.С. Гусеву, к.б.н. Е.И. Мальцеву (ИФР РАН) и С.А. Андреевой (СПбГУ) за многолетнее сотрудничество и помощь в проведении молекулярного и морфологического анализа, к.б.н. А.М. Глуценко (ИФР РАН) за обсуждение текста диссертации, а также всем коллегам, любезно предоставившим

для работы пробы из разных водоемов Евразийского континента и клоны представителей рода *Ulnaria*. Автор благодарен администрации Карадагской научной станции за предоставленные условия для выполнения лабораторных работ. Часть данных, использованных в работе, получена при поддержке грантов РФФИ (№14-04-90427, № 15-04-00237, 16-34-00790) и РНФ (№ 14-14-00555).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Обзор литературы

Обзор литературы состоит из трех разделов. В первом разделе представлена информация о диатомовых водорослях, основных аспектах их таксономии, систематики и биологии. Во втором разделе проведен анализ литературы, посвященной половому воспроизведению представителей бесшовных пеннатных диатомовых, показана их система скрещивания, особенности гаметогенеза и способ доставки гамет к месту сингамии. В третьем разделе описана история изучения рода *Ulnaria*, его отдельных представителей и типового вида. Отмечено, что слабоизученным остается вопрос разделения криптических/полукриптических видов рода.

Глава 2 Материал и методы исследований

В настоящей работе был использован материал, собранный из пресноводных водоемов, расположенных на территории Евразийского континента, севере Африки и островах Индонезии. Отбор бентосных проб проводили путем соскоба обрастаний с различных субстратов; отбор планктонных проб производили малой планктонной сетью Джеди. Клетки для клоновых культур выделяли микропипеточным методом [Andersen, Kawachi, 2005]. Клоны содержали в среде, близкой по составу к среде Dm [Beakes et al., 1988]. В основе исследования лежат два метода: клоновое культивирование и экспериментальное скрещивание. Описаны методы подготовки проб для электронной микроскопии, молекулярно-генетические методы. Электронные микрофотографии панцирей получали в центре коллективного пользования Института биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина Российской академии наук на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6510LV (Япония).

Глава 3 Объекты исследования

В главе подробно описана морфология створок изученных видов рода *Ulnaria*, показаны диапазоны апикальной длины их вегетативных клеток,

содержавшихся в культурах. Установлено, что диапазоны морфологических признаков створок *U. danica* и *U. ulna* шире представленных в литературе, перекрываются друг с другом и не имеют значительных различий для клеток, изолированных из географически удаленных популяций. Можно указать на то, что для *U. danica* отмечены бóльшие значения ширины клеток и количества штрихов при меньшем количестве ареол. Учитывая такую вариабельность биометрических характеристик и сходную морфологию, отмеченную также другими авторами, рассматриваемые виды можно считать криптическими.

Объекты исследования получены из 19 географически удаленных популяций Евразии.

Проведенные эксперименты по влиянию некоторых элементов на рост клеток в культуре позволили отработать протокол содержания изучаемых водорослей и подобрать для них оптимальные условия для проведения экспериментов по скрещиванию.

Глава 4 Жизненный цикл и половое воспроизведение представителей рода *Ulnaria*

4.1 Жизненный цикл и изменение размеров

Жизненный цикл диатомовых включает в себя две основные фазы: длительную вегетативную фазу (от несколько месяцев до нескольких лет) и короткую фазу (от нескольких часов до нескольких суток), которая включает в себя половое воспроизведение (гаметогенез и оплодотворение) и процесс формирования ауксоспор и инициальных клеток. Жизненный цикл пеннатных диатомовых водорослей напрямую связан с апикальной длиной клеток. Клетки изученных видов рода *Ulnaria* приобретали способность к половому воспроизведению при достижении апикальной длины, составляющей 51–54% от максимального видоспецифического размера, что соответствует данным, полученным для большинства диатомовых водорослей [Davidovich, 2001]. Клетки, апикальная длина которых становилась меньше определенного размера, оказывались неспособными более вступить в половое воспроизведение. Такой диапазон принято считать закрытым.

Показано, что у *U. acus* и *U. ulna* отсутствует статистически значимая зависимость длины инициальных клеток от длины гаметангиальных клеток. Для всех изученных видов *Ulnaria* отмечена способность клеток к скачкообразному спонтанному уменьшению размеров.

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

В смешанных посевах репродуктивно совместимых клонов у всех изученных видов рода *Ulnaria* наблюдали аллогамный гетероталлический половой процесс. Каждый мужской и женский гаметаангий давал по две гаметы, которые были морфологически идентичными в конце гаметогенеза, однако отличались по способу формирования гамет и их поведению (рис.1). При физическом контакте мужские и женские гаметы сливались с образованием зигот (рис. 2 А–Д). Зиготы изначально имели сферическую форму, и примерно через 1–2 часа начинали биполярно удлиняться, с этого момента их можно рассматривать как ауксоспоры. Внутри полностью сформировавшейся ауксоспоры последовательно откладывались две створки, эпитека и гипотека, давая начало инициальной клетке, размер которой близок к максимальному видоспецифическому. Половое воспроизведение изученных видов является цис-

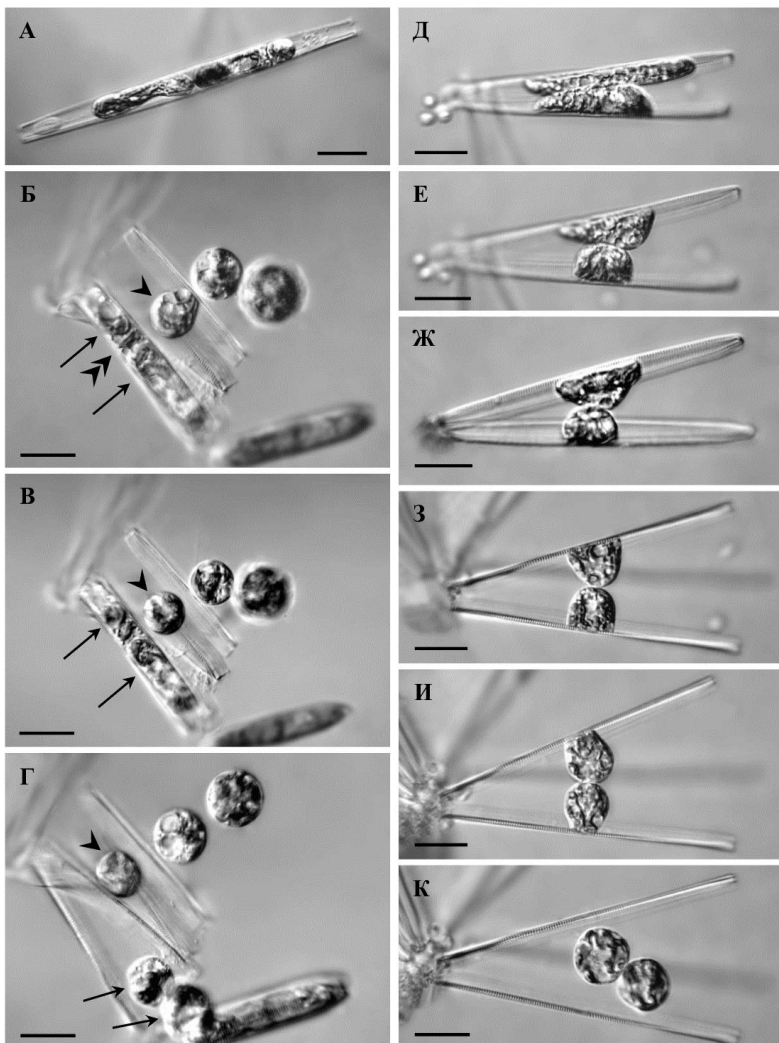


Рисунок 1 — *Ulnaria ulna*, мужской и женский гамето-генез, СМ^{а)}, ДИК^{б)}. А – мужской гаметаангий делится в трансапикальной плоскости; Б – ранняя стадия формирования мужских гамет (стрелки) – образуется перетяжка (двойная стрелка), женская гамета (короткая стрелка) на поздних стадиях формирования прикреплена к створке гаметаангия; В, Г – мужские и женские гаметы становятся сферическими и теряют связь с панцирями родительских клеток; Д–К – последовательность формирования женских гамет. Масштаб 20 мкм

^{а)} СМ – световая микроскопия; ^{б)} ДИК – дифференциально-интерференционный контраст

анизогамным, относится к категории IA2b в системе Гайтлера [Geitler, 1974] и в основных чертах одинаково для всех представителей рода *Ulnaria*.

4.3 Движение гамет

У *Ulnaria ulna* (рис. 3) и *U. acus* нами была отмечена способность к движению гамет. Их вращение и хаотическое движение совпадало с образованием тонких цитоплазматических выростов, напоминающих аксоподии. При этом было обнаружено, что только мужские гаметы формируют такие выросты, длина которых может в несколько раз превышать диаметр самих гамет. У представителей рода *Ulnaria* псевдоподиальную активность можно было выявить на разных стадиях формирования гамет: когда они лежали между створками, и после того, как покидали створки гаметангия. Процесс формирования псевдоподиальных выростов был циклическим, один цикл длился не более одной–двух минут.

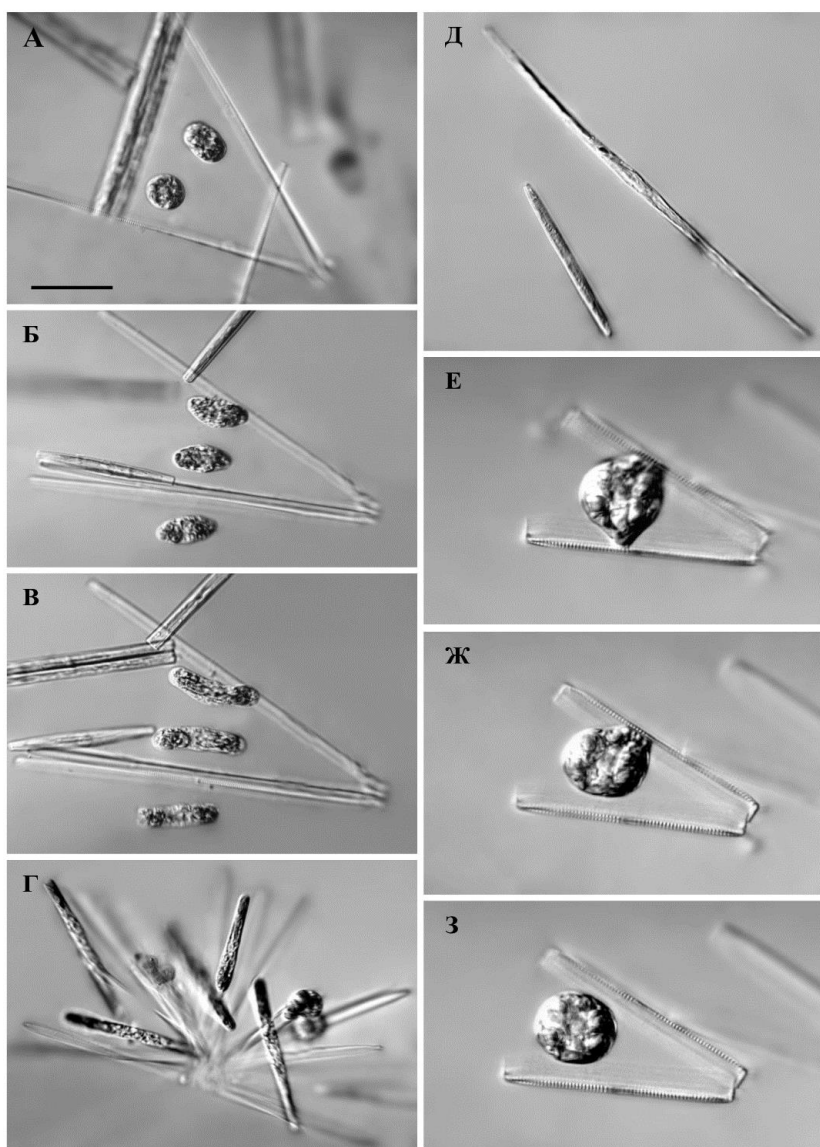


Рисунок 2 — *Ulnaria ulna*, формирование ауксоспор и педогаметия. А – зигота (вверху) начала биполярное удлинение; Б–Г – стадии роста ауксоспор; Д – инициальная клетка заметно длиннее одной из клеток родительских клонов; Е–З – педогаметное воспроизведение в женском клоне. Масштаб 20 мкм (А–Д) и 10 мкм (Е–З)

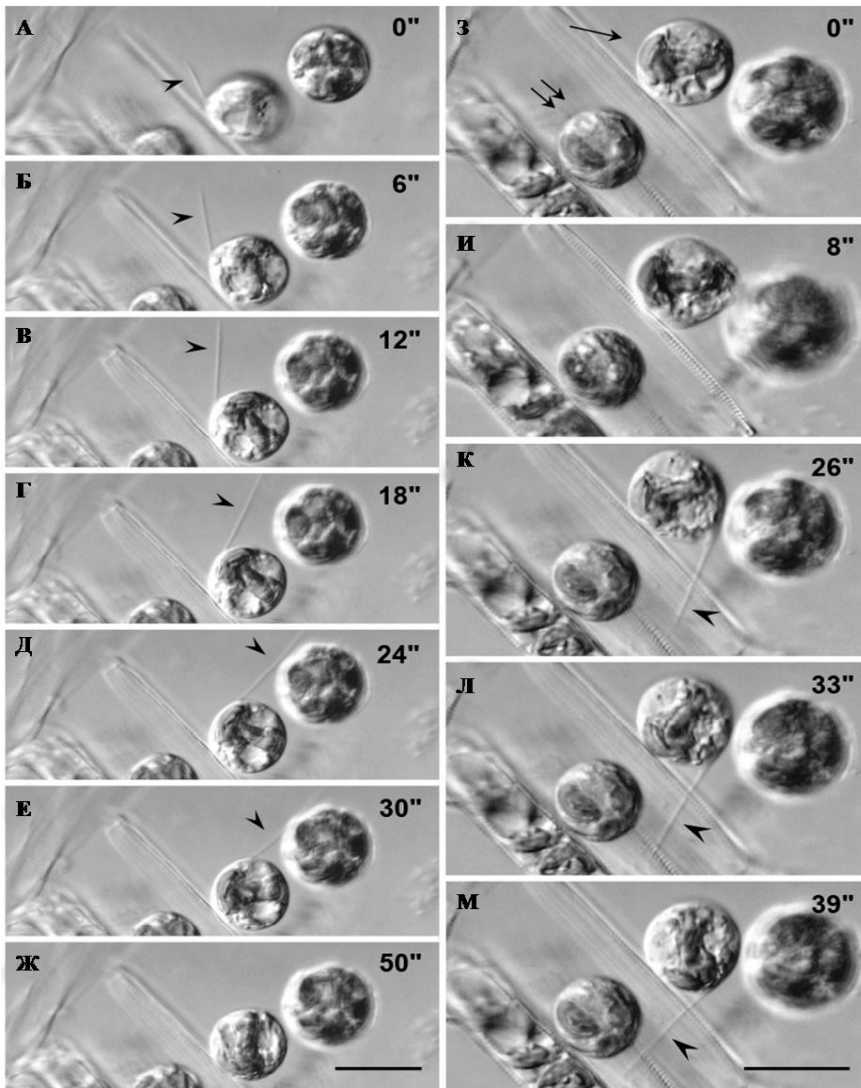


Рисунок 3 — *Ulnaria ulna*, два цикла формирования цитоплазматических выростов в мужских гаметах. А, З–И – начальные этапы псевдоподиальной активности, теряется сферическая форма клетки, появляется тонкий вырост; Б–Ж, К–М – псевдоподии удлиняются и провоцируют вращение гамет. Масштаб 10 мкм

Появление псевдоподий у неподвижных бесшовных пеннатных диатомей, в том числе рода *Ulnaria*, безусловно, позволяет мужским гаметам преодолевать значительные расстояния и способствует контакту с женскими гаметами, сингамии и успешному половому воспроизведению.

4.4 Системы скрещивания изученных видов рода *Ulnaria*

Системы скрещивания *Ulnaria ulna* и *U. danica* включают гомо- и гетероталлический способы воспроизведения. В мужских клонах внутриклоновое воспроизведение было аллогамным, в случае женских клонов мы наблюдали педогамное воспроизведение, аналогичное описанному Л. Гайтлером [Geitler, 1939], когда две женские гаметы, продуцируемые одним и тем же гаметангием, сливались, будучи прикрепленными к створкам материнской клетки (рис. 2 Е–З). У *U. acus* за все годы исследования не обнаружено ни одного случая гомоталлизма.

4.5 Генотипическое определение пола

Показано, что представители рода *Ulnaria* раздельнополые. Изучение пола потомства, полученного в результате внутриклонового воспроизведения, позволило установить характер детерминации пола. Был определен пол потомков, случайно выделенных из внутриклонового поколения трех мужских клонов *U. ulna* (Табл. 1), среди них присутствовали в равном соотношении как мужские, так и женские клоны. Из двух женских клонов *U. ulna* и *U. danica*, которые воспроизвелись партеногенетически в монокультуре и дали жизнеспособное потомство, изолировали в совокупности 12 клонов – потомков первого поколения. Все клоны оказались женскими. Таким образом, пол у представителей рода *Ulnaria* детерминирован генотипически и у мужских клонов является гетерогаметным, а женских – гомогаметным в отношении половых факторов.

Таблица 1 — Наследование пола у двух видов *Ulnaria* в первом поколении при внутриклоновом и межклоновом воспроизведении

Вид	Родительские клоны	Пол родителей	Количество клонов потомков первого поколения (F1)	
			F	M
Гетероталлическое воспроизведение				
<i>Ulnaria ulna</i>	9.0424-С 0.0513-В	М F	3	4
	0.0513-С 1. 0929-А	М F	2	2
	2.1130-Д 2.0419-Ж	М F	3	2
	9.0424-С 2.0903-Н	М F	3	3
	1.0929-Г 2.0903-Н	М F	3	4
<i>Ulnaria danica</i>	5.0901-С В 75/2	М F	2	1
	3.1121-А В 75/2	М F	2	2
Гомоталлическое воспроизведение				
<i>Ulnaria ulna</i>	9.0330-А	М	2	5
	2.1130-Д	М	3	1
	9.0626-Д	М	2	2
	9.0424-А	F	7	0
<i>Ulnaria danica</i>	В 75/2	F	5	0

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

Глава 5 Биogeография и репродуктивная изоляция представителей рода *Ulnaria* на Евразийском континенте

5.1 Распространение вида и репродуктивная совместимость популяций *Ulnaria acus*

Все изученные клоны *U. acus* из географически удаленных популяций оказались способными вступать в гетероталлическое половое воспроизведение при внутривидовых и межвидовых скрещиваниях в смесях клонов противоположного пола. Межвидовое воспроизведение подтверждалось разными размерами клеток в клонах, используемых для скрещивания. Таким образом, никаких очевидных презиготических барьеров не было обнаружено для клонов *U. acus*, выделенных из всех изученных популяций. Потомство, полученное от межвидовых скрещиваний, оказалось жизнеспособным. Часть клонов–потомков первого поколения ввели в культуру и при достижении критического размера, при котором клоны становились способными к половому воспроизведению, проверили на возможность скрещиваться друг с другом и с родительскими клонами. Было установлено, что все изученные потомки первого поколения от межвидовых скрещиваний *U. acus* фертильны и способны скрещиваться в комбинациях, соответственно своему полу.

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

Мы изучили репродуктивную совместимость представителей 15 популяций *Ulnaria* cf. *ulna*, изолированных из водоемов, расположенных на территории Евразии и Северной Африки (табл.2).

На основании данных проверки репродуктивной совместимости/изоляции клонов *U. cf. ulna* из евразийских популяций, можно констатировать, что на территории Евразии обитает два вида: в западной части континента – *U. ulna*, в восточной – *U. danica* (рис. 4). *U. ulna* и *U. danica* имеют слабые морфологические отличия, что создает трудности при определении и позволяет считать их криптическими/полукриптическими видами. Этим объясняется тот факт, что *U. danica* долгое время рассматривалась на уровне варьета как *Synedra ulna* var. *danica* (Kützing) Grunow [Van Heurck, 1885]. Виды *U. ulna* и *U. danica* соседствуют и, вероятнее всего, симпатрически обитают в водоемах Западно-Сибирской низменности и граничащих с ней территорий. Однако, в настоящее время у нас нет объективных доказательств находок *U. ulna* в восточной Евразии, а *U. danica* в Европе, которые бы подтверждались экспериментами по скрещиванию.

Таблица 2 — Межпопуляционное воспроизведение в смешанных культурах клонов *Ulnaria* cf. *ulna* из географически удаленных популяций

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

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

Межвидовая гибридизация *U. ulna* и *U. danica* показана в культуре и, скорее всего, может встречаться в зоне симпатрического обитания видов в природе. Однако, такая гибридизация у представителей рода *Ulnaria* не приводит к формированию фертильных носителей объединенного генотипа.

Комплекс криптических/полукриптических видов *U. cf. ulna* может включать в себя гораздо больше видов. Так, например, в экспериментах по скрещиванию участвовал клон *Ulnaria* В155 из оз. Фролиха, который не скрестился ни с одним другим клоном. Этот клон М. Куликовский с соавторами

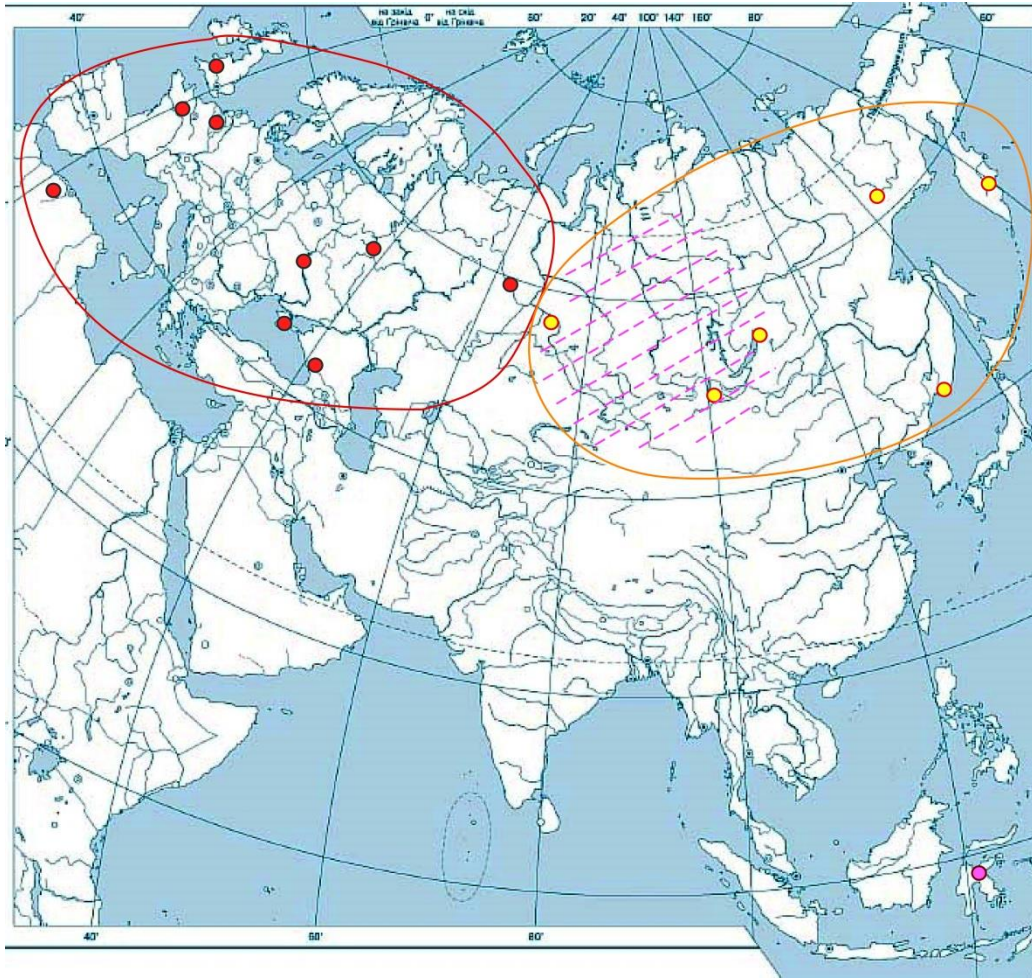


Рисунок 4 — Локализация изученных популяций *Ulnaria ulna* (красные точки) и *Ulnaria danica* (желтые точки) на Евразийском континенте. Розовой точкой отмечены популяция *Ulnaria* из индонезийского озера Матана. Красной линией отмечена зона распространения *Ulnaria ulna*, желтой – *U. danica*. Розовой штриховкой обозначена зона образования межвидовых гибридов

описал как *U. pilum* [Kulikovskiy, 2016]. Отсутствие случаев положительного аукоспорообразования при многократном скрещивании с клонами из всех изученных популяций может служить подтверждением выделения нового вида. Клоны *U. cf. ulna* из индонезийского озера Матано воспроизводились гетероталлически в пределах своей популяции, но нами не было отмечено успешного скрещивания клонов из этой островной популяции с другими популяциями Евразийского континента (табл. 2). Согласно полученным нами данным, представителя *Ulnaria* из оз. Матано надо признать самостоятельным биологическим видом, отличающимся от *U. ulna* и *U. danica*.

Таким образом, использование в нашей работе критерия репродуктивной совместимости/изоляции для одного из изученных видов – *Ulnaria acus* – подтвердило широкое распространение вида, а для комплекса *U. cf. ulna* доказало

существование на территории Евразии как минимум трех, а возможно, и более криптических видов. Несмотря на то, что все упомянутые виды относятся к одному роду и обитают на территории одного континента, между популяциями видов комплекса *U. cf. ulna* возникла репродуктивная изоляция, разделившая их на несколько генетических линий.

5.3 Репродуктивные границы и филогения рода *Ulnaria*

Мы проанализировали генетические последовательности *rbcL* (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы большой субъединицы рРНК) (рис 5), что позволило установить филогенетические отношения между изученными клонами

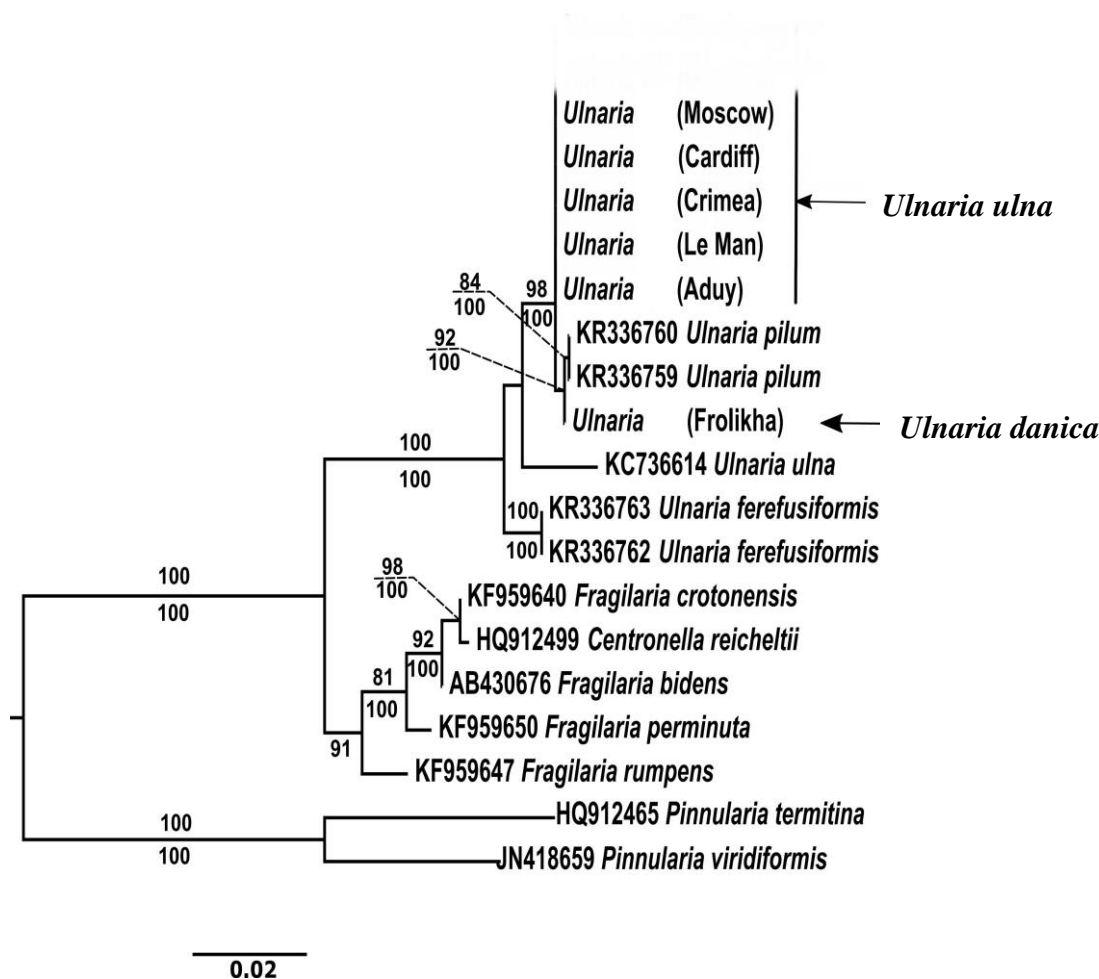


Рисунок 5 — Дендрограмма, построенная для клонов *Ulnaria cf. ulna* из разных популяций Евразийского континента на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *rbcL*. Для изученных представителей рода *Ulnaria* указана популяция, для остальных диатомовых водорослей — номер доступа к последовательностям в GenBank. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа для анализа по методу максимального правдоподобия, под горизонтальными линиями — значения Байесовских апостериорных вероятностей

рода *Ulnaria*. Диатомеи из рода *Ulnaria* с достаточной степенью достоверности образуют единую кладу среди бесшовных пеннатных диатомовых водорослей, которая состоит из двух субклад – клонов, относящихся к *U. acus* и *U. cf. ulna*. В свою очередь внутри клады *U. cf. ulna* можно выделить субклады, соответствующие трем разным видам – *U. ulna*, *U. danica*, и *U. pilum*. В отношении представителей рода *Ulnaria* филогенетическое разделение видов по гену *rbcL* соответствует показанной выше репродуктивной изоляции между видами.

Таким образом, молекулярно-генетические данные подтверждают выводы, полученные с применением методов репродуктивной биологии; последние особенно эффективны при разграничении криптических/полукриптических видов.

Заключение

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

ВЫВОДЫ

1. Система скрещивания *Ulnaria ulna* и *U. danica* включает в себя гетеро- и гомоталлический способы воспроизведения, тогда как у *U. acus* случаев гомоталлизма не отмечено.
2. При гетероталлическом воспроизведении у всех изученных представителей рода *Ulnaria* половой процесс проходит по единой схеме.
3. Проблема доставки гамет к месту сингамии у представителей рода *Ulnaria* решается за счет перемещения мужских гамет, обусловленного периодическим формированием на их поверхности цитоплазматических выростов.
4. Установлено генотипическое определение пола у представителей рода *Ulnaria*, при этом мужской пол является гетерогаметным, а женский – гомогаметным в отношении половых детерминант.
5. На Евразийском континенте географически удаленные популяции *U. acus* репродуктивно совместимы, что доказывает широкое распространение вида.
6. Показано, что слабо отличающиеся морфологически виды *U. ulna* и *U. danica*, репродуктивно изолированы друг от друга. Западная часть Евразийского континента заселена *Ulnaria ulna*, восточная – *U. danica*.

7. Клоны из всех популяций *U. ulna* и популяций *U. danica*, расположенных на территории от Западно-Сибирской низменности до оз. Байкал, способны к гибридизации с образованием жизнеспособных, но стерильных потомков. Клоны из популяций *U. danica*, расположенных на востоке Евразийского континента, не вступают в процесс полового воспроизведения с клонами *U. ulna*.
8. На примере представителей рода *Ulnaria* показано, что критерий репродуктивной совместимости/изоляции является одним из важнейших при решении вопросов идентификации и разграничения видов, как в таксономическом, так и в биогеографическом плане.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Davidovich N.A. Reproductive properties of diatoms significant for their cultivation and biotechnology / N.A. Davidovich, O.I. Davidovich, **Yu.A. Podunay**, Shorenko K.I., Kulikovskii M.S. // Russian Journal of Plant Physiology. – 2015. – Vol. 62, iss. 2. – P. 153–160. Doi: 10.1134/S1021443715330018.
2. **Podunay Yu.A.** Effect of culture density on sexual reproduction of *Ardissonaea crystallina* (Bacillariophyta) inhabiting the Black Sea / **Yu.A. Podunay**, O.I. Davidovich, N.A. Davidovich // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2016. – Vol. 71, iss. 2. – P. 82–86. Doi: 10.3103/S0096392516020085.
3. Давидович Н.А. Коллекция культур диатомовых водорослей Карадагской научной станции (Крым) / Н.А. Давидович, О.И. Давидович, **Ю.А. Подунай** // Морской биологический журнал. – 2017. – Т. 2, №1. – С. 18–28. Doi: 10.21072/mbj.2017.02.1.03.
4. Davidovich N.A. *Ardissonaea crystallina* has a type of sexual reproduction that is unusual for centric diatoms / N.A. Davidovich, O.I. Davidovich, **Y.A. Podunay**, R. Gastineau, I. Kaczmarska, A. Poulíčková, A. Witkowski // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. Article number: 14670. Doi: 10.1038/s41598-017-15301-z.
5. **Подунай Ю.А.** Особенности полового воспроизведения и система скрещивания *Ulnaria acus* (Bacillariophyta) / **Ю.А. Подунай**, Н.А. Давидович, М.С. Куликовский, Е.С. Гусев. // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2018. – Т. 1, №1. – С. 75–87. Doi: 10.17516/1997-1389-0034.
6. Полякова С.Л. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей / С.Л. Полякова,

О.И. Давидович, **Ю.А. Подунай**, Н.А. Давидович // Морской биологический журнал. – 2018. – Т. 3, № 2. – С. 73–78. Doi: 10.17516/1997-1389-0034.

7. Kaczmarek I. Structure and development of the auxospore in *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow demonstrates another way for a centric to look like a pennate / I. Kaczmarek, J.M. Ehrman, N.A. Davidovich, O.I. Davidovich, **Yu.A. Podunay** // Protist. – 2018. – Vol. 169, iss. 4. – P. 466–483. Doi: 10.1016/j.protis.2018.05.001

8. Davidovich N.A. Decontamination of diatom algae cultures contaminated with the kinetoplastid *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832 / N. A. Davidovich, O. I. Davidovich, **Yu.A. Podunay**, S. L. Polyakova, R. Gastineau // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2019. – Vol. 74, iss. 2. – P. 63–68. Doi: 10.3103/S0096392519020032.

9. **Podunay Yu.A.** The sexual reproduction and life cycle of the pennate diatom *Entomoneis cf. paludosa* (W. Smith) Reimer (Bacillariophyta) / **Yu.A. Podunay**, N.A. Davidovich, O.I. Davidovich, A. Witkowski, R. Gastineau, C.N. Solak // Russian Journal of Marine Biology. – 2021. – Vol. 47. – P. 19–28. Doi: 10.1134/S1063074021010089

10. **Podunay Yu.A.**, Davidovich O.I., Davidovich N.A. Reproductive compatibility of European populations of two species of *Ulnaria* (Bacillariophyta) // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2021. – Vol. 76, iss. 2. – P. 59–64. Doi: 10.3103/S009639252102005

Статьи в других научных изданиях:

11. **Podunay Yu.A.** Mating system and two types of gametogenesis in the fresh water diatom *Ulnaria ulna* (Bacillariophyta) / **Yu.A. Podunay**, O.I. Davidovich, N.A. Davidovich // Альгология. – 2014. – Т. 24, № 1. – С. 3–19. Doi: 10.15407/alg24.01.003

12. Давидович Н.А. Об отсутствии биологической репродуктивной изоляции между аллопатрическими популяциями *Synedra ulna* (Bacillariophyta) / Н.А. Давидович, **Ю.А. Подунай**, О.И. Давидович // Наукові записки Тернопільського державного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія. – 2010. – Т. 43, № 2. – С. 153–156.

13. **Подунай Ю.А.** Морфологическая вариабельность клонов *Ulnaria ulna* (Bacillariophyceae) из удаленных популяций Евразийского континента /

Ю.А. Подунай, К.И. Шоренко, С.А. Андреева, Н.А. Давидович // Вопросы современной альгологии. – 2017. – Т. 13, № 1. <http://algology.ru/1103>

Материалы и тезисы конференций (выборочно):

14. **Подунай Ю.А.**, Давидович Н.А., Куликовский М.С. Половое воспроизведение и система скрещивания *Ulnaria acus* (Kützing) M. Aboal (Bacillariophyta) // Морские биологические исследования: достижения и перспективы : в 3-х т. : сборник материалов Всероссийской научно–практической конференции с международным участием, приуроченной к 145–летию Севастопольской биологической станции (Севастополь, 19–24 сентября 2016 г.) / под общ. ред. А.В. Гаевской. – Севастополь: ЭКОСИ–Гидрофизика, 2016. – Т. 1. – С. 257–259.

15. **Подунай Ю.А.**, Давидович Н.А., Давидович О.И. Изучение биогеографии диатомовых водорослей с использованием методов репродуктивной биологии на примере рода *Ulnaria* // "Pontus Euxinus 2017": тезисы X Всероссийской научно–практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем, в рамках проведения Года экологии в Российской Федерации (11–16 сентября 2017 г.). Севастополь: DigitPrint, 2017. – С. 166–169.

16. **Подунай Ю.А.**, Давидович Н.А., Давидович О.И. Изучение биогеографии диатомовых водорослей в связи с их применением в биотехнологии // Научные исследования на заповедных территориях: Тезисы докладов Всероссийской научной конференции, посвящённой 160-летию со дня рождения основателя Карадагской научной станции, доктора медицины, приват-доцента Московского университета Терентия Ивановича Вяземского, а также Году особо охраняемых природных территорий и Году экологии в России (г. Симферополь, 09–14 октября 2017 г.) / под общ. ред. к.г.н. Горбунова Р.В. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2017. – С. 55.

17. **Подунай Ю.А.**, Давидович Н.А., Куликовский М.С., Гусев Е.С. Об отсутствии репродуктивных барьеров между популяциями *Ulnaria acus* s.l., обитающими в азиатской части Евразийского континента // Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований: Материалы XV международной научной конференции (XV Диатомовая школа), пос. Борок, Ярославская область, 24–27 августа 2017 года. – Ярославль: Филигрань, 2017. – С. 52–53.

18. Davidovich N.A., **Podunay Y.A.**, Davidovich O.I., Kulikovskiy M. Reproductive compatibility of Eurasian populations of *Ulnaria ulna* // Abstracts of the 25th

International Diatom Symposium, Berlin, 25-30 June 2018. Kusber, W.-H., Abarca, N., Van, A.L., Jahn, R. (eds.). – Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin. – P. 43.

19. **Подунай Ю.А.**, Давидович Н.А. Дефицит силиката натрия в среде как фактор ингибирования культуры диатомовых водорослей на примере рода *Ulnaria*. // Водные биоресурсы и аквакультура юга России: материалы Всероссийской научно-практической конференции, приуроченной к 20-летию открытия в Кубанском государственном университете направления подготовки «Водные биоресурсы и аквакультура» /отв. Ред. Г.А. Москул. – Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2018. С. 370–375

Научное издание

Подунай Юлия Александровна

**Половое воспроизведение, система скрещивания и биогеография
представителей рода *Ulnaria* (Kutzing) Compère (Bacillariophyta)**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Название типографии

Адрес

Телефон

Подписано в печать __.__.2022

Формат ...Усл. печ. лист 1,5

Бумага офсетная. Тираж 100 экз. Заказ №