

УДК 582.261

ДИАТОМОВАЯ ВОДОРΟΣЛЬ С ОДНОДОМНЫМ И ДВУДОМНЫМ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕМ**А. М. РОЩИН**

В культуре изучались два клона бентосной диатомовой водоросли *Synedra tabulata*. Оба клона оказались способными к однодомному воспроизведению. Ауксоспорообразование происходило в двух диапазонах длины материнских клеток и в обоих из них зависело от сезонных условий освещения. Половой процесс изогамный. В каждой материнской клетке образуются две шарообразные гаметы. Способность к однодомному воспроизведению оказалась ограниченной. Один клон произвел два поколения однодомного происхождения, второй — только одно. Поколения, не способные к дальнейшему однодомному воспроизведению, обнаружили способность к двудомному воспроизведению с анизогамным половым процессом.

Виды диатомовых водорослей, изученные к настоящему времени, в большинстве своем однодомны, т. е. способны к половому воспроизведению внутри одного клона (Lewin, Guillard, 1963; Drebes, 1977). Более 20 лет назад были обнаружены два двудомных вида: *Rhabdonema adriaticum* (Stosch, 1958) и *Grammatophora marina* (Magne-Simon, 1962). Из них лишь первый вид подробно изучен в культуре. Половой процесс и образование аукоспор у *R. adriaticum* возможны только при соединении двух клонов — мужского и женского.

Морская диатомовая водоросль *Synedra tabulata* (Ag.) Kütz, var. *tabulata* Kütz. оказалась способной как к однодомному, так и к двудомному воспроизведению. В данной статье излагаются результаты изучения этого вида в лабораторной культуре.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал для выведения клоновых культур *S. tabulata* брали с прибрежного каменистого мелководья в районе Карадага на глубине до 20 см. Соскоб бурого оброста камней помещали в чашку Петри, заливали питательной средой, размешивали стеклянной палочкой. Через сутки, когда жизнеспособные клетки уже совершали хотя бы одно деление, одну из них отмывали проводкой через несколько чашек с профильтрованной и пастеризованной морской водой и переносили в питательную среду для наращивания клоновой культуры.

Культуры выращивали в чашках Петри диаметром 9 см с 40 мл среды при рассеянном дневном свете от окна, обращенного на север, и температуре $20 \pm 2^\circ$. Среда культивирования содержала в 1 л трижды пастеризованной морской воды (в мг): KNO_3 —202, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ —17,9, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,278, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —0,198, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —0,238, двузамещенная натриевая соль ЭДТА—3, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —1,2, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ —10, витамин B_{12} —2 мкг. Пересевы в свежую среду проводили через каждые 5—7 дней. После пересева клетки *S. tabulata* прикрепляются к дну чашки Петри одним концом и, приступив к размножению, образуют непрочные кустиковидные колонии. При дальнейшем размножении в каждом кустике появляются неприкрепленные клетки, лежащие на дне чашки. Густая культура представляет собой беспорядочную россыпь неприкрепленных клеток, способных парить над дном чашки при колебаниях среды. В перенаселенной культуре все клетки становятся двойными, так как их последнее деление до конца не завершается. Далее следует отмирание клеток и разрушение их содержимого. Пересевы делались до наступления перенаселения.

Наблюдения за ростом культур проводились под микроскопом МБС-1 при увеличении 25 и 50. Длину клеток и диаметр гамет измеряли

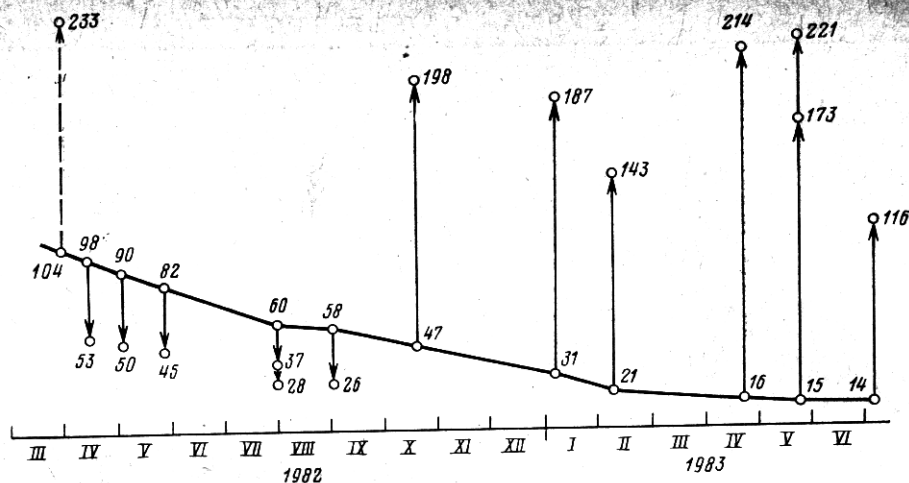


Рис. 1. Вегетативный рост и ауксоспорообразование в культуре А. Стрелки, направленные вверх, и сопровождающие их числа обозначают увеличение длины клеток (мкм) в процессе ауксоспорообразования. Наклонная линия отражает медленное, а стрелки, направленные вниз, — скачкообразное уменьшение длины клеток. По горизонтали — год и месяц. Пояснения в тексте

окуляр-микрометром под микроскопом Nf («Karl Zeiss», Jena) при цене деления 1 мкм. Как было установлено ранее (Рощин, 1982), в клонных культурах достаточно измерить 10 клеток, чтобы получить репрезентативную выборку. В тексте и таблицах приводятся средняя арифметическая и ее ошибка ($M \pm m$).

Мелкие клетки, появившиеся в культурах с большой регулярностью, обычно удаляли капиллярной пипеткой, время от времени используя их для измерения длины. Но иногда культуры так засорялись мелкими клетками, что очистить их путем прополки было невозможно. В таких случаях делали более разреженные, чем обычно, пересевы и выделяли один-два кустика клеток типичной для данной культуры длины, чтобы заново нарастить каждую культуру. Для наращивания использовали чашки Петри диаметром 5 см с 7 мл среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. *Однодомное воспроизведение. Клон А.* Клетка, давшая начало этому клону, была выделена 9 марта 1982 г. Около двух недель в культуре А наблюдался только вегетативный рост. 22 марта в двух скоплениях клеток были обнаружены россыпи шарообразных гамет и пустые панцири, а на следующее утро здесь были уже полностью сформировавшиеся крупные клетки. Тогда же россыпи гамет были найдены еще в четырех скоплениях клеток, в которых к следующему утру также появились крупные клетки. Образование гамет и крупных клеток продолжалось по 2 апреля. 30 марта длина материнских клеток составляла $104 \pm 0,6$ мкм, новых крупных — $233 \pm 3,1$ мкм (рис. 1). Однако крупные клетки оказались нежизнеспособными. Размножить их в отдельной культуре не удалось, так как после нескольких делений они отмирали, хотя одна из них смогла образовать кустик из 10 клеток. Выяснить причины нежизнеспособности крупных клеток и подтвердить наличие диапазона ауксоспорообразования в окрестностях длины клеток 104 мкм предстояло в будущем.

После прекращения образования гамет и крупных клеток вновь наблюдался только вегетативный рост, но вскоре пришлось столкнуться с явлением, необычным для диатомовых водорослей. 12 апреля в культуре А впервые была обнаружена кучка клеток, которые по длине почти в 2 раза уступали остальным. Эти клетки изолировали в отдельную культуру Ам, где они сразу же начали хорошо размножаться. 15 апреля длина

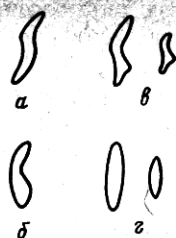


Рис. 2

Рис. 2. Форма створки мелких клеток *Synedra tabulata*. а — в культурах А и Ам; б — в культурах первого (А-1) внутриклонового поколения клона А; в — в культурах второго (А-2) внутриклонового поколения клона А; г — в культурах клона Б. Увел. 150

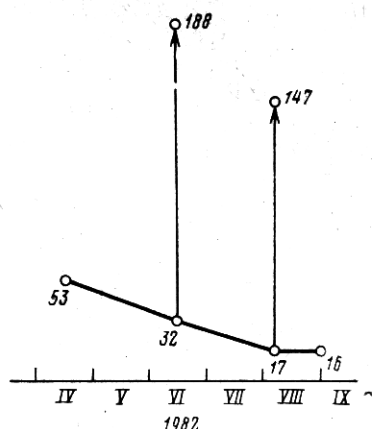


Рис. 3

Рис. 3. Вегетативный рост и аукоспорообразование в культуре Ам. Обозначения как на рис. 1

клеток культуры А составляла $98 \pm 0,9$ мкм, культуры Ам — $53 \pm 0,4$ мкм (рис. 1). В дальнейшем мелкие клетки появлялись регулярно, но неравномерно. В дневнике наблюдений того времени назойливое повторение фразы: «В культуре А опять появились мелкие клетки» — не столь часто, но регулярно перемежалось записью: «Образование мелких клеток в культуре А, кажется, прекратилось». Последний раз мелкие клетки были обнаружены 2 сентября. Длина их составляла $26 \pm 0,4$ мкм при длине обычных клеток $58 \pm 0,9$ мкм. Регулярное появление мелких клеток в культуре *S. tabulata* поставило перед нами новые вопросы: 1) как образуются мелкие клетки? 2) с чем связана неравномерность их появления? 3) каков биологический смысл этого явления? Найти ответ предстояло в будущем.

Как видно из рис. 1, 12 октября в культуре А при длине клеток около 50 мкм вновь началось образование гамет и крупных клеток, закончившееся лишь в начале июля 1983 г., когда длина клеток уменьшилась до $14 \pm 0,6$ мкм. Далее последовало отмирание мелких клеток. На протяжении всего этого времени крупные клетки появлялись регулярно, но измерялись они нами значительно реже. Таким образом, водоросль *S. tabulata* способна к однократному воспроизведению в клоновой культуре. В образовании гамет и крупных клеток наблюдались строгая суточная периодичность и синхронность. Россыпи гамет всегда обнаруживались в 8 ч, в начале второй половины дня можно было видеть различные ступени слияния гамет, в 16—17 ч — начавшие рост аукоспоры, а на следующее утро — полностью сформированные крупные клетки. В каждой клетке-гаметангии образуются две шарообразные гаметы. Диаметр гамет 12—15 мкм. Половой процесс изогамный, как и у пресноводных видов *Synedra* Ehr., изученных Гейтлером (Geitler, 1973).

Для *S. tabulata* характерны два диапазона аукоспорообразования: верхний и нижний, разделенные большим промежутком вегетативного роста. С таким явлением мы уже встречались у водоросли *Achnanthes longipes* (Рощин, 1984). Вегетативный рост между диапазонами аукоспорообразования продолжался немногим больше 6 мес, а аукоспорообразование в нижнем диапазоне — около 9 мес. Нижний диапазон аукоспорообразования, по терминологии Стоша (Stosch, 1958), открыт снизу, так как самые мелкие клетки способны к образованию гамет и аукоспор. При длине клеток 60—70 мкм появляется едва заметное искривление створок, которое постепенно усиливается. Створки длиной 40 мкм уже сильно сигмоидны (рис. 2, а).

Принято считать, что клетки диатомовых водорослей в процессе аукоспорообразования увеличиваются по длине или диаметру в 2,5—3 раза (Drebes, 1977). У *S. tabulata* этот показатель сильно изменяется в зави-

симости от длины материнских клеток. В верхнем диапазоне культуры А клетки увеличивались в длину в 2,2 раза, в нижнем кратность увеличения возрастала от 4,2 до 14,7. Вряд ли еще найдется водоросль, у которой линейный размер клеток мог бы увеличиваться больше чем в 15 раз.

У всех диатомовых водорослей, за единичными исключениями (Lewin, Guillard, 1963), вегетативное размножение клеток сопровождается медленным, постепенным уменьшением их размеров. Это обусловлено вставочным механизмом образования новых створок, благодаря которому после каждого клеточного деления одна из дочерних клеток уменьшется, как полагают, на двойную толщину панциря (Михайлова, 1960). Медленное уменьшение размеров клеток свойственно и *S. tabulata* (рис. 1), но, в дополнение к нему, у этой водоросли наблюдается еще резкое, скачкообразное уменьшение длины немногих клеток. К чему это ведет, предполагалось выяснить с помощью культуры Ам, полученной за счет скачкообразного уменьшения длины клеток с 98 до 53 мкм. Чтобы достигнуть такого же изменения размеров путем медленного уменьшения клеток, культуру А потребовалось выращивать не меньше 5 мес. Столь значительное сокращение периода вегетативного роста передвинуло диапазон аукоспорообразования в культуре Ам в другие сезонные условия. Если в культуре А аукоспорообразование началось в октябре, то в культуре Ам первая крупная клетка появилась 9 июня (рис. 3) при иной интенсивности и продолжительности инсоляции. В этих условиях освещения верхняя размерная граница аукоспорообразования оказалась сдвинутой вниз: в культуре А аукоспорообразование началось при длине клеток около 50 мкм, в культуре Ам — при $32 \pm 0,4$ мкм. Наряду с сокращением диапазона аукоспорообразования в культуре Ам было значительно меньше образующихся крупных клеток. В основном появлялось по одной клетке даже не в каждом пассаже. Только 6 августа удалось измерить 10 клеток. Все это позволяет заключить, что в данном случае аукоспорообразование оказалось передвинутым в менее благоприятные условия освещения.

Первая крупная клетка, появившаяся в культуре Ам 9 июня, была перенесена в отдельную чашку, где 11 июня насчитывалось уже 29 клеток, т. е. клетки делились больше 2 раз в сутки. Эта культура, представляющая собой первое внутриклоновое поколение клона А, была обозначена как А-1. 14 июня длина ее клеток составляла $188 \pm 0,4$ мкм. В работе с культурой А-1 скачкообразное уменьшение клеток использовалось уже сознательно, чтобы передвинуть аукоспорообразование на другие сезоны. 2 августа 1982 г. при длине клеток культуры А-1 $164 \pm 0,5$ мкм в ней впервые появились более мелкие клетки длиной $82 \pm 0,7$ и $119 \pm 0,8$ мкм. Клетки длиной $119 \pm 0,8$ мкм по своим размерам близки к верхнему диапазону аукоспорообразования, поэтому они были изолированы в отдельную культуру А-1м. В этой культуре 30 августа в свою очередь появились более мелкие клетки длиной $77 \pm 0,3$ мкм, близкие по размерам к нижнему диапазону аукоспорообразования. Они дали начало культуре А-1мм. Культуры А-1, А-1м и А-1мм выращивались до отмирания предельно измельчавших клеток как представители первого внутриклонового поколения.

Первой завершила свой жизненный цикл культура А-1мм (рис. 4). Крупные клетки начали появляться в ней с 5 октября. 14 октября длина материнских клеток составляла $66 \pm 0,7$ мкм. Рассеянное естественное освещение в октябре следует признать очень благоприятным для начала аукоспорообразования в нижнем диапазоне. В культуре А аукоспорообразование началось также в октябре (рис. 1), но при длине материнских клеток $47 \pm 0,5$ мкм. Ее клетки достигли длины 66 мкм в июле, но потенциальная способность их к образованию аукоспор не реализовалась вплоть до октября. Получается, что условия освещения в июле — сентябре неблагоприятны для аукоспорообразования в верхней части диапазона. В культуре Ам (рис. 3) клетки были потенциально способны к образованию гамет и аукоспор в апреле (длина $53 \pm 0,4$ мкм), но началось образование аукоспор только в июне при длине клеток $32 \pm 0,4$ мкм.

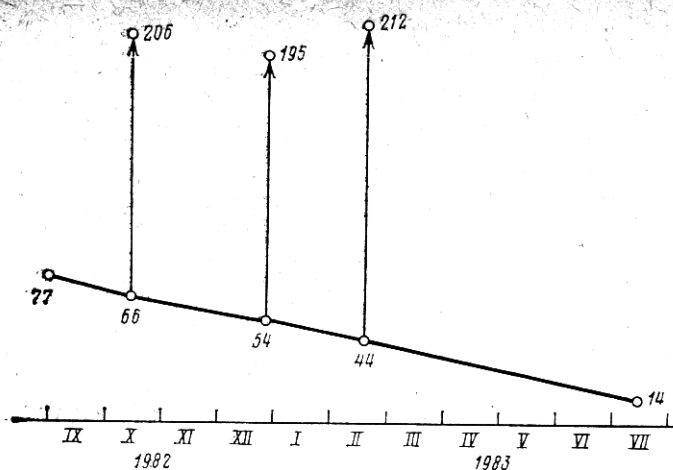


Рис. 4. Вегетативный рост и аукоспорообразование в культуре А-1мм. Обозначения как на рис. 1

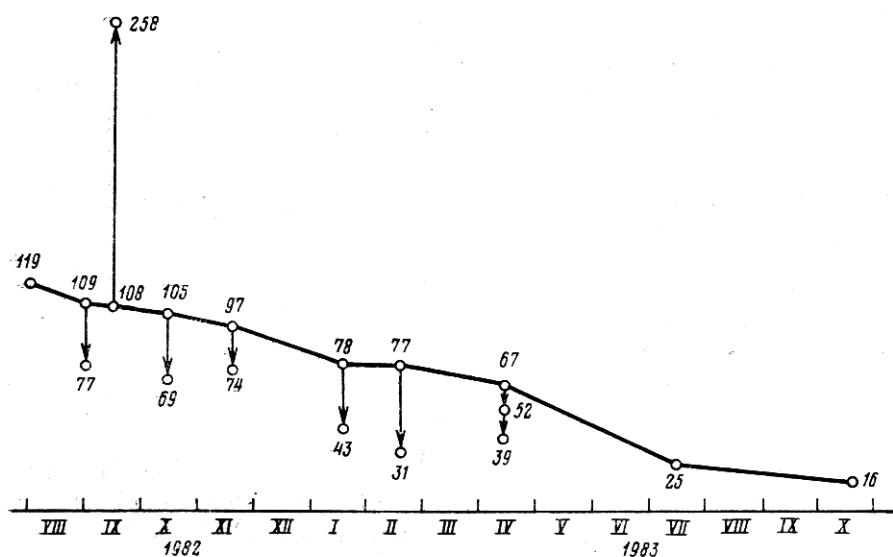


Рис. 5. Вегетативный рост и аукоспорообразование в культуре А-1м. Обозначения как на рис. 1

Отсюда следует, что в нижнем конце диапазона аукоспорообразование более устойчиво к высокой интенсивности и летней продолжительности освещения, чем в верхнем, для которого неблагоприятный период теперь уже можно распространить на апрель — сентябрь. Зависимость положения верхней размерной границы аукоспорообразования от условий освещения была отмечена также у *Melosira nummuloides* (Bruckmayer-Berkenbusch, 1954) и *Achnanthes longipes* (Рощин, 1984).

В культуре А-1мм неожиданным оказалось положение нижней размерной границы аукоспорообразования. Последние крупные клетки появились 17 февраля 1983 г. при длине материнских клеток $44 \pm 0,6$ мкм (рис. 4), а далее наблюдался только вегетативный рост. Диапазон аукоспорообразования оказался закрытым снизу (Stosch, 1958). Отмирание клеток, как и в культуре А, наступило в июле 1983 г., когда они уменьшились в длину до $14 \pm 0,3$ мкм. Раннее прекращение аукоспорообразования нельзя объяснить условиями освещения или другими внешними факторами, так как в этих же условиях образование аукоспор в культуре А продолжалось до предельного уменьшения клеток (рис. 1). Причину нужно искать в различиях самих клеток культур А и А-1мм. Как уже

Таблица 1

Медленное и скачкообразное
уменьшение длины клеток в культуре
А-1

Дата изме- рения	Длина клеток, мкм	
	медленное уменьше- ние	скачкооб- разное уменьшение клеток левого столбца
14.VI.1982	$188 \pm 0,4$	—
2.VIII	$164 \pm 0,5$	$82 \pm 0,7$
		$119 \pm 0,8$
1.IX	$155 \pm 0,4$	$89 \pm 5,1$
14.X	$143 \pm 0,5$	$91 \pm 2,5$
19.XI	$133 \pm 0,5$	$100 \pm 0,5$
28.XII	$128 \pm 0,8$	$97 \pm 0,5$
17.I.1983	$122 \pm 1,2$	$41 \pm 0,9$
		$70 \pm 3,3$
18.II	$115 \pm 0,8$	$69 \pm 1,3$
11.III	$111 \pm 0,4$	$27 \pm 0,6$
		$41 \pm 0,6$
29.III	$107 \pm 1,0$	$56 \pm 2,2$
		$79 \pm 1,1$
31.V	$87 \pm 1,5$	$89 \pm 0,7$
4.VII	$80 \pm 0,7$	$47 \pm 0,9$
		$35 \pm 0,3$
1.VIII	$68 \pm 0,5$	$52 \pm 0,7$
30.VIII	$64 \pm 0,4$	$29 \pm 0,4$
9.XI	$47 \pm 1,0$	$25 \pm 0,3$
7.II.1984	$29 \pm 0,7$	$23 \pm 0,6$
3.IV	$19 \pm 0,5$	—
16.V	$15 \pm 0,3$	—

Таблица 2

Уменьшение длины клеток и образование
гамет в культуре А-2

Дата изме- рения	Длина клеток, мкм	
	медленное уменьше- ние	скачкооб- разное уменьшение, образование гамет
16.IX.1982	$258 \pm 3,0$	—
14.X	$235 \pm 3,8$	$89 \pm 0,5$
23.XII	$218 \pm 1,2$	$92 \pm 2,7$
29.III.1983	$196 \pm 0,6$	$134 \pm 0,3$
7.IV	$193 \pm 1,6$	$68 \pm 0,8$
23.V	$179 \pm 0,4$	$119 \pm 1,0$
27.VI	$166 \pm 1,0$	$80 \pm 0,2$
1.VIII	$151 \pm 1,6$	$78 \pm 1,2$
19.IX	$134 \pm 1,0$	$105 \pm 0,6$
1.XI	$124 \pm 0,8$	$71 \pm 0,8$
4.I.1984	$120 \pm 0,3$	Гаметы
21.II	$110 \pm 0,4$	»
29.III	$104 \pm 0,6$	»
27.IV	$100 \pm 0,8$	$77 \pm 0,7$
24.V	$90 \pm 0,7$	$59 \pm 0,5$
14.VI	$84 \pm 1,4$	$43 \pm 1,1$
16.VII	$80 \pm 0,7$	$31 \pm 0,3$
16.VIII	$72 \pm 0,5$	$35 \pm 0,2$
11.X	$60 \pm 0,4$	$24 \pm 0,4$
15.X	$59 \pm 0,4$	Гаметы
15.XI	$54 \pm 0,3$	»
15.I.1985	$44 \pm 0,4$	»

отмечалось, мелкие клетки культуры А были симметрично изогнутыми (рис. 2, а). В культуре А-1мм мелкие клетки приобретали совсем другую форму: с одной стороны они выпуклые, с другой — несимметрично вогнутые (рис. 2, б). При такой форме панциря образование гамет почему-то прекращается, когда длина клеток становится меньше 44 мкм.

В культуре А-1м аукоспорообразование в верхнем диапазоне началось 9 сентября 1982 г. и продолжалось по 5 октября включительно. 16 сентября длина материнских клеток составляла $108 \pm 0,5$ мкм (рис. 5), а образовавшихся из аукоспор — $258 \pm 3,0$ мкм. Крупные клетки оказались вполне жизнеспособными и были переведены в отдельную культуру А-2 для изучения второго внутриклонового поколения. Таким образом, подтвердилось, что при длине клеток несколько больше 100 мкм действительно существует диапазон аукоспорообразования. Период с конца первой декады сентября по начало октября благоприятен по условиям освещения для образования аукоспор в этом диапазоне. После прекращения аукоспорообразования продолжался вегетативный рост культуры, сопровождавшийся скачкообразным уменьшением длины клеток. В нижнем диапазоне аукоспорообразование не состоялось по двум причинам. Клетки уменьшились до 66 мкм в длину к середине апреля 1983 г. Условия освещения в это время, как мы убедились на примере культуры Ам, неблагоприятны для образования аукоспор в верхней части диапазона. Мелкие клетки были так же несимметрично изогнуты, как в культуре А-1мм (рис. 2, б), поэтому при их длине меньше 44 мкм образование аукоспор не могло состояться.

Культура А-1 выращивалась около двух лет, с середины июня 1982 г. до середины мая 1984 г. (табл. 1). За это время длина клеток уменьшилась в 12,5 раза. В среднем клетки становились короче на 7 мкм в месяц. Измерение, проведенное 31 мая 1983 г., приходится как раз на середину всего периода роста культуры. За первую половину этого периода длина клеток уменьшилась на 101 мкм, за вторую — на 72 мкм, т. е. более круп-

ные клетки уменьшались несколько быстрее, чем более мелкие. Медленное уменьшение большинства клеток сопровождалось скачкообразным уменьшением длины немногих из них. Последний раз скачкообразное уменьшение произошло при длине клеток культуры $47 \pm 1,0$ мкм. Более мелкие клетки уже не способны к скачкообразному уменьшению. Минимальное уменьшение длины — в 1,2 раза, максимальное — в 4,1 раза, в среднем — в 2,0 раза. Ауксоспорообразование в культуре А-1 не состоялось ни в верхнем, ни в нижнем диапазоне. Клетки уменьшились в длину до 108 мкм близко к концу марта, когда условия освещения, как мы убедились в дальнейшем, мало благоприятны для образования гамет. До 66 мкм длина клеток уменьшилась в середине августа, в неблагоприятный по условиям освещения период для образования аукоспор в верхней части нижнего диапазона. В нижней части этого диапазона ауксоспорообразование не могло состояться по причинам, связанным с несимметричной изогнутостью клеток.

Культура А-1 не оставила после себя потомства, но его оставило ответвление этой культуры за счет скачкообразного уменьшения клеток. В культуре А-1м в благоприятные условия освещения передвинулся верхний диапазон ауксоспорообразования, в культуре А-1мм — нижний. Биологический смысл скачкообразного уменьшения длины клеток — перенос диапазонов ауксоспорообразования в другие сезонные условия, в том числе и в самые благоприятные, — здесь вполне очевиден. Результаты изучения культур А-1, А-1м и А-1мм дают основание для вывода, что первое внутрикловное поколение клона А способно к дальнейшему одноклоновому воспроизведению, если диапазон ауксоспорообразования совпадает с благоприятным сезонным периодом. Только клетки длиной меньше 44 мкм не способны к образованию аукоспор и в благоприятных условиях освещения.

В культуре А-2, представляющей второе внутрикловное поколение клона А, медленное уменьшение размеров клеток также сопровождалось скачкообразным уменьшением длины некоторых из них (табл. 2). В начале января 1984 г., когда длина клеток уменьшилась до $120 \pm 0,3$ мкм, началось образование гамет, причем до середины марта гаметы появлялись в таком большом количестве, какого раньше не отмечалось. Во второй половине марта не только резко снизилось количество образующихся гамет, но и наблюдались перерывы в их образовании — в ясную погоду их образование прекращалось, в пасмурную возобновлялось. Последний раз гаметы появились в пасмурные дни 28—29 марта при длине клеток культуры $104 \pm 0,6$ мкм. Очевидно, в середине марта интенсивность освещения достигла порогового уровня для образования гамет в верхнем диапазоне. В ясные дни второй половины месяца она уже превышала пороговый уровень, а в пасмурные возвращалась к допороговым значениям. Околопороговым уровнем освещения, вероятно, объясняется и формирование нежизнеспособных крупных клеток в верхнем диапазоне культуры А в конце марта — начале апреля 1982 г. (рис. 1). Но самое неожиданное и существенное отличие культуры А-2 состояло в том, что появление гамет во всем верхнем диапазоне не сопровождалось образованием аукоспор и крупных клеток. Забегая вперед, отметим, что в верхнем диапазоне субкультуры клона Б в тех же самых условиях с 27 февраля 1984 г. по 29 марта включительно происходило и образование гамет, и формирование крупных клеток. Следовательно, бесплодие культуры А-2 обусловлено внутренними причинами. Бесплодным оказался и нижний диапазон ауксоспорообразования, хотя в верхнем его конце с середины октября 1984 г. по 18 января 1985 г. наблюдалось образование гамет, которое прекратилось вскоре после того, как клетки уменьшились в длину до 44 мкм (табл. 2). Форма мелких клеток культуры А-2 была еще более уродливой (рис. 2, в), чем в культурах первого внутрикловного поколения, но размерная граница прекращения образования гамет в нижнем диапазоне осталась та же.

Из культуры А-2 в конце января 1984 г. была выделена одна мелкая клетка, давшая начало культуре А-2м. Длина клеток 21 февраля состав-

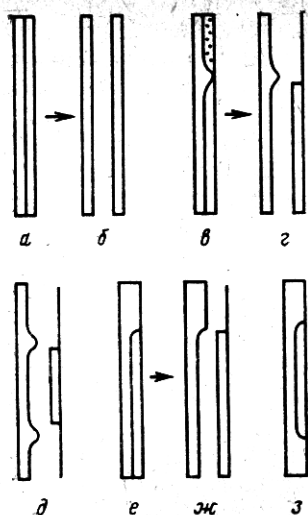


Рис. 6

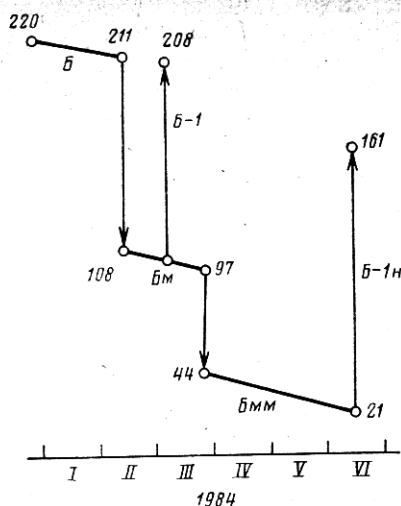


Рис. 7

Рис. 6. Обычный и видоизмененные варианты клеточного деления *Synedra tabulata*. а, б — обычное клеточное деление; в, г — деление с образованием выступа на створке одной из дочерних клеток; д — с образованием двух выступов; е, ж — деление с изгибом новой створки одной из дочерних клеток; з — с двумя изгибами, уменьшающими длину второй дочерней клетки с обоих концов

Рис. 7. Получение первого внутриклонового поколения клона Б в верхнем и нижнем диапазоне ауксоспорообразования. Пояснения в тексте

для $60 \pm 0,3$ мкм. Культура А-2м нарастала очень медленно, так как вскоре после начала размножения исходной мелкой клетки началось и образование гамет, что отвлекало от вегетативного размножения большой процент клеток. Гаметы появлялись в очень большом количестве, но гаметогенез также не сопровождался образованием ауксоспор и крупных клеток. Прекратилось образование гамет, как и в верхнем диапазоне культуры А-2, в конце марта, при длине клеток $54 \pm 0,4$ мкм, т. е. раньше, чем была достигнута размерная граница, ниже которой гаметы не образуются по причинам, связанным с несимметричной формой клеток. Пороговый уровень освещения для образования гамет оказался одинаковым как в верхнем диапазоне ауксоспорообразования, так и в верхнем конце нижнего диапазона.

Результаты изучения культур А-2 и А-2м привели к выводу об ограниченной однодомности клона А, так как второе внутриклоновое поколение оказалось неспособным к дальнейшему однодомному воспроизведению.

Клон Б. Клетка, давшая начало культуре Б, была выделена из пробы с каменистого мелководья 2 декабря 1983 г. В конце декабря длина клеток составляла $220 \pm 0,6$ мкм. В этой крупноклеточной культуре удалось выяснить, как происходит скачкообразное уменьшение длины клеток. Осуществляется оно в процессе вегетативного деления клетки, но в несколько видоизмененных вариантах обычного клеточного деления. Внутренняя створка одной из дочерних клеток формируется немного раньше, чем у другой из них, и при обычном клеточном делении она прямая (рис. 6, а). Параллельно ей образуется также прямая створка второй дочерней клетки. Получаются две одинаковые, на взгляд, клетки (рис. 6, б), различающиеся по их длине примерно на двойную толщину панциря. Как отмечалось выше, за месяц длина клеток уменьшается в среднем на 7 мкм, а за сутки происходит больше двух делений. Можно принять, не рискуя сильно исказить результат, что клетки делятся примерно 70 раз в месяц. Тогда получим, что в ходе каждого обычного деления одна из дочерних клеток становится короче ориентировочно на 0,1 мкм. В одном из видоизмененных вариантов деления на внутренней створке, которая

формируется первой, образуется закругленный выступ в сторону старой створки второй сестринской клетки, разделяющий ее содержимое на две неравные части (рис. 6, в). Меньшая часть, оказавшаяся без ядра, вскоре разрушается, а новая створка усеченной клетки достраивается только до выступа. В результате получаются клетки, различающиеся по длине не на доли, а на десятки мкм (рис. 6, г). Под старой длинной створкой укороченной клетки формируется другая створка, соответствующая новой длине клетки. Длинная створка рано или поздно отделяется. Это может произойти сразу же после формирования короткой клетки, а иногда короткая клетка успевает пройти не одно деление, все еще сохраняя длинную створку. На створке первой сестринской клетки может образоваться не один, а два выступа, расположенных по обе стороны от центра клетки, где находится ядро. Тогда вторая сестринская клетка становится усеченной с обоих концов (рис. 6, д). При наличии одного выступа длина клетки снижается меньше чем в 2 раза, а за счет двух выступов клетка может стать короче даже в 3—4 раза.

Во втором видоизмененном варианте клеточного деления уменьшение одной из сестринских клеток не сопровождается отмиранием части цитоплазмы. Новая створка первой сестринской клетки делает закругленный поворот в сторону старой створки второй из них и далее в непосредственной близости к этой створке дорастает до конца клетки (рис. 6, е). Цитоплазма между сестринскими клетками распределяется неравномерно. Та часть ее, которая в варианте с выступом отмирала, здесь входит в состав клетки, длина которой не уменьшается (рис. 6, ж). Усечение одной из сестринских клеток и в этом варианте может происходить не только с одного, но и с обоих концов (рис. 6, з). В том и другом случае панцирь более длинной сестринской клетки сохраняет отпечаток более короткой из них.

В ходе этого исследования, когда приходилось среди множества обычных делений отыскивать сравнительно редкие случаи, было отмечено, что легче всего необычные варианты деления обнаруживаются в периоды новолуния, тогда как в полнолуние вести поиск бесполезно. Дальнейшая многократная проверка подтвердила, что в новолуние частота образования укороченных клеток достигает максимума, а в полнолуние снижается до нуля. Таким образом, был получен ответ на вопрос, почему мелкие клетки появляются в культурах регулярно, но неравномерно.

Воспроизведение клона Б изучалось ускоренным путем, с максимальным использованием скачкообразного уменьшения длины клеток (рис. 7). В середине февраля 1984 г. из культуры Б при длине ее клеток $211 \pm 0,4$ мкм были выделены клетки длиной $108 \pm 0,4$ мкм, давшие начало культуре Бм. 27 февраля в этой культуре впервые появились шарообразные изогаметы, а 28 февраля — крупные клетки. Образование ауксоспор и крупных клеток продолжалось до конца марта. Во второй половине марта, как и в культуре А-2, образование гамет прекращалось в ясную погоду и возобновлялось в пасмурную. 6 марта одна крупная клетка была изолирована в отдельную культуру Б-1, представляющую первое внутриклоновое поколение клона Б, полученное в верхнем диапазоне ауксоспорообразования. 26 марта, во время перерыва в ауксоспорообразовании, в культуре Бм были найдены мелкие клетки длиной $44 \pm 0,4$ мкм. От них пошла культура Бмм, в которой крупные клетки появились всего один раз, 15 июня, при длине материнских клеток $21 \pm 0,5$ мкм. Вскоре началось отмирание мелких клеток. Крупные клетки дали начало культуре Б-1н, представляющей первое внутриклоновое поколение клона Б, полученное в нижнем диапазоне ауксоспорообразования, хотя диапазон в данном случае, по существу, превратился в точку. Чтобы уточнить, связано ли столь резкое сокращение диапазона ауксоспорообразования с условиями освещения, 20 июля из культуры Б были выделены мелкие клетки (культура Бм2), длина которых 3 августа составляла $65 \pm 0,5$ мкм. Крупные клетки в культуре Бм2 появились только 1 февраля 1985 г. при длине клеток $24 \pm 0,3$ мкм. Так как период с октября по февраль благоприятен для образования ауксоспор в нижнем

Таблица 3

Длина клеток клоновых культур А-2м и Б-1мм и крупных клеток, образовавшихся из ауксоспор в смешанных культурах, мкм

Дата посева смеси культур, 1984 г.	Клоновые культуры		Крупные клетки в смешанных культурах
	А-2м	Б-1мм	
2.VIII	22±0,8	29±0,5	233±8,1
13.VIII	19±0,6	24±0,6	218±8,1
27.VIII	17±0,3	19±0,5	225±16,5

диапазоне культуры А (рис. 1), можно сделать вывод, что сокращение диапазона ауксоспорообразования в культурах Бмм и Бм2 не связано с условиями освещения.

В работе с культурой Бмм были впервые отмечены два признака, отличающие клон Б от клона А. В культурах клона А мелкие клетки приобретали искривленную форму, причем характер искривления изменялся от поколения к поколению (рис. 2, а—в). Кроме того, при длине клеток меньше 100 мкм постоянно наблюдалось образование лентовидных колоний. В культуре Бмм клетки оставались прямыми вплоть до отмирания (рис. 2, г) и не обнаруживали склонности к образованию лентовидных колоний. К этому времени уже выяснилось, что второе внутриклоновое поколение клона А не способно к дальнейшему одноклоновому воспроизведению, и осмысливался вопрос о двудомном воспроизведении как о наиболее вероятном продолжении жизни клона А. Поэтому неидентичность клонов А и Б по двум внешним признакам была воспринята как возможное указание на их генетическую неидентичность. Теперь важно было не опоздать с проверкой этих клонов на двудомное воспроизведение, пока еще живы культуры второго внутриклонового поколения клона А, т. е. как можно быстрее получить последнее внутриклоновое поколение клона Б.

Из культуры Б-1 (рис. 7) 9 апреля 1984 г. была выделена клетка длиной 116 мкм (культура Б-1м). Из этой культуры 4 мая изолирована еще более мелкая клетка, давшая начало культуре Б-1мм, в которой 16 мая клетки были длиной $48 \pm 0,5$ мкм, а к 17 сентября длина их уменьшилась до $19 \pm 1,0$ мкм, после чего наступило отмирание клеток. Ауксоспорообразование в нижнем диапазоне не состоялось, т. е. первое внутриклоновое поколение клона Б оказалось не способным к дальнейшему одноклоновому воспроизведению. К счастью, такая возможность была заранее предусмотрена.

2. *Двудомное воспроизведение.* Со 2 августа 1984 г. были начаты посевы смешанных культур, в которых соединялись клетки культур А-2м и Б-1мм. Перед каждым посевом измерялась длина клеток соединяемых культур, а затем длина крупных клеток, образовавшихся в смешанной культуре (табл. 3). Эти мелкоклеточные культуры оказались способными к двудомному воспроизведению, хотя клетки культуры А-2м выглядели очень уродливыми (рис. 2, в). После посева третьей смеси культура А-2м еще хорошо росла, но в культуре Б-1мм рост почти прекратился, началось отмирание клеток. Можно считать, что обе культуры способны к двудомному воспроизведению до предельного уменьшения клеток.

Несколько раньше, с 10 июля, были начаты посевы в одну чашку Петри более крупноклеточных культур А-2 и Б-1м (табл. 4). В посеве от 10 июля не появилось ни ауксоспор, ни крупных клеток, хотя преобразованиями, связанными с половым процессом, была охвачена вся культура. Не удалось установить, связано ли отсутствие образования ауксоспор с условиями освещения в это время, или же клетки по своим размерам превосходили верхнюю границу диапазона ауксоспорообразования при двудомном воспроизведении. Но с конца июля по февраль 1985 г. включительно в смешанных культурах постоянно наблюдалось образование ауксоспор и крупных клеток, в том числе при длине клеток культуры А-2 меньше 44 мкм, когда они уже не способны к образованию изогамет.

Таблица 4

Длина клеток клоновых культур А-2 и Б-1м и крупных клеток, образовавшихся из ауксоспор в смешанных культурах, мкм

Дата посева смеси культур, 1984—1985 гг.	Клоновые культуры		Крупные клетки в смешанных культурах	Дата посева смеси культур, 1984—1985 гг.	Клоновые культуры		Крупные клетки в смешанных культурах
	А-2	Б-1м			А-2	Б-1м	
10. VII	82±0,5	89±0,5	—	22. X	58±0,5	62±0,3	215±5,6
23. VII	76±0,3	82±0,4	241±5,5	11. XI	54±0,3	59±0,5	204±5,5
6. VIII	73±0,4	77±0,4	244±6,4	12. XII	50±0,5	55±0,3	216±5,4
27. VIII	67±0,6	72±0,5	236±6,6	9. I	44±0,4	49±0,5	225±6,2
21. IX	62±0,5	67±0,4	234±6,0	4. II	40±0,5	45±0,3	231±5,0
8. X	60±0,4	65±0,4	233±6,1				

Таблица 5

Длина клеток клоновых культур А-2 и Б-1м и крупных клеток, образовавшихся из ауксоспор в смешанных культурах, мкм

Дата посева смеси культур, 1984 г.	Клоновые культуры		Крупные клетки в смешанных культурах
	А-2	Б-1м	
13. VIII	72±0,5	82±0,5	240±5,0
27. VIII	67±0,6	77±0,4	238±5,5

Продолжать дальше посевы смешанных культур не было смысла, так как нижний конец диапазона ауксоспорообразования был изучен на культурах А-2м и Б-1мм (табл. 3). Поскольку однодомное воспроизведение никогда не начиналось в июле, можно утверждать, что пороговый уровень интенсивности и продолжительности освещения при двудомном воспроизведении значительно выше, чем при однодомном.

Внутриклоновое поколение клона Б, полученное в нижнем диапазоне ауксоспорообразования, также было проверено на способность к двудомному воспроизведению при смешанном посеве его клеток и клеток культуры А-2. Для этого 9 июля из культуры Б-1м (рис. 7) при длине ее клеток $158 \pm 0,6$ мкм были выделены в культуру Б-1м клетки длиной $99 \pm 0,3$ мкм, которые к 13 августа уменьшились в длину до $82 \pm 0,5$ мкм. Смеси клеток культур А-2 и Б-1м высевались дважды (табл. 5), и в обоих случаях наблюдалось образование ауксоспор и крупных клеток.

При двудомном воспроизведении, в отличие от однодомного, не наблюдалось строгой суточной периодичности и синхронности. В смешанных культурах одновременно встречались и гаметы, и ауксоспоры, начиная от только что тронувшихся в рост и кончая достигшими предельной длины, а также формирующиеся, полностью сформировавшиеся и уже приступившие к размножению крупные клетки. Кроме того, при однодомном воспроизведении россыпи бледноватых шариков изогамет встречаются в культурах локально, в немногих скоплениях клеток, тогда как при двудомном гаметы можно встретить всюду. Детали полового процесса при двудомном воспроизведении еще предстоит выяснить, но уже сейчас можно утверждать, что он не изогамный. В клетках клона А, как при однодомном воспроизведении, образуются два шарообразных тельца, которые часто оказываются за пределами раскрывшегося панциря материнской клетки. Гаметы клона Б не шарообразные. После разделения панциря на половинки каждая из двух гамет остается распростертой по внутренней поверхности своей теки, лишь на свободной от панциря поверхности образуется выпуклость, расположенная ближе к одному концу теки, а у сестринской гаметы — к противоположному концу. Половой процесс по крайней мере гетерогамный. Поскольку гаметы клона Б определено стационарны, этот клон можно считать женским, а клон А —

Стимулирование образования гамет и крупных клеток в культуре Бм2
клетками культуры А-2

Дата посева смеси культур, 1984 г.	Длина клеток, мкм		
	клонные культуры		крупные клетки в смешанных культурах
	А-2	Бм2	
30. VII	75±0,6	65±0,5	Изогаметы
13. VIII	72±0,5	61±0,6	»
20. VIII	69±0,6	59±0,4	209± 3,1
27. VIII	67±0,6	58±0,6	221± 5,0
21. IX	62±0,5	49±0,5	215±13,3

мужским. Размерный диапазон двудомного воспроизведения полностью перекрывает нижний диапазон однодомного воспроизведения и даже охватывает значительно более крупные клетки. Несимметричная искривленность мелких клеток, препятствовавшая однодомному воспроизведению, вполне допускает двудомное воспроизведение. По-видимому, гаметогенез клона А при однодомном и двудомном воспроизведении протекает различно.

Неожиданный результат дали смешанные посевы клеток культуры А-2 и культуры Бм2, еще способной к однодомному воспроизведению (табл. 6). В двух первых посевах появлялись локальные россыпи изогамет, но образования крупных клеток не было. В конце августа — сентябре наблюдалось и образование крупных клеток. Створки клеток культуры А-2 уже имели хорошо заметный изгиб в средней части и легко отличались от прямых створок культуры Бм2. Просмотр пустых панцирей, появлявшихся в результате образования гамет, подтвердил, что гаметы производились только клетками культуры Бм2. Так как в самой культуре Бм2 в это время не было ни гамет, ни крупных клеток, можно сделать вывод, что клетки клона А, способные к двудомному воспроизведению, стимулируют однодомное воспроизведение в нижнем диапазоне ауксоспорообразования клона Б. Это указывает на сложные взаимоотношения в популяции вида.

Прежде чем стал возможным и необходимым переход к двудомному воспроизведению, клон А произвел два поколения однодомного происхождения, а клон Б — только одно. Остается неизвестным, сколько таких поколений должно смениться в интервале между двумя двудомными воспроизведениями, так как неизвестна предыстория взятых из моря клеток, которые дали начало этим клонам. Попытка установить это число дала опять-таки неожиданный результат. Из смеси культур А-2 и Б-1м, посеянной 6 августа, были переведены в отдельные культуры пять клеток двудомного происхождения, чтобы, используя скачкообразное уменьшение длины клеток, как можно быстрее получить мелкоклеточные культуры и по форме их клеток установить сходство с клоном А или Б. В октябре были уже получены культуры с клетками длиной от 30 до 60 мкм, но во всех пяти культурах клетки оказались прямыми. Зато в трех из них сразу же началось обильное образование шарообразных гамет, не ведущее к образованию ауксоспор и крупных клеток, как это наблюдалось в культурах А-2 и А-2м, а в двух других отмечался только вегетативный рост. Было ясно, что выделенные культуры двудомного происхождения предрасположены к новому двудомному воспроизведению. 19 ноября была посеяна смесь клеток культуры № 2, образующей шарообразные гаметы, и культуры № 3, не образующей гамет. Клетки культуры № 2 были длиной $51 \pm 0,4$ мкм, № 3 — $45 \pm 0,4$ мкм. В смешанной культуре из ауксоспор образовались клетки длиной $226 \pm 12,4$ мкм. Характер чередования однодомного и двудомного воспроизведения оказался сложнее, чем ожидалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Знания о воспроизведении пеннатных диатомовых водорослей, классификация типов их полового процесса базируются в основном на многочисленных работах Гейтлера (Geitler, 1973), исследовавшего пресноводные водоросли. Морские пеннатные диатомовые в этом отношении до сих пор мало изучены (Drebes, 1977). Именно среди них были обнаружены первые двудомные виды (Stosch, 1958; Magne-Simon, 1962). Через наши клоновые культуры за последние пять лет прошло около десяти морских пеннатных видов различного систематического положения, клоны которых оказались бесплодными. Одним из немногих исключений была водоросль *Synedra tabulata*, которая занимает переходное положение между двудомными и однодомными видами. Для нее характерно чередование поколений, способных либо к однодомному, либо к двудомному воспроизведению. Порядок чередования точно не установлен, но установлено, что после смены не менее двух поколений, способных к однодомному воспроизведению, также не менее 2 раз осуществляется двудомное воспроизведение.

В Черном море *S. tabulata* обитает на глубинах до 20 м (Прошкина-Лавренко, 1963), что говорит о ее приспособленности к довольно низкой освещенности. К высоким интенсивностям освещения наиболее чувствительно однодомное воспроизведение, для которого даже при рассеянном свете благоприятнее более темная половина года. Однако при обитании на малых глубинах скачкообразное уменьшение длины клеток, свойственное этой водоросли, способно обеспечить перенос аукоспорообразования в благоприятные сезонные условия. Космополитическая распространенность данного вида у берегов морей и океанов (McIntire, Moore, 1977) свидетельствует о том, что ее приспособительные возможности действительно широки.

ЛИТЕРАТУРА

- Михайлова Н. Ф. Спорообразование и его значение в биологии видов р. Chaetoceros Ehr./Тр. Севастоп. биол. ст. АН СССР. 1960. Т. 13. С. 17—26.
 Прошкина-Лавренко А. И. Диатомовые водоросли бентоса Черного моря. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1963. 243 с.
 Рошин А. М. Скорость размножения и уменьшения размеров клеток некоторых видов бентосных диатомовых водорослей//Биол. науки. 1982. № 9. С. 71—75.
 Рошин А. М. Жизненные циклы бентосной диатомовой водоросли *Achnanthes longipes* Ag./Биол. науки. 1984. № 11. С. 71—78.
 Bruckmayer-Berkenbusch H. Die Beeinflussung der Auxosporenbildung von *Melosira nummuloidea* durch Außenfaktoren//Arch. Protistenk. 1954. B. 100. H. 2. S. 183—211.
 Drebes G. Sexuality//Bot. Monographs. 1977. V. 13. P. 250—283.
 Geitler L. Auxosporenbildung und Systematik bei pennaten Diatomeen und die Cytologie von *Cocconeis-Sippen*//Österr. bot. Z. 1973. B. 122. H. 5. S. 299—321.
 Lewin J. C., Guillard R. R. L. Diatoms//Ann. Rev. Microbiol. 1963. V. 17. P. 373—414.
 Magne-Simon M.-F. L'auxosporulation chez une Tabellariacée marine, *Grammatophora marina* (Lyngb.) Kütz. (Diatomée)//Cah. biol. marine. 1962. T. 3. № 1. P. 79—89.
 McIntire C. D., Moore W. W. Marine littoral diatoms: ecological considerations//Bot. Monographs. 1977. V. 13. P. 333—371.
 Stosch H. A. Kann die oogame Araphidee *Rhabdonema adriaticum* als Bindeglied zwischen den beiden großen Diatomeengruppen angesehen werden?//Ber. deut. bot. Ges. 1958. B. 71. H. 6. S. 241—249.

Карадагское отделение Института
 биологии южных морей АН УССР,
 Крым

Поступила в редакцию
 5.VI.1985.

DIATOMACEOUS ALGA WITH MONOECIOUS AND DIOECIOUS REPRODUCTION

A. M. ROSHCIN

*Karadag Branch, Institute of Biology of the Southern Seas,
 Acad. Sci. Ukrainian SSR.*

Synedra tabulata (Diatomea) occupies an intermediate position between dioecious and monoecious species. Generations, able to reproduce in monoecious way, alternate with those able to reproduce in dioecious way. Monoecious reproduction is isogamous. Two spheroid gametes are formed in each mother cell.