

УДК 582.261.1:581.4

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДВУХ ВИДОВ МОРСКИХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ *NITZSCHIA VENTRICOSA* И *ARDISSONEA CRYSTALLINA* (BACILLARIOPHYTA)

© 2016 г. **К. И. Шоренко**<sup>1</sup>, м. н. с., **Ю. А. Подунай**<sup>1</sup>, м. н. с., **О. И. Давидович**<sup>1</sup>, н. с.,  
**М. С. Куликовский**<sup>2</sup>, канд. биол. наук, в. н. с.

<sup>1</sup>Карадагская научная станция им. Т. И. Вяземского — природный заповедник РАН, Феодосия, Россия

<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, Борок, Россия

E-mail: k\_shorenko@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2016 г. Принята к публикации 21.12.2016 г.

Актуальность работы обусловлена недостаточной изученностью проблемы понимания объёма видов диатомовых водорослей, особенно в условиях *in vitro*. Цель исследования — изучить морфологическую изменчивость в культурах двух видов морских пennisнатных диатомовых водорослей *Nitzschia ventricosa* Kitton и *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow при помощи методов световой и сканирующей электронной микроскопии, а также оценить в эксперименте воздействие солёности на морфологические показатели панциря *A. crystallina*, использующиеся при диагностике вида; сделать сопутствующие таксономические замечания. Материалом послужили изоляты (клоны и альгологически чистые культуры), полученные в условиях *in vitro*: изоляты *N. ventricosa* — из природных популяций прибрежных районов Канарских островов, о-ва Мартиника и штата Техас (Мексиканский залив), изоляты *A. crystallina* — из бентосных проб в бухте Казачья (Севастополь, Чёрное море). Морфологическая изменчивость в культурах *N. ventricosa* и *A. crystallina* оказалась сопоставимой с данными, полученными на материале из природных популяций. Обнаруженная вариабельность изученных изолятов позволила уточнить морфологические особенности *N. ventricosa*. Варьирование в одном клоне *N. ventricosa* по числу штрихов и фибул оказалось выше, чем обнаруженное в альгологически чистых культурах этого вида. Широкая фенотипическая вариация створок в культурах *N. ventricosa* и *A. crystallina* сопоставима с данными, полученными *in situ*. Выявлена тенденция возрастания плотности расположения штрихов и ареол и уменьшения ширины клеток *A. crystallina* с увеличением солёности в эксперименте. При солёности 8‰ вегетативное деление замедлялось, культура погибала. С повышением уровня солёности увеличивались диапазоны варьирования числа штрихов *A. crystallina*.

**Ключевые слова:** диатомовые водоросли, *Nitzschia ventricosa*, *Ardissonea crystallina*, морфологическая изменчивость

Изучение видовой и внутривидовой морфологической изменчивости является распространённой и приоритетной задачей систематики диатомовых водорослей [5, 12], т. к. позволяет уточнить диагнозы многих видов для целей флористики. Традиционно специалистами по систематике диатомовых водорослей используется подход *in situ* [3, 5, 7, 8, 16, 21–23, 25], тогда как применение подхода *in vitro* в отечественной диатомологии выполнялось сравнительно небольшим числом авторов [4, 6, 12, 15]. Виды *Nitzschia ventricosa* Kitton и *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow — типично морские обитатели (полигалобы), имеющие широкое распространение в Мировом океане. Они регулярно обнаруживаются в бентосе и планктоне, однако в культурах не изучались.

Цели настоящего исследования: изучить морфологическую изменчивость в культурах двух видов мор-

ских пennisнатных диатомовых водорослей *N. ventricosa* и *A. crystallina*; оценить в эксперименте воздействие солёности на морфологические показатели панциря *A. crystallina*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом послужили изоляты (клоны и альгологически чистые культуры) двух широко распространённых видов морских пennisнатных диатомовых водорослей. Культуры *N. ventricosa* получены из бентосных проб, отобранных с глубины до 0.5 м на побережье Атлантического океана (о-в Ля Гомера, Канарские острова; Корпус-Кристи, Мексиканский залив) и Карибского моря (о-ва Мартиника). Альгологически чистая культура *A. crystallina* выделена из трёх бентосных проб в бухте Казачья (Севастополь, Чёрное море). Культуры выделялись микропипеточным способом [1] и выращивались в чашках Петри на среде

ESAW при естественном освещении и температуре 20 °С. Под клоном (штаммом) понимается потомство, полученное вегетативным путём от одной клетки. Под альгологически чистой культурой понимается группа клонов одного вида. Альгологически чистую культуру *A. crystallina* (состоящую из нескольких штаммов) после выделения физически разделили и выращивали параллельно при шести уровнях солёности (8, 12, 17, 30, 38 и 48 ‰) в течение двух месяцев. Для получения требуемой солёности исходную среду (36 ‰) разбавляли необходимым количеством дистиллированной воды или добавляли NaCl. Во избежание тератологических изменений сроки содержания культур в искусственных условиях до момента приготовления препаратов не превышали 2 месяцев [18]. Для определения верхнего размерного диапазона клеток проведены эксперименты по внутривидовому скрещиванию по стандартной методике и получены инициальные клетки. Панцири очищены от органического вещества путём кипячения на песчаной бане в 15–20 % растворе пергидроля. Микрофотографии панцирей получены при помощи сканирующего электронного микроскопа (SEM) Jeol Jsm-5600 в Институте биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина (ИБВВ РАН). Световые фотографии (LM) панцирей сделаны с постоянных препаратов с использованием микроскопа Olympus IX71, оборудованного устройством дифференциально-интерференционного контраста по Номарскому. Морфометрические показатели (плотность расположения фибул, ареол, штрихов и т. д.) оценены по микрофотографиям при помощи программы ImageJ v.1.45 (<http://imagej.net>). По каждому показателю осуществлено 20–30 измерений. Расчёт коэффициентов вариации (CV), средних значений и доверительных интервалов (ДИ) произведён с использованием программы Open Office Calc (<http://www.openoffice.org/ru/>).

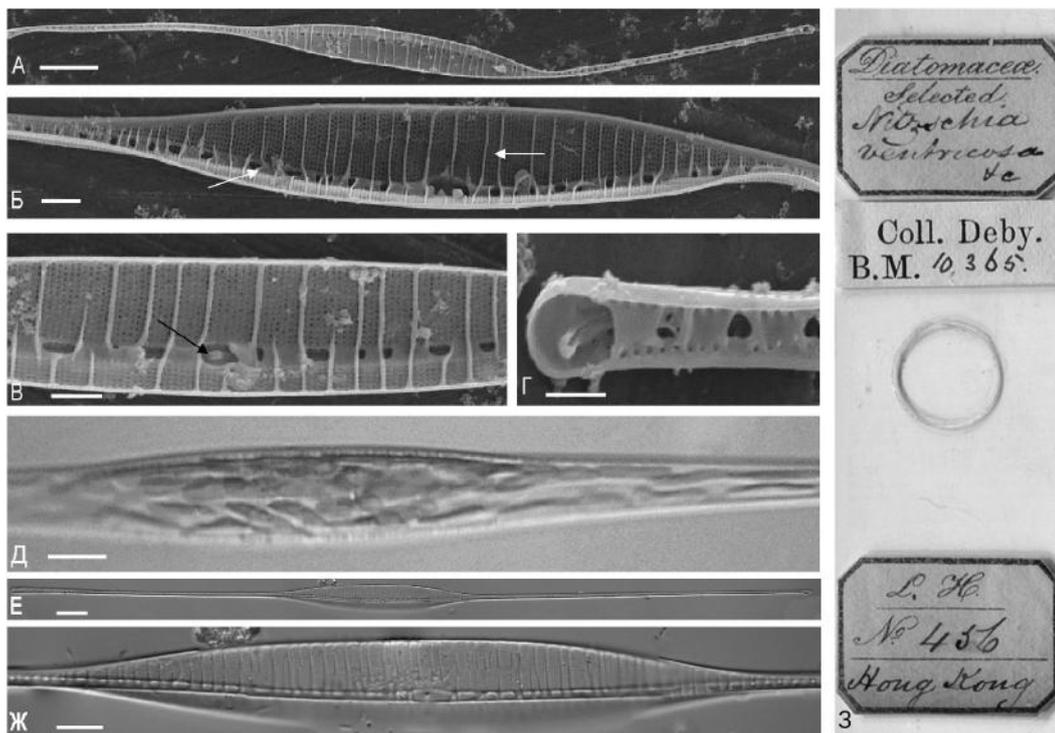
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вид *Nitzschia ventricosa* Kitton (рис. 1) первоначально обнаружен на побережье Гонконга (*locus typicus*) и описан в 1873 г. английским естествоиспытателем Ф. Киттоном [21]. В литературе существуют различные сведения по морфологии этого вида [20, 22, 25], что потребовало изучения типового материала (*syntypus*). Вид *N. ventricosa* габитуально и формой концов (рис. 1 А, Г) имеет сходство с *Nitzschia longissima* (Bréb.) Grunow и *N. rectilonga* Takano, отличается наличием рёбер с внутренней стороны створки (рис. 1 А–В, Е, Ж), слабо различимых у живых клеток (рис. 1 Д). Отметим наличие у данного вида множественных хлоропластов (рис. 1 Д), сходных с таковыми у *N. longissima* и *N. rectilonga*. Данный факт резко отличает указанную группу от других близких представителей рода *Nitzschia*, имеющих, как правило, два хлоропласта [8]. В бентосе и планктоне Чёрного и Азовского морей вид *N. ventricosa* не отмечался [10, 11].

При ознакомлении с коллекционными материалами британского Музея естественной истории (Natural History

Museum, London) установлено, что голотип *N. ventricosa* Ф. Киттоном не был обозначен, что открывает перспективы выделения синтипов. Авторами изучен слайд № 10365 из фондов Музея (коллекция Деби) с материалом данного вида из Гонконга. Материал в слайде признан аутентичным (*specimina authentica*) (рис. 1 Е, Ж). Исследование данного материала показало близость морфометрических характеристик (показателей длины, ширины, числа штрихов, фибул и ареол) изученных нами створок к данным, приводимым для других тихоокеанских популяций. По средним значениям полученные и изученные изоляты оказались морфологически близки друг другу (табл. 1). Однако популяции *N. ventricosa* отличались числом фибул в 10 мкм, габитуально образуя две хорошо отличающиеся группы с большим и меньшим числом фибул. Бóльшее число фибул (верхний предел — 10–11 фибул в 10 мкм) оказалось характерно для тихоокеанской формы, меньшее (верхний предел — 6–8 фибул в 10 мкм) — для атлантической. При этом тихоокеанская форма является типовой [21]. Для видов рода *Nitzschia* число фибул и число штрихов считаются наиболее стабильными таксономическими признаками [7]. У изученных нами форм из тихоокеанских и атлантических популяций диапазоны числа фибул перекрывались лишь незначительно (табл. 1). В работе [25] место отбора проб не указано, однако по диапазону приводимых фибул вероятно принадлежность изученных створок к атлантической популяции. Ранее нами обнаружено, что даже небольшие морфологические отличия у видов группы *Nitzschiaellae* могут приводить к видовой самостоятельности тихоокеанских и атлантических популяций необходимо использовать комплексный подход (с привлечением данных молекулярной и репродуктивной биологии).

Коэффициент вариации, рассчитанный для всех морфологических признаков, показал наименьшее варьирование по числу штрихов, а наибольшее — по длине створок (табл. 1). Данный факт иллюстрирует большую консервативность числа штрихов у видов рода *Nitzschia*, чем указывалось ранее [7]. Резкое отличие карибской популяции по диапазону длины створок и бóльшему коэффициенту вариации объясняется произошедшим ауксоспорообразованием, которое дало крупные инициальные клетки, учитываемые при расчётах. Особый интерес вызывает широкая, на наш взгляд, внутриклоновая морфологическая изменчивость у данного вида, т. е. один генотип при одинаковых условиях способен давать морфологические вариации, сопоставимые с данными, полученными на генетически вариабельном материале. Варьирование в одном клоне оказалось по числу штрихов и фибул даже несколько больше, чем обнаруженное в альгологически чистых культурах (табл. 1). Данный факт ранее отмечен для другого близкого вида — *N. rectilonga* Takano [13]. Известно, что клоная вариабельность растений имеет генотипическую и эпигенетическую природу [9], но для диатомовых водо-



**Рис. 1.** Створки *Nitzschia ventricosa* из альгологически чистой культуры. А — общий вид створки (SEM). Масштаб 10 мкм. Б — центральная часть створки (SEM). Стрелками указано расположение фибул и штрихов. Масштаб 3 мкм. В — центральная часть створки (SEM). Стрелкой показан центральный узелок. Масштаб 2 мкм. Г — дистальный конец створки (SEM). Масштаб 2 мкм. Д — живая клетка с хлоропластами (LM). Масштаб 10 мкм. Е — общий вид створки из типовой популяции (*specimina authentica*) (LM). Масштаб 10 мкм. Ж — центральная часть створки из типовой популяции (*specimina authentica*) (LM). Масштаб 5 мкм. З — типовой слайд (*syntypus*)

**Fig. 1.** *Nitzschia ventricosa* valves from algalogical pure culture. А — the general view of the valve (SEM). Scale 10  $\mu\text{m}$ . Б — central part of the valve (SEM). The arrows indicate location of fibulae and ribs. Scale 3  $\mu\text{m}$ . В — the central part of the valve (SEM). The arrow shows the central nodule. Scale 2  $\mu\text{m}$ . Г — distal valve end (SEM). Scale 2  $\mu\text{m}$ . Д — the live cell with chloroplasts (LM). Scale 10  $\mu\text{m}$ . Е — the general view of the valve from the type population (*specimina authentica*) (LM). Scale 10  $\mu\text{m}$ . Ж — central part of the valve from the type population (*specimina authentica*) (LM). Scale 5  $\mu\text{m}$ . З — type slide (*syntypus*)

рослей этот вопрос разработан слабо. В связи с этим его проработка может дать интересный материал для изучения эволюционных процессов в естественных популяциях.

Род *Ardissonea* De Notaris, 1870 был выделен итальянским ботаником Дж. де Нотарисом из рода *Synedra*. В литературе существует двойное написание данного рода (табл. 2). Нами изучены фотографии типового гербария (*exsiccatum*), содержащие первоначальное цитирование рода (рис. 2), в настоящее время признанное валидным (<http://algaebase.org>).

Вид *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow (рис. 3) описан шведским ботаником К. А. Агардом в 1824 г. как *Diatoma crystallinum* C. Agardh. Типовой местностью (*locus typicus*) указана акватория *Sinus Codani* [16], что соответствует проливу Каттегат, расположенному между восточным берегом п-ва Ютландия и юго-западной частью Скандинавского полуострова. Вид *A. crystallina* (рис. 3 Е) обычно имеет головчатые утолщения (рис. 3 А), нежную микроструктуру створки (рис. 3 Б–Г) и множественные хло-

ропласты (рис. 3 Д). Данные, полученные при изучении альгологически чистой культуры *A. crystallina*, показывают, что вариабельность морфологических характеристик нескольких клонов сопоставима с таковыми вида из природных популяций.

Изучение альгологически чистой культуры дало возможность оценить полный диапазон морфологической изменчивости вида в относительно кратковременные сроки (табл. 2). Коэффициент вариации показал наименьшую изменчивость в числе штрихов, а наибольшую — в длине створки (табл. 2).

Культура *A. crystallina*, полученная из природной популяции Чёрного моря, по числу штрихов оказалась близка не к черноморской природной популяции, а к популяции из залива Шалёр (табл. 2). Для прояснения вопроса необходимо выполнить молекулярно-генетический анализ.

Влияние солёности на морфологию диатомовых водорослей в отечественной литературе изучено слабо [4, 14], в то время как в зарубежной литературе данный вопрос

**Таблица 1.** Диапазоны варьирования некоторых морфологических признаков *Nitzschia ventricosa***Table 1.** The variation of some morphological characters of *Nitzschia ventricosa*

Собственные данные / Литературный источник	Распространение	Длина, мкм	Ширина, мкм	Число штрихов в 10 мкм	Число ареол в 1 мкм	Число фибул в 10 мкм
Популяция 1 (клоновая культура)	Атлантический океан, Мексиканский залив	159.0–294.0 (202.8 ± 29.5) CV = 25.7	6.3–8.2 (7.4 ± 0.4) CV = 9.5	31.1–35.3 (33.2 ± 0.6) CV = 3.3	3.3–4.4 (3.9 ± 0.2) CV = 7.7	3.2–8.3 (5.1 ± 0.7) CV = 25.5
Популяция 2 (альгологически чистая культура)	Карибское море, побережье о. Мартиника	112.0–616.0 (253.0 ± 76.3) CV = 75.4	5.6–7.1 (6.4 ± 0.3) CV = 11.8	32.3–34.7 (33.4 ± 0.4) CV = 2.1	3.6–5.0 (4.1 ± 0.2) CV = 9.8	4.3–6.3 (5.1 ± 0.3) CV = 11.8
Популяция 3 (альгологически чистая культура)	Атлантический океан, побережье Канарских о-вов	164.0–346.0 (206.2 ± 25.2) CV = 24.4	6.8–10.7 (8.3 ± 0.5) CV = 13.3	30.2–34.4 (32.8 ± 0.3) CV = 2.4	3.3–5.0 (3.8 ± 0.2) CV = 13.2	4.2–8.0 (5.8 ± 0.5) CV = 20.7
Типовой гербарный образец ( <i>specimina authentica</i> )	Тихий океан, побережье Гонконга ( <i>locus typicus</i> )	319.9	10.7	35.2	4.0	8.4
[19]	Атлантический океан, побережье юга Бразилии	230.6–295.8	10.2–12.0	—	—	—
[20]	Тихий океан, побережье Японии	191.5–272.8	7.8–10.8	30	—	8–11
[22]	Тихий океан, коралловые рифы о-ва Гуам	150	10	34	—	7–10
[25]	—	*–650	*–20	26–27	—	3–7

Примечание: — нет данных; \* — нижнее пороговое значение не указано; CV — коэффициент вариации, %. В скобках дано среднее значение признака, ± 95 % ДИ

неоднократно разрабатывался [4, 17, 24]. На основе изучения ряда модельных видов Н. И. Караевой и С. К. Джафаровой [4] сделан важный вывод об отсутствии специфического влияния на створки диатомовых. В эксперименте по влиянию солёности на створки *A. crystallina* нами установлено, что с увеличением солёности показатели плотности расположения штрихов и ареол проявляют тенденцию к возрастанию, а показатели ширины клеток — к уменьшению. Данные тенденции прослеживаются по средним значениям, хотя границы их доверительных интервалов перекрываются (рис. 4).

Размах диапазонов варьирования числа штрихов показал тенденцию к их увеличению с повышением уровня солёности, по остальным характеристикам чёткой закономерности не выявлено (табл. 3). Морфологических трансформаций формы створок при произрастании в культурах не выявлено. При различных показателях солёности тера-

тологические изменения створок отсутствовали. При солёности 8 ‰ вегетативное деление было слабым, но солёность 12 ‰ не приводила к таким последствиям. Данный факт объективно показывает соответствие нижней границы осмотической резистентности *A. crystallina* на уровне солёности 8 ‰. Вид обладает невысокой устойчивостью к опреснению, что отмечалось для других морских диатомовых [6] и объясняется отсутствием надёжных физиологических механизмов, обеспечивающих адаптацию к опреснению среды. Полученные данные важны для понимания ответных реакций гидробионтов, и в частности морских диатомовых водорослей, на изменения солёности среды. Ранее отмечено [14, 24], что ширина створки у видов рода *Nitzschia* увеличивается при повышении уровня солёности, а число штрихов в некоторых случаях уменьшается. Вид *A. crystallina* проявил прямо противоположную (зеркальную) закономерность, что обнаруживает зависимость

**Таблица 2.** Диапазоны варьирования некоторых морфологических характеристик *Ardissonea crystallina*

**Table 2.** The variation of some morphological characteristics of *Ardissonea crystallina*

Собственные данные / Литературный источник	Распространение	Указанный таксон	Признак			
			длина, мкм	ширина, мкм	число штрихов в 10 мкм, шт.	число ареол в 1 мкм, шт.
Популяция 1 (альгологически чистая культура) 8–48 ‰	Чёрное море, Крым, Казачья бухта	<i>Ardissonea crystallina</i> (C. Agardh) Grun.	65.0–678.0 (256.6 ± 35.4) CV = 37.0	9.8–15.8 (13.1 ± 0.6) CV = 13.7	13.4–16.5 (14.9 ± 0.2) CV = 4.7	2.0–2.9 (2.4 ± 0.1) CV = 8.3
[3]	Балтийское, Белое, Азовское, Чёрное, Каспийское моря, Сиваш; лиманы юга Украины, у берегов Швеции, Франции, Германии, у атлантического побережья Америки	<i>Synedra crystallina</i> (C. Agardh) Kütz.	95–260	11–16	11–13	—
[8]	Чёрное, Балтийское, Белое моря, Сиваш, европейские моря, опреснённые водоёмы	<i>Synedra crystallina</i> (C. Agardh) Kütz.	147–640	11–16	11–13	—
[16]	Пролив Каттегат ( <i>locus typicus</i> )	<i>Diatoma crystallinum</i> (C. Agardh)	—	—	—	—
[22]	Тихий океан, коралловые рифы о-ва Гуам	<i>Ardissonea crystallina</i> (C. Agardh) Grun.	220–350	11–16	16–19	—
[23]	Атлантический океан, залив Шалёр	<i>Ardissonea crystallina</i> (C. Agardh) Grun. var. <i>crystallina</i> Grun. et Cleve	175–537	10–15.5	13–16	2.5–2.7
[25]	—	<i>Ardissonea crystallina</i> (C. Agardh) Grun.	200–700	8–20	11	—

Примечание: CV — коэффициент вариации, %. В скобках дано среднее значение признака, ± 99 % ДИ

**Таблица 3.** Диапазоны варьирования некоторых морфологических характеристик *Ardissonea crystallina*, содержащейся при разной солёности

**Table 3.** The variation of some morphological characteristics of *Ardissonea crystallina* at the different salinity

Солёность, ‰	Признак		
	ширина, мкм	число штрихов в 10 мкм, шт.	число ареол в 1 мкм, шт.
8	13.5–15.4 (R = 1.9)	13.8–15.1 (R = 1.3)	2.0–2.5 (R = 0.5)
12	12.7–15.8 (R = 3.1)	13.5–15.3 (R = 1.8)	2.0–2.5 (R = 0.5)
17	13.0–14.4 (R = 1.4)	13.4–15.6 (R = 2.2)	2.1–2.6 (R = 0.4)
30	11.2–15.0 (R = 3.8)	13.9–16.5 (R = 2.6)	2.2–2.8 (R = 0.6)
38	12.2–13.9 (R = 1.7)	13.8–16.6 (R = 2.8)	2.3–2.7 (R = 0.4)
48	11.4–13.8 (R = 2.4)	14.3–16.3 (R = 2.0)	2.3–2.8 (R = 0.5)

Примечание: R — размах вариации

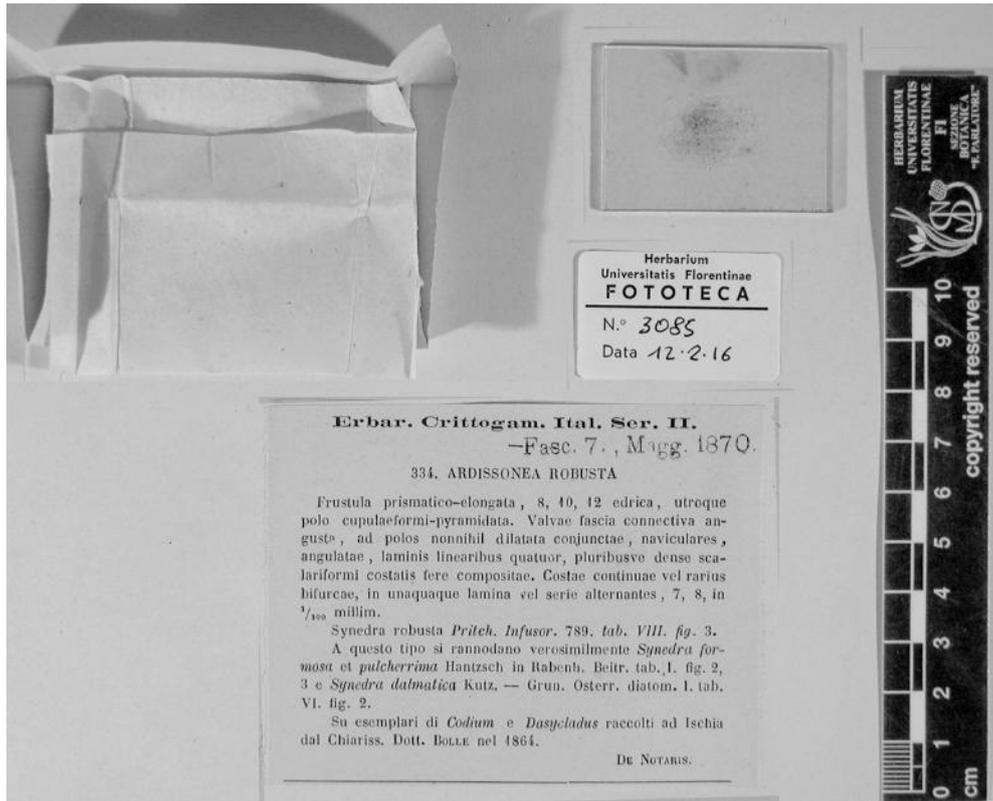


Рис. 2. Типовой гербарий (*exsiccatum*) с описанием *Ardissonea robusta*

Fig. 2. The type herbarium (*exsiccatum*) with description of *Ardissonea robusta*

направленности морфологических реакций для перфорированности и ширины створок. Изменение числа штрихов и ареол у *A. crystallina* с увеличением уровня солёности согласуется с гипотезой о зависимости степени перфорированности панциря от физиологической активности клеток [2], связанной с осмотической плотностью среды.

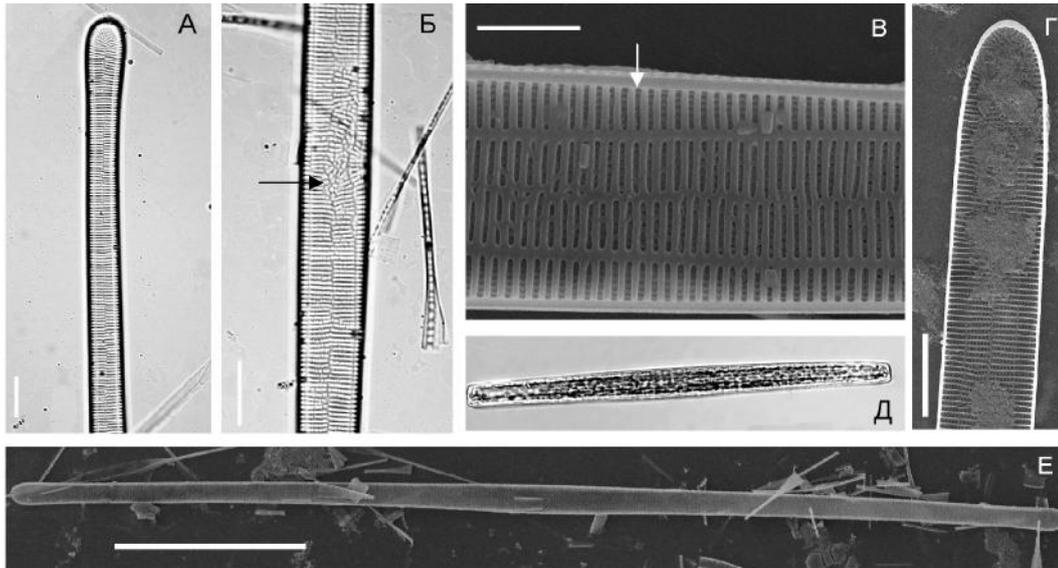
#### Выводы:

1. Морфологическая изменчивость в клоновых и альгологически чистых культурах *Nitzschia ventricosa* и *Ardissonea crystallina* оказалась сопоставимой с данными, полученными на материале из природных популяций.
2. По полученным в культурах ауксоспорам удалось оценить границу верхнего размерного диапазона клеток обоих видов. Для *N. ventricosa* она составила 616.0 мкм, для *A. crystallina* — 678.0.
3. Варьирование в одном клоне *N. ventricosa* по числу штрихов и фибул оказалось больше, чем обнаруженное в альгологически чистых культурах.
4. Показано, что *A. crystallina* способна вегетировать при солёности от 8 до 48 ‰.
5. Культура *A. crystallina*, полученная из природной популяции Чёрного моря, оказалась близка по числу штрихов к популяции с побережья Канады (залив Шалёр).

6. Содержание в культурах при разных показателях солёности на протяжении двух месяцев не привело к значительным морфологическим изменениям клеток *A. crystallina*. При увеличении солёности в эксперименте плотность расположения штрихов и ареол *A. crystallina* проявляет тенденцию к возрастанию, а ширина клеток — к уменьшению. С увеличением солёности выявлено повышение широты диапазонов варьирования числа штрихов.

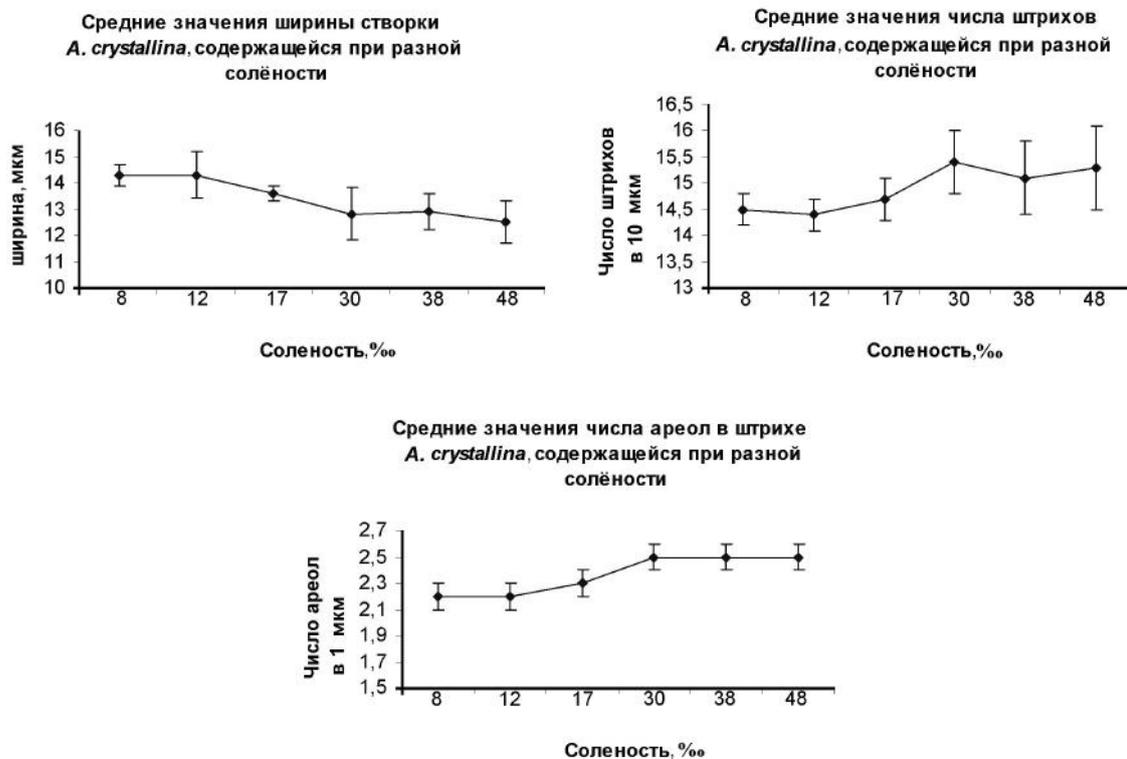
**Благодарности.** Авторы благодарны С. Трояно (Cecilia Troiano, Biblioteca Universitaria di Genova) за возможность изучить типовые гербарные материалы по роду *Ardissonea*, проф. А. Витковски (Prof. Dr. Andrzej Witkowski, University of Szczecin, Poland) за предоставленные пробы, Джовите Ясильюрт (Dr. Jovita C. Yesilyurt, Natural History Museum, London, UK) за возможность изучить типовой слайд из коллекции британского Музея естественной истории по виду *N. ventricosa*, а также к. б. н. Н. А. Давидовичу (Карадагский заповедник РАН) и д. б. н. Е. Л. Невровой (ИМБИ РАН) за полезные комментарии по содержанию статьи.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 15-04-00237-а «Получение данных о репродуктивной биологии рода *Ardissonea*, критически важных для понимания филогении диатомовых» и РНФ 14-14-00555 «Биогеография и систематика диатомовых водорослей Евразии: от концепции космополитизма к



**Рис. 3.** Створки *Ardissonaea crystallina* из альгологически чистой культуры. А — конец створки (LM). Масштаб 10 мкм. Б — центральная часть створки (LM). Стрелкой показана хаотичность штрихов в центральной части створки. Масштаб 10 мкм. В — центральная часть створки с внутренней стороны (SEM). Стрелкой показаны ряды ареол. Масштаб 5 мкм. Г — конец створки с внутренней стороны (SEM). Масштаб 10 мкм. Д — живая клетка с хлоропластами. Масштаб 10 мкм. Е — общий вид створки с внутренней стороны (SEM). Масштаб 100 мкм

**Fig. 3.** *Ardissonaea crystallina* valves from algologically pure culture. А — the valve end (LM). Scale 10  $\mu\text{m}$ . Б — the central part of valve (LM). The arrow indicates striae randomness in the central part of valve. Scale 10  $\mu\text{m}$ . В — the middle part of the valve (SEM). The arrow shows the areola rows. Scale 5  $\mu\text{m}$ . Г — the end of valve inside (SEM). Scale 10  $\mu\text{m}$ . Д — live cell with chloroplasts. Scale 10  $\mu\text{m}$ . Е — the whole valve inside (SEM). Scale 100  $\mu\text{m}$



**Рис. 4.** Средние значения некоторых морфологических признаков *Ardissonaea crystallina* в зависимости от солёности. Вертикальными линиями отмечены границы 95 % ДИ

**Fig. 4.** Average values of some morphological characteristics of *Ardissonaea crystallina* under different salinity. The vertical lines mark the boundaries of the 95 % confidence interval

региональному эндемизму?» (данные по световой и сканирующей электронной микроскопии).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабиров Р. Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей* : учебное пособие. Уфа : БГПУ, 2008. 152 с. [Gaisina L. A., Fazlutdinova A. I., Kabirov R. R. *Sovremennye metody vydeleniya i kul'tivirovaniya vodoroslei*: учебное пособие. Ufa: BGPU, 2008. 152 p. (in Russ.)].
2. Генкал С. И., Куликовский М. С., Стенина А. С. Изменчивость основных структурных элементов некоторых видов рода *Navicula* (Bacillariophyta) // *Биология внутренних вод*. 2007. № 2. С. 20–25. [Genkal S. I., Kulikovskiy M. S., Stenina A. S. Variability of main structural elements of a valve of some species of the genus *Navicula* (Bacillariophyta). *Biologiya vnutrennikh vod*, 2007, no. 2, pp. 20–25. (in Russ.)].
3. Гусяков Н. Е., Закордонец О. А., Герасимюк В. П. *Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Чёрного моря и прилегающих водоемов*. Киев : Наукова думка, 1992. 112 с. [Guslyakov N. E., Zakordonets O. A., Gerasimyuk V. P. *Atlas diatomovykh vodoroslei bentosa severo-zapadnoi chasti Chernogo morya i prilegayushchikh vodoemov*. Kiev: Naukova dumka, 1992, 112 p. (in Russ.)].
4. Караева Н. И., Джафарова С. К. Экспериментальные исследования полигалобных Bacillariophyta в связи с солёностью среды // *Альгология*. 1993. Т. 3, № 2. С. 97–105. [Karaeva N. I., Dzhafarova S. K. Experimental investigations of polygalobic Bacillariophyta in connection with medium salinity. *Al'gologiya*, 1993, vol. 3, no. 2, pp. 97–105. (in Russ.)].
5. Макарова И. В. О принципах видовой и внутривидовой систематики у диатомовых водорослей // *Ботанический журнал*. 1974. Т. 59, № 2. С. 283–295. [Makarova I. V. On the principles of specific and intraspecific taxonomy in diatomous algae. *Botanicheskii zhurnal*, 1974, vol. 59, no. 2, pp. 283–295. (in Russ.)].
6. Маркина Ж. В., Айздайчер Н. А. Влияние снижения солёности на рост и некоторые биохимические показатели *Chaetoceros socialis* f. *radians* (F. Schutt) Proshk.-Lavr. (Bacillariophyta) // *Альгология*. 2010. Т. 20, № 4. С. 402–412. [Markina Zh. V., Aizdaicher N. A. Desalination influence on the growth and certain biochemical characteristics of the *Chaetoceros socialis* f. *radians* (F. Schutt) Proshk.-Lavr. (Bacillariophyta). *Al'gologiya*, 2010, vol. 20, no. 4, pp. 402–412. (in Russ.)].
7. Михайлов В. И. Оценка значимости таксономических признаков видов рода *Nitzschia* (Bacillariophyta) // *Ботанический журнал*. 1982. Т. 67, № 8. С. 1090–1094. [Mikhailov V. I. The evaluation of the taxonomical of the species of the genus *Nitzschia* (Bacillariophyta). *Botanicheskij zhurnal*, 1982, vol. 67, no. 8, pp. 1090–1094. (in Russ.)].
8. Прошкина-Лавренко А. И. *Диатомовые водоросли бентоса Чёрного моря*. Москва ; Ленинград : АН СССР, 1963. 244 с. [Proshkina-Lavrenko A. I. *Diatomovye vodorosli bentosa Chernogo morya*. Moscow ; Leningrad: AN SSSR, 1963, 244 p. (in Russ.)].
9. Рябушкина Н. А. Клональная и микроклональная изменчивость растений // *Биотехнология. Теория и практика*. 2014. № 2. С. 17–27. [Ryabushkina N. A. Clonality and samoclonal variations in plants. *Biotechnologiya. Teoriya i praktik*, 2014, no. 2, pp. 17–27. (in Russ.)]; doi:10.11134/btp.2.2014.3.
10. Рябушко Л. И. *Микроводоросли бентоса Чёрного моря (Чек-лист, синонимика, комментарий)*. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2006. 143 с. [Ryabushko L. I. *Mikrovodorosli bentosa Chernogo morya (Chek-list, sinonimika, kommentarii)*. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2006, 143 p. (in Russ.)].
11. Рябушко Л. И., Бондаренко А. В. *Микроводоросли планктона и бентоса Азовского моря (Чек-лист, синонимика, комментарий)*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. 211 с. [Ryabushko L. I., Bondarenko A. V. *Mikrovodorosli planktona i bentosa Azovskogo morya (Chek-list, sinonimika, kommentarii)*. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2011, 211 p. (in Russ.)].
12. Чепурнов В. А., Манн Д. Д. Изучение жизненных циклов и репродуктивного поведения диатомовых водорослей в Карадагском природном заповеднике // *Карадаг. История, биология, археология : сборник научных трудов, посвященный 85-летию Карадагской биологической станции им. Т. И. Вяземского* / ред. А. Л. Морозова, В. Ф. Гнубкин. Симферополь : «Сонат», 2001. С. 159–175. [Chepurnov V. A., Mann D. D. Izuchenie zhiznennykh tsiklov i reproductivnogo povedeniya diatomovykh vodoroslei v Karadagskom prirodnom zapovednike. In: *Karadag. Istoriya, biologiya, arkheologiya: sbornik nauchnykh trudov, posvyashchennyi 85-letiyu Karadagskoi biologicheskoi stantsii im. T. I. Vyazemskogo*. A. L. Morozova, V. F. Gnyubkin (Eds.). Simferopol: «Sonat», 2001, pp. 159–175. (in Russ.)].
13. Шоренко К. И., Давидович Н. А., Куликовский М. С. Изменчивость морфологических и структурных элементов панциря в генетически однородных и разнородных группах диатомовой водоросли *Nitzschia rectilonga* Takano, 1983 (Bacillariophyta) // *Биология моря*. 2014. Т. 40, № 5. С. 364–378. [Shorenko K. I., Davidovich N. A., Kulikovskiy M. S. The variability of the morphological and structural elements of the frustule in genetically homogeneous and heterogeneous groups of the diatom *Nitzschia rectilonga* Takano, 1983 (Bacillariophyta). *Biologiya morya*, 2014, vol. 40, no. 5, pp. 364–378. (in Russ.)] ; doi:10.1134/S1063074014050083.

14. Шоренко К.И., Давидович Н.А., Давидович О.И. Влияние солёности на морфологические характеристики панцирей двух близких видов диатомовых водорослей *Nitzschia longissima* (Bréb.) Grunow и *N. rectilonga* Takano // *Морской экологический журнал*. 2014. Т. 13, № 3. С. 75–80. [Shorenko K.I., Davidovich N.A., Davidovich O.I. Effect of salinity on the morphological characteristics of the two closely related species of diatom *Nitzschia longissima* (Bréb.) Grunow and *N. rectilonga* Takano. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 75–80. (in Russ.)].
15. Шоренко К.И., Давидович Н.А., Куликовский М.С., Давидович О.И. Видовые границы и особенности биогеографии двух близких видов диатомовых водорослей *Nitzschia longissima* (Bréb.) Grunow и *N. rectilonga* Takano // *Биология внутренних вод*. 2016. № 1. С. 21–29. [Shorenko K.I., Davidovich N.A., Kulikovskiy M.S., Davidovich O.I. The species boundaries and biogeography of two closely related diatom species: *Nitzschia longissima* (Bréb.) Grunow, 1862 and *N. rectilonga* Takano, 1983. *Biologiya vnutrennikh vod*, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 21–29. (in Russ.)]; doi:10.1134/S1995082916010156.
16. Agardh C. A. *Systema algarum*. Berlingianis, 1824. 312 p. (in Latin).
17. Balzano S., Sarno D., Ekooistra W.H.C. Effect of salinity on the grown rate and morphology of ten *Skeletonema* strains. *Journal of Plankton Research*, 2011, vol. 33, iss. 6, pp. 937–945. doi:10.1093/plankt/fbq150.
18. Falasco E., Bona F., Badino G., Hoffmann L., Ector L. Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia*, 2009, vol. 623, iss. 1, pp. 1–35; doi:10.1007/s10750-008-9687-3.
19. Fernandes L.F., Brandini F.P., Gutseit K.S., Fonseca A.L., Pellizari F.M. Benthic diatoms growing on glass slides in the Paranaguá Bay, Southern Brazil: taxonomic structure and seasonal variation. *Florianópolis*, 1999, vol. 28, pp. 53–100.
20. Kawamura T., Hirano R. Notes on attached diatoms in Aburatsubo bay, Kanagawa prefecture, Japan. *Bulletin Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory*, 1989, no. 51, pp. 41–73.
21. Kitton F. A description of some new species of Diatomaceae. *Monthly Microscopical Journal*, 1873, vol. 10, no. 5, pp. 205–207.
22. Lobban C.S., Schefter M., Jordan R.W., Arai Y., Sasaki A., Theriot E.C., Ashworth M., Ruck E.C., Pennesi Ch. Coral-reef diatoms (Bacillariophyta) from Guam: new records and preliminary checklist, with emphasis on epiphytic species from farmer-fish territories. *Micronesica*. 2012, vol. 43, no. 2, pp. 237–479.
23. Poulin M., Cardinal A., Bérard-Therriault L. *Ardissonia crystallina* (Bacillariophyceae): une cryst en microscopie électronique à balayage des cristall structuraux des valves. *Canadian Journal of Botany*, 1987, no. 65, pp. 2686–2689. (in French).
24. Trobajo R., Rovira L., Mann D.G., Cox E.J. Effect of salinity on growth and on valve morphology of five estuarine diatoms. *Phycologia Research*. 2011, vol. 59, iss. 2, pp. 83–90; doi:10.1111/j.1440-1835.2010.00603.x.
25. Witkowski A., Lange-Bertalot H., Metzeltin D. *Diatom Flora of Marine Coast. Vol. 7. I. Iconographia Diatomologica*. Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag K. G., 2000, 925 p.

### **Morphological variation of two marine diatom species, *Nitzschia ventricosa* and *Ardissonia crystallina* (Bacillariophyta)**

**K. I. Shorenko<sup>1</sup>, Yu. A. Podunay<sup>1</sup>, O. I. Davidovich<sup>1</sup>, M. S. Kulikovskiy<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Vyazemsky Karadag Scientific Station — Nature Reserve of RAS, Feodosia, Russian Federation

<sup>2</sup>Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russian Federation

E-mail: k\_shorenko@mail.ru

The relevance of the article is caused by insufficient knowledge of the problem of understanding of the diatoms species scope, particularly *in vitro*. The aim of the research is to study the morphological variability in cultures of two species of marine pennate diatoms, *Nitzschia ventricosa* and *Ardissonia crystallina* using methods of light and scanning electron microscopy. In addition we assessed the impact of salinity on morphological parameters of *A. crystallina* valves in the experiment, which is used in the diagnosis of the type. The material for investigation were isolates (algological pure cultures and clones) obtained *in vitro*. *N. ventricosa* isolates were received from natural populations collected at coasts of Canary Islands, Islands of Martinique and Texas (Gulf of Mexico). The clones of *A. crystallina* were allocated from benthic samples in Kazachya Bay (Sevastopol, the Black Sea). The culture was established with the micropipette way and grown in Petri dishes on ESAW media with natural light at a temperature of 20 °C. We refer to a clone (strain) as vegetative offspring derived from a single cell, while the algological pure culture is a group of clones of the same species. The algological pure culture of *A. crystallina* (consisting of several strains) was physically separated and grown in parallel with six levels of salinity (8, 12, 17, 30, 38 and 48 ‰) for two months. To obtain the required initial salinity the medium salinity (36 ‰) was diluted with the necessary amount of distilled water, or NaCl was added. The terms of keeping of cultures in artificial conditions until the preparation of drugs were no more than 2

months longer, in order to avoid teratological changes. The species *Nitzschia ventricosa* was originally discovered on the coast of Hong Kong and described in 1873 by the British naturalist F. Kitton. In the Black and Azov seas' benthos and plankton the species *N. ventricosa* was not observed. While studying the collected materials of the British Natural History Museum (London), the holotype of *N. ventricosa* was not marked by F. Kitton. The slide № 10365 from the collections of the British Museum (Collection Deby), with this type of material from Hong Kong, was studied. The material in the slide was decided to be authentic (*specimina authentica*). The material showed the proximity of morphometric characteristics of the valves. Data was compared to the ones given from other Pacific populations. The species *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow was described by Swedish botanist C. Agardh in 1824 as *Diatoma crystallinum* C. Agardh. The type locality (*locus typicus*) are the waters of Sinus Codani, which corresponds to Kattegat Strait, located between the East coast of the Jutland peninsula and the south-western part of the Scandinavian Peninsula. Both species are widely distributed in the oceans and are found regularly in the benthos and plankton, however, they have not been studied in cultures. The following conclusions were obtained: **1.** Morphological variability in cultures of *N. ventricosa* and *A. crystallina* was comparable with those obtained on the material from natural populations. **2.** We managed to get both types of auxospore in the cultures that allowed us to estimate the upper limit of the size range of both types of cells. For *N. ventricosa* it was 616.0  $\mu\text{m}$ , for *A. crystallina* the maximum length was 678.0  $\mu\text{m}$ . **3.** The variation of number of striae and fibulae in one clone of *N. ventricosa* was higher than in pure cultures. **4.** It has been shown that *A. crystallina* was able to live while salinity was from 8 to 48 ‰. **5.** The *A. crystallina* culture derived from natural population of the Black Sea, was close to the number of striae to the population from the coast of Canada (Shalër Bay). **6.** The content of the cultures at different rates of salinity for two months has not led to significant morphological changes of *A. crystallina* cells. There was no effect of salinity on qualitative morphological features of *A. crystallina*. With an increase of salinity in the experiment arrangement density of striae and areolae of *A. crystallina* tend to increase, and the width of the cell — to decrease. With the increase of salinity, an increase of the breadth ranges of the striae number variation was observed.

**Keywords:** diatoms, *Nitzschia ventricosa*, *Ardissonea crystallina*, morphological variability