

РЕПРОДУКТИВНАЯ СОВМЕСТИМОСТЬ И ТОКСИКОГЕННАЯ
АКТИВНОСТЬ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Pseudo-nitzschia calliantha*
Lundholm, Moestrup & Hasle ИЗ ТРЕХ ГЕОГРАФИЧЕСКИ
УДАЛЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

© 2022 г. С. Л. Полякова^{а, *}, Н. А. Давидович^а, И. В. Стоник^б, Н. А. Мартыненко^с,
Ю. А. Подунай^а, Т. Ю. Орлова^б, М. С. Куликовский^с

^аКарадагская научная станция имени Т. И. Вяземского — природный заповедник Российской академии наук — филиал
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
“Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского Российской академии наук”,
Феодосия, Республика Крым, Россия

^бНациональный научный центр морской биологии имени А. В. Жирмунского Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, Россия

^сИнститут физиологии растений имени К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: sviatlana.poliakova.77@mail.ru

Поступила в редакцию 25.12.2021 г.

После доработки 23.01.2022 г.

Принята к публикации 09.02.2022 г.

Используя методы репродуктивной биологии получено успешное меж- и внутри- популяционное половое воспроизведение штаммов *Pseudo-nitzschia*, выделенных из трех географически удаленных районов. Репродуктивная совместимость подтверждает принадлежность клоновых культур к токсикогенному виду-космополиту *P. calliantha*. Ввиду отсутствия внутриклонового воспроизведения можно говорить о гетеротализме этого вида. На основании молекулярно-генетического анализа, выполненного с использованием хлоропластного гена *rbcL*, построено филогенетическое дерево, показывающее схожесть штаммов *P. calliantha*, выделенных из Черного, Южно-Китайского и Адриатического морей. Отмечена относительная эвригалинность вида *P. calliantha*. С помощью иммуноферментного анализа установлена высокая концентрация домоевой кислоты (амнезиотоксина) в крымских и вьетнамских клоновых культурах *P. calliantha*.

Ключевые слова: *Pseudo-nitzschia calliantha*, штамм, половое воспроизведение, популяция, “цветение”, токсичность

DOI: 10.31857/S0015330322050177

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день известно 26 токсикогенных видов из рода *Pseudo-nitzschia* [1], в том числе *P. calliantha*. Все эти виды привлекают внимание как источники домоевой кислоты — нейротоксина, принадлежащего к гетероциклическим аминокислотам и вызывающего амнезическое отравление моллюсками (ASP — amnesic shellfish poisoning) [2, 3]. В отличие от других морских токсинов, она является полярным пренилированным производным пролина и вызывает повреждение и гибель нервных клеток в результате гиперактивации глутаминовых рецепторов центральной нервной системы [4]. В период быстрого увеличения численности токсикогенных водорослей домоевая кислота способна накапливаться и передаваться по пищевым цепям [5]. Наступление периодов “цветения” циклично [6] и, очевидно, тесно связано с

важнейшими биологическими характеристиками видов: жизненным циклом и половым воспроизведением [7].

Жизненный цикл *P. calliantha* изучен достаточно хорошо [8–11]. Как и у других представителей класса Bacillariophyta, он состоит из двух основных фаз. В период вегетативной фазы клетки делятся митотически. Затем, при достижении клетками определенных размеров, наступает генеративная фаза, в течение которой возможно половое воспроизведение, сопровождающееся гаметогенезом, оплодотворением, формированием ауксоспор и инициальных клеток. Следствием является появление новых поколений вегетативных клеток [12–14].

В настоящее время в литературе сообщается о 53 видах *Pseudo-nitzschia* [15], большинство из которых близкородственны и мало различимы при определении видовой принадлежности с исполь-

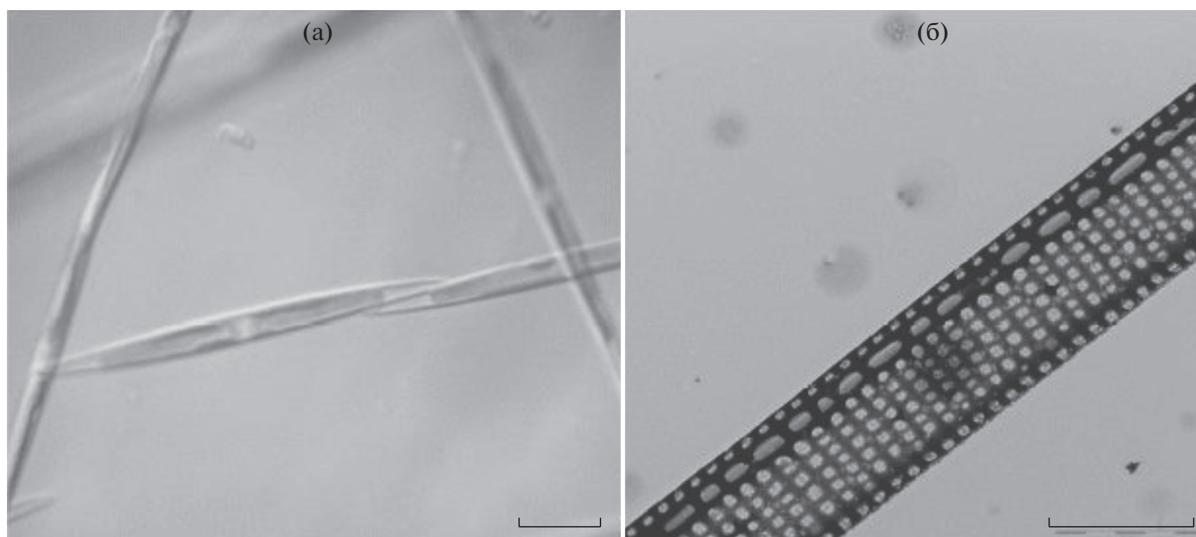


Рис. 1. *Pseudo-nitzschia calliantha*, клетки клона 8.0123-G: а — общий вид клеток, световая микроскопия, масштаб линейки 1.1 мкм; б — фрагмент створки, показывающей фибулы и штрихи, трансмиссионная электронная микроскопия, масштаб линейки 2 мкм.

зованием световой микроскопии. Результаты молекулярно-генетического анализа также зачастую недостаточны для доказательства расхождения видов, как в случае различающихся морфотипов, так и у криптических видов [16–19]. Существует несколько критериев вида [20]. В рамках биологической концепции вида [21] основным существенным критерием видообразования является утрата возможности генетического обмена вследствие появления репродуктивной изоляции. Методы репродуктивной биологии, в первую очередь экспериментальное скрещивание клонов, позволяют на практике определить видовые границы.

Морская диатомовая токсикогенная водоросль *P. calliantha* имеет широкий современный ареал. Она встречается в Арктике (например, у острова Гершель), на Европейском побережье Атлантики, в Черном море и других местах [9, 10, 22–26]. В связи с широким распространением *P. calliantha* возникает вопрос о конспецифичности популяций, удаленных друг от друга на тысячи километров [27].

Цель работы — установление наличия или отсутствия репродуктивной изоляции между географически удаленными популяциями, представленными штаммами, по своему морфотипу относящимися к *P. calliantha*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась планктонная пениатная диатомовая водоросль *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle (рис. 1а, б). Для получения материалов в 2017–2019 гг. отбирались планктонные пробы из следующих мест: у по-

бережий Юго-Восточного и Юго-Западного Крыма (г. Керчь, восточная оконечность мыса Опук, 45°02'54 с.ш., 36°14'58 в.д.; Карадагская бухта, 44°54'48 с.ш., 35°14'05 в.д.; бухта Львиная, 44°09'11 с.ш., 35°20'56 в.д.; бухта Ласпи, 44°24'44 с.ш., 33°42'57 в.д.; Севастопольская бухта, 44°37'00 с.ш., 33°31'37 в.д.; Каламитский залив, 45°09'51 с.ш., 33°28'07 в.д.; озеро Донузлав, 45°18'44 с.ш., 33°00'56 в.д.), Вьетнама (бухта Халонг 20°54'00 с.ш., 107°12'00 в.д.) и Канарских островов (остров Тенерифе 28°01'40 с.ш., 16°35'33 в.д.) (рис. 2). Из проб, доставленных в лабораторию, микропипеточным способом [28] с использованием инвертированных оптических микроскопов Nib-100 и Bif-100 (Китай) выделены одиночные клетки, давшие начало клоновым культурам. Измерение клеток производили на микроскопе Bio-lar PI (“PZO”, Польша) с помощью окулярной линейки, калиброванной по объект-микрометру. Фотографии сделаны при помощи микроскопа NIB-100 и фотокамеры Canon PowerShot A95 (“Canon”, США). Электронные фотографии панцирей получены на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) Carl Zeiss LIBRA-120 (“Carl Zeiss Group”, Германия). Для изучения морфотипов клоновых культур изготовлены постоянные препараты панцирей, залитые высокопреломляющей средой [29].

Культуры содержали в стеклянных чашках Петри диаметром 10 см и колбах Эрленмейера объемом 100 мл в изолированном помещении с постоянной температурой $20 \pm 2^\circ\text{C}$ при естественном освещении от окон с северной стороны. Для смешанных посевов использовали стеклянные чашки Петри диаметром 5 см. В качестве культу-



Рис. 2. Для получения материала отобраны планктонные пробы из следующих мест: 1 – Крым (юго-восточное и юго-западное побережья), 2 – Вьетнам (бухта Халонг), 3 – Канарские острова (остров Тенерифе).

ральной среды применяли модифицированную искусственную среду ESAW [30]. Пересев в свежую среду осуществляли с периодичностью 10 дней. Скрещивание производили в среде с соленостью 36‰. Для адаптации черноморские штаммы за две недели до начала экспериментов были переведены в среду с указанной соленостью. Для определения содержания домоевой кислоты (ДК) культуры наращивали в колбах Эрленмейера объемом 500 мл. Концентрацию ДК в культурах измеряли методом конкурентного иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов ASP direct eLISA kit (“Biosence laboratories AS”, Норвегия). Пробоподготовку и анализ выполняли в соответствии с рекомендациями производителя [31]. Предел обнаружения метода eLISA составлял $0.003 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, предел количественного определения – $0.011 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$.

В образцах культур, находящихся в стационарной фазе роста, была определена суммарная концентрация токсина в пересчете на единицу объема культуры и его внутриклеточная концентрация. Перед анализом подсчитывали количество клеток диатомей в пробе, используя световой микроскоп (СМ) Olympus BX 41 (Япония). Клетки в аликвотах объемом 50 мл разрушали ультразвуком в течение пяти минут с помощью ультразвуковой установки Branson Sonifer 450 (“Branson Ultrason-

ics Corp.”, США) мощностью 100 Вт с использованием зонда диаметром 1 см при охлаждении на льду в течение 2–4 мин. Затем проверяли разрушение клеток под СМ. При необходимости повторяли процедуру. Полученную пробу фильтровали через одноразовый шприцевой фильтр (Millex-GS Sprise Filter Unit, размер пор 0.22 мкм , “Merck Millipore”, Германия) для удаления клеточного мусора. Фильтрат до проведения анализа хранили при температуре -20°C . Измерения оптической плотности растворов выполняли с помощью микропланшетного фотометра BioTek ELx800 (“BioTek”, США) при длине волны 450 нм . Внутриклеточную концентрацию ($\text{пг} \cdot \text{кл}^{-1}$) рассчитывали путем деления суммарной концентрации ДК ($\text{пг} \cdot \text{мл}^{-1}$) на количество клеток в миллилитре в соответствующих образцах.

Тотальная ДНК была выделена из моноклоновых культур с помощью раствора для выделения ДНК InstaGene™ Matrix Bio-Rad (США), согласно методике производителя. Амплификацию фрагментов гена *rbcL* хлоропластной ДНК (номер доступа в Генбанке 68648857) проводили с помощью ПЦР, используя готовую смесь реагентов ScreenMix (“Евроген”, Россия) и пару праймеров *rbcL66+* (5'-ТТААГГАААААААТГТСТСААТСТГ-3') и *rbcL1255* – (5'-ТТGGTGCATTTGACCACAGT-3') [32]. Амплификация региона хлоропластной

ДНК была проведена при следующих условиях: начальная денатурация – 5 мин при 95°C, далее 35 циклов денатурации при 94°C (30 с), отжига праймеров при 57°C (30 с) и элонгации при 72°C (90 с), и финальной элонгации при 72°C (5 мин). Контроль результатов ПЦР осуществляли путем горизонтального электрофореза продуктов амплификации в 1.5% агарозном геле в 1.5x трис-ацетатном буфере, pH 7.6 (1x буфер: 40 mM трис, 1 mM EDTA, уксусная кислота, вода) с последующим окрашиванием SYBR Safe (“Bio-Rad”, США) и фотографированием в УФ-свете в системе геледокументации GelDoc XR (“Bio-Rad”, США). Очистка фрагментов ДНК была произведена с помощью ExoSAP-IT kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно протоколу производителя. Для реакции секвенирования применяли набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с использованием сначала прямого, а затем обратного праймеров, указанных для ПЦР. Очистку продуктов реакции секвенирования от непрореагировавших меченых нуклеотидов осуществляли с помощью набора BigDye X Terminator TM Purification Kit (“Applied Biosystems”, США). Определение нуклеотидных последовательностей проводили методом Сэнгера в двух направлениях при помощи прямого и обратного праймеров, указанных для ПЦР, с последующим электрофорезом с использованием генетического анализатора Genetic Analyzer 3500 (“Applied Biosystems”, США). Полученные последовательности были проверены вручную, собраны и выровнены с помощью алгоритма ClustalW со стандартными параметрами в программе MegaX [33]. Последовательности гена *rbcL* для исследованных нами штаммов депонированы в базу данных Генбанк под номерами OM223068–OM223073. Для получения массива данных из Генбанка были взяты 54 последовательности гена *rbcL* хпДНК различных видов рода *Pseudo-nitzschia*. Две последовательности *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith были выбраны в качестве внешней группы. После финального редактирования общий массив данных содержал 62 последовательности по 845 п.н. каждая. Далее в программе MEGA X для имеющегося набора данных была определена модель нуклеотидных замен (GTR+G+I), и на ее основе проведен филогенетический анализ методом максимального правдоподобия (ML) с использованием 1000 бутстреп-повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На протяжении 2018 г. было проведено несколько десятков экспериментов по скрещиванию клонов из разных популяций: черноморской, тихоокеанской и атлантической. Половое воспроизведение наблюдали как внутри отдельных популяций: черноморской и вьетнамской,

так и при межпопуляционных скрещиваниях (табл. 1). За 4-летний период наблюдений внутриклонового воспроизведения не отмечали, что говорит о вероятной облигатности гетероталлического пути в системе скрещивания этого вида.

Как и у большинства других видов *Pseudo-nitzschia*, в смешанных посевах сексуально совместимых штаммов клетки, участвующие в половом воспроизведении, образуют гаметангиальные пары. В гаметангиальных клетках формируются по две гаметы. Все гаметы морфологически неразличимы. При этом обе гаметы мужского гаметангия активны, способны к перемещению. Плавно перетекая, они сливаются с гаметами женского гаметангия. Формируются зиготы. Растущие ауксоспоры и инициальные клетки параллельны друг другу и перпендикулярно прикреплены к панцирям родительских клеток (рис. 3).

Филогенетическое дерево, построенное на основании полиморфизма фрагмента гена *rbcL* хпДНК, показывает схожесть черноморских штаммов *P. calliantha* (озеро Донузлав и бухта Львиная) и девяти штаммов из Генбанка, выделенных из Адриатического моря (Триестский залив, побережье Италии и Словении). Нуклеотидные отличия в хлоропластном гене репродуктивно совместимых вьетнамского и черноморских штаммов оказались крайне незначительными (одна нуклеотидная замена). Такое же незначительное расхождение можно отметить для черноморских штаммов и штамма AL-117 из Тирренского моря (номер в Генбанке DQ813825). Адриатический штамм PS 12 (LR594650) отличался на четыре нуклеотида (рис. 4). Несмотря на незначительное число, нуклеотидные замены в гене *rbcL* у *P. calliantha* влияли на аминокислотную последовательность кодируемого белка. Таким образом, в изменчивой области аминокислотной последовательности у вьетнамского штамма 7.1230-В лейцин был заменен на фенилаланин. Однако этот признак нельзя назвать апоморфным, так как данная замена встречается и у других штаммов рода *Pseudo-nitzschia*.

Для определения токсикогенной активности выполнен иммуноферментный анализ (ELISA/ИФА), который показал относительно высокую концентрацию домоевой кислоты в крымских клоновых культурах *P. calliantha* (табл. 2). Из 15 изученных штаммов в таблице представлены те, у которых внутриклеточное содержание домоевой кислоты оказалось выше 0.003 пг · кл⁻¹. Наибольшая концентрация ДК (0.063 пг · кл⁻¹) наблюдалась в черноморском штамме 7.0804-Si5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные аллопатрические популяции *P. calliantha* разделены большими расстояниями. Меж-

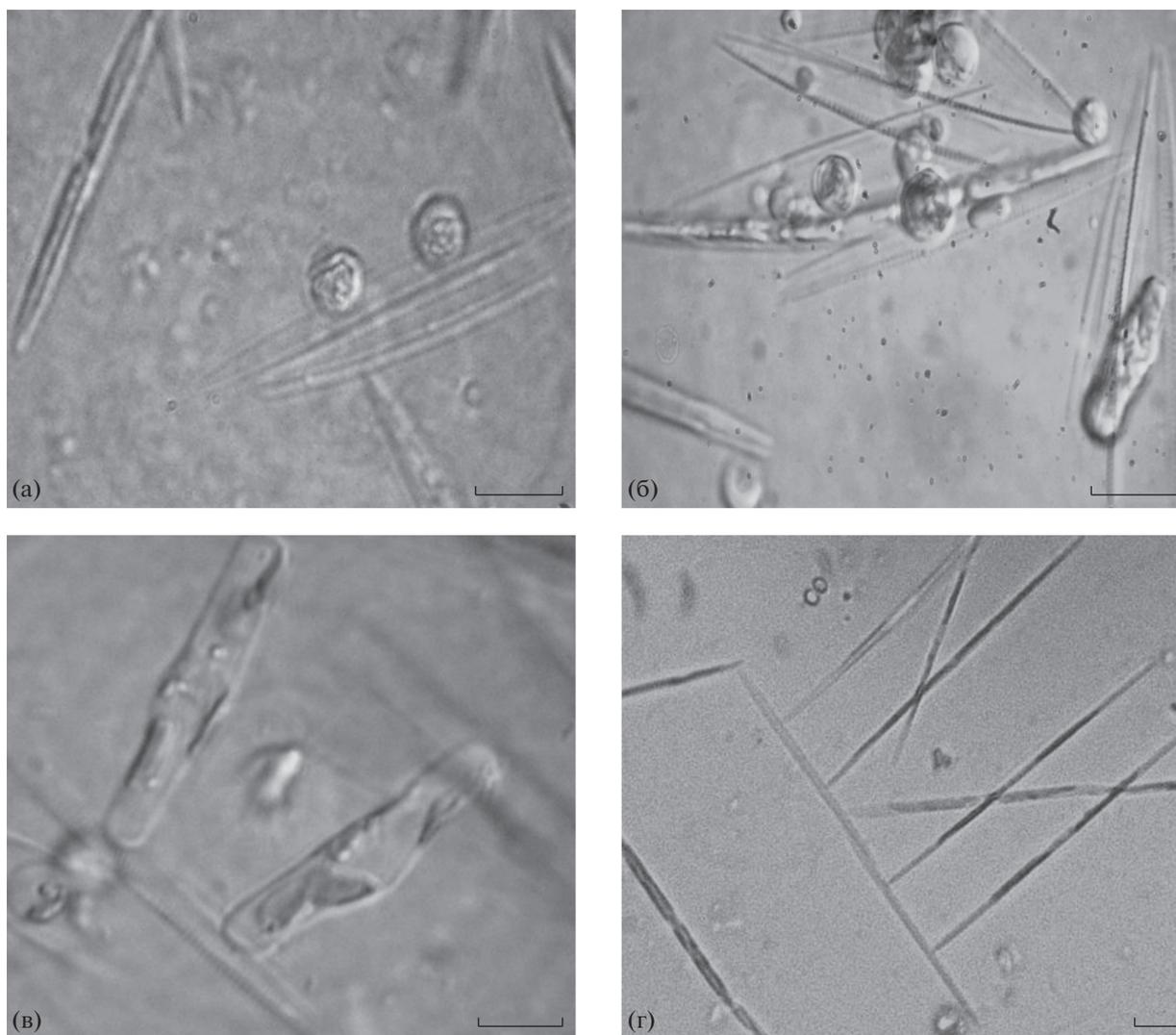


Рис. 3. Этапы процесса полового воспроизведения сексуально совместимых штаммов *P. calliantha*: а, б – клетки гаметангии с прикрепленными к ним зиготами; в – растущими ауксоспорами; г – инициальными клетками; а, б, в – масштаб линейки – 1.1 мкм; г – масштаб линейки – 0.7 мкм.

ду Черным и Южно-Китайским морями около 8 тыс. км, между Черным морем и Канарскими островами более 4.5 тыс. км, между Канарскими островами и Южно-Китайским морем около 12.5 тыс. км. Несмотря на удаленность популяций, между ними отсутствует биологический репродуктивный барьер, по крайней мере, нет презиготической изоляции в первом поколении. Такой обширный ареал говорит о космополитизме этого вида, о чем сообщают и другие авторы [18, 34]. Примеры отсутствия репродуктивной изоляции между удаленными популяциями известны также для других видов из рода *Pseudo-nitzschia*, в частности вида *P. pungens* [27, 35].

P. calliantha можно считать эвригалинным видом, у него достаточно широкая толерантность к солености (18–40‰ в наших экспериментах).

При этом наблюдения за клоновыми культурами показали, что черноморские штаммы с повышением солености нарастали лучше, чем в “родной” для них среде 18‰. Вьетнамские и канарские штаммы, напротив, в среде с пониженной соленостью практически переставали делиться, что приводило к слабому нарастанию культур. Можно предположить, что изначально океанический вид *P. calliantha*, распространяющийся течениями, попав в новое для него место обитания (Черное море в постэвксинский период), был способен адаптироваться к изменившимся условиям. Различия условий местообитания популяций делают возможным изменения некоторых экофизиологических характеристик, как в случае с *P. pungens* [36]. Даже если допустить наличие экофизиологических различий между изученными популяциями *P. calliantha*,

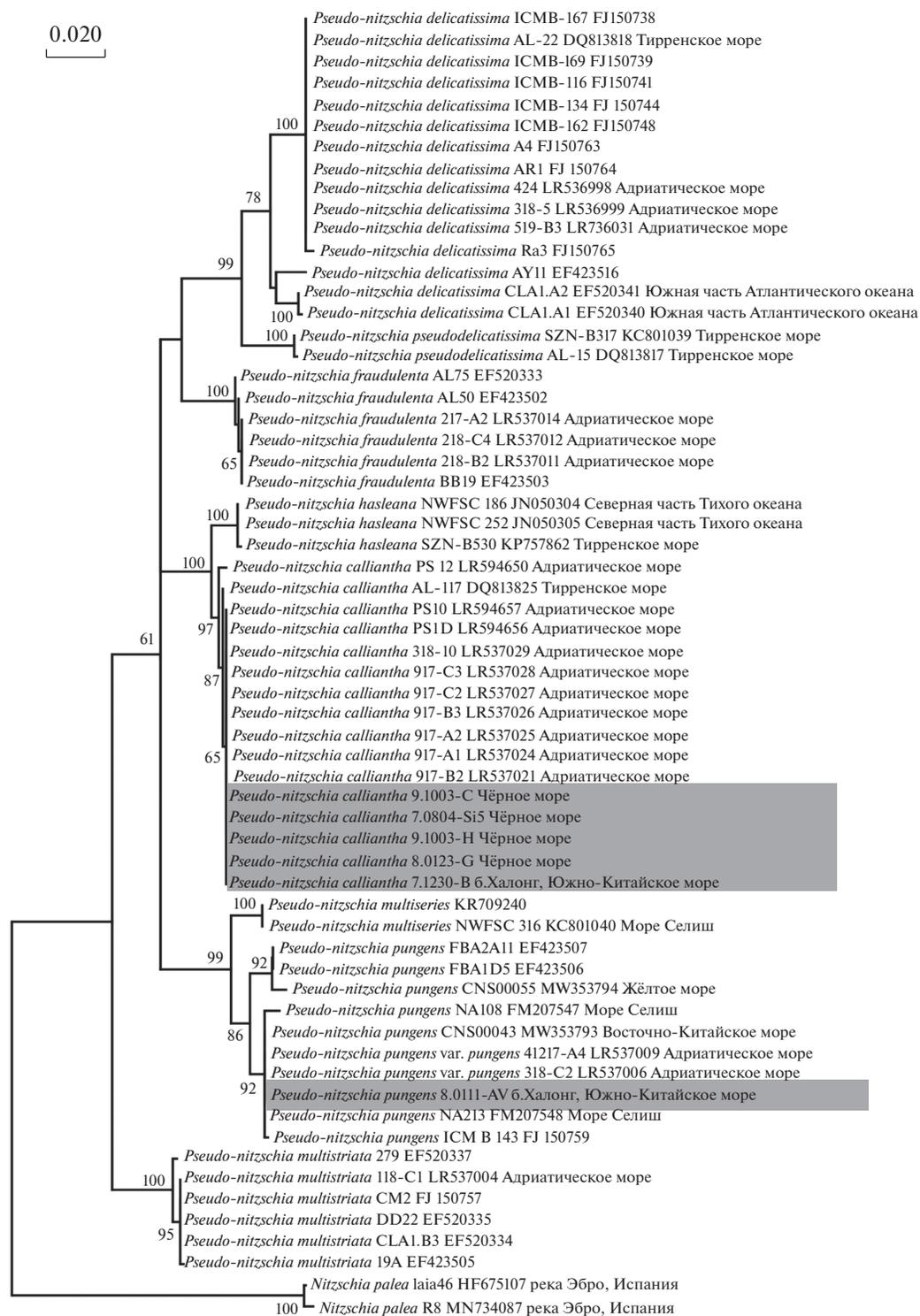


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании сравнения 60 нуклеотидных последовательностей гена *rbcL* хпДНК представителей рода *Pseudo-nitzschia*. В обозначениях ветвей дерева указаны видовые названия, названия штаммов, номера в Генбанке и места обитания. Значения бутстрепов указаны только для узлов, поддержанных более чем на 50%.

можно констатировать, что они не столь значительны для появления репродуктивных барьеров и расхождения видов.

Большинство изученных видов рода *Pseudo-nitzschia* двудомны, для них характерно гетероталлическое половое воспроизведение. Гомоталлизм

Таблица 2. Концентрация домоевой кислоты (DA), определенная методом ИФА/ELISA в культурах *Pseudo-nitzschia calliantha* из Черного и Южно-Китайского морей

Обозначение клона	Локализация популяции	Суммарная* концентрация DA в культуре, пг · мл ⁻¹	Внутриклеточная концентрация DA, пг · кл ⁻¹
7.0822-B	Севастополь	6142 ± 1165	0.0533 ± 0.0101
7.0804-Si5	Карадаг	14082 **	0.0627 **
7.0806-A	Карадаг	3318 ± 564	0.0283 ± 0.0048
7.0804-F	б. Лисья	1481 ± 290	0.0055 ± 0.0011
7.0804-N	Коктебель	4547	0.0217
7.1230-A	б. Халонг	472 ± 206	0.0132 ± 0.0057
7.1230-B	б. Халонг	4353 ± 3186	0.0083 ± 0.0060
8.0110-C	б. Халонг	3154 ± 2214	0.0072 ± 0.0031

Примечание. * – внеклеточная (в среде) и внутриклеточная (в биомассе) концентрация DA; ** – наибольшая концентрация DA.

впервые отмечен у *P. brasiliensis* [37]. Это единственное описание полового процесса, протекавшего в моноклоновой культуре. В литературе встречаются требующие дополнительных исследований предположения о возможном гомоталлизме у представителей этого рода [8, 9].

Как отмечалось выше, вид *P. calliantha* токсичен. Высокая концентрация ДК, обнаруженная в черноморском клоне 7.0804-Si5, согласуется с соответствующими данными (0.10 пг · кл⁻¹) для изолятов *P. calliantha* из прибрежных вод Канады, где этот вид был определен как основной источник накопления ДК мидиями и другими моллюсками [38]. Необходимо заметить, что культивируемые на двух разных средах черноморские клоны *P. calliantha* показали различающиеся значения токсичности: в среднем 0.14 пг · кл⁻¹ в среде Гольдберга и 0.43 пг · кл⁻¹ в среде F/2 [39]. У *P. pungens*, еще одного токсикогенного вида, встречающегося в Черном море, внутриклеточная концентрация ДК в изученных штаммах (0.10–0.23 пг · кл⁻¹) оказалась более высокой, сходной с данными для этого вида из прибрежных вод Новой Зеландии (0.47 пг · кл⁻¹) [40].

Согласно директиве Евросоюза 2002/225/ЕС, максимально допустимая концентрация ДК в моллюсках, употребляемых в пищу, не должна превышать 20 мкг · г⁻¹ моллюсков. Полученное нами для культур водорослей значение 19 мкг · мл⁻¹ может указывать на потенциальную угрозу загрязнения моллюсков домоевой кислотой у берегов Крыма.

Работа выполнена в рамках государственного задания Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника Российской академии наук – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского Российской Академии наук” “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохими-

ческих, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”, номер госрегистрации 121032300019-0. Иммуноферментный анализ содержания токсина в культурах выполнен в рамках государственного задания ННЦМБ Дальневосточного отделения Российской Академии наук “Динамика морских экосистем, адаптации морских организмов и сообществ к изменениям среды обитания”, номер госрегистрации 121082600038-3, с использованием оборудования Центра коллективного пользования (ЦКП) “Морской биобанк”. Электронные фотографии получены с использованием оборудования ЦКП “Дальневосточный центр электронный микроскопии”. Молекулярно-генетический анализ осуществлен в Институте физиологии растений имени К. А. Тимирязева Российской Академии наук в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, номер госрегистрации 121041200194-7.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bates S.S., Hubbard K.A., Lundholm N., Montresor M., Leaw C.P. *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011 / *Harmful Algae*. 2018. V. 79. P. 3. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.001>
2. Bates S.S. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added! // *J. Phycol.* 2000. V. 36. P. 978. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.03661.x>
3. Bates S.S., Trainer V.L. The ecology of harmful diatoms // *Ecology of Harmful Algae* / Eds. E. Granéli, J. T. Turner. Ecological Studies. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 2006. V. 189. P. 81. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8>
4. Stonik V.A., Stonik I.V. Marine excitatory amino acids: structure, properties, biosynthesis and recent ap-

- proaches to their synthesis // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 3049.
<https://doi.org/10.3390/molecules251330489>
5. Bates S.S. Toxic phytoplankton on the Canadian east coast: implications for aquaculture // *Bull. Aquac. Assoc. Can.* 1997. V. 97. P. 9.
 6. Congestri R., Micheli L., Pallechi G. Monitoring domoic acid in marine phytoplankton by disposable immunosensors // *Am. J. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1077.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2017.85071>
 7. Scalco E., Stec K., Iudicone D., Ferrante M.I., Montresor M. The dynamics of sexual phase in the marine diatom *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) // *J. Phycol.* 2014. V. 50. P. 817.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12225>
 8. Davidovich N.A., Bates S.S. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) // *J. Phycol.* 1998. V. 34. P. 126.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340126.x>
 9. Lundholm N., Moestrup Ø., Hasle G.R., Hoef-Emden K. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? // *J. Phycol.* 2003. V. 39. P. 797.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02031.x>
 10. Orlova T.Y., Stonik I.V., Aizdaicher N.A., Bates S.S., Léger C., Fehling J. Toxicity, morphology and distribution of *Pseudo-nitzschia calliantha*, *P. multistriata* and *P. multiseriata* (Bacillariophyta) from the northwestern Sea of Japan // *Bot. Mar.* 2008. V. 51. P. 297.
<https://doi.org/10.1515/BOT.2008.035>
 11. Polyakova S.L., Davidovich N.A., Stonik I.V., Orlova T.Yu. Life Cycle of Two Toxicogenic Species of Bacillariophyta: *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *P. pungens* (Grunow ex PT Cleve) // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 105.
<https://doi.org/10.31857/S0015330321060154>
 12. Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge: University Press. Cambridge, 1990. 747 p.
 13. Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms // *Intern. Rev. Cytol.* 2004. V. 237. P. 91.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)37003-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)37003-8)
 14. Gastineau R., Davidovich N. A., Hallegraeff G. M., Prober I., Mouget J.-L. Reproduction in Microalgae // *Reproductive Biology of Plants* / Eds. K.G. Ramawat, J.M. Mérillon, K.R. Shivanna // CRC Press, 2014. P. 1.
 15. Guiry M.D., Guiry G.M. *Algae Base Worldwide Electronic Publication*, Nat. Univ. Ireland, Galway. 2020. Available online: <http://www.algaebase.org> (accessed on 10 September 2020).
 16. Orsini L., Sarno D., Procaccini G., Poletti R., Dahlmann J., Montresor M. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species // *Eur. J. Phycol.* 2002. V. 37. P. 247.
<https://doi.org/10.1017/S0967026202003608>
 17. Cerino F., Orsini L., Sarno D., Dell'aversano C., Tartaglione L., Zingone Z. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* // *Harmful Algae*. 2005. V. 4. P. 33.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.10.005>
 18. Amato A., Kooistra W.H.C.F., Levaldi Ghiron J.H., Mann D.G., Pröschold T., Montresor M. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms // *Protist*. 2007. V. 158. P. 193.
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.10.001>
 19. Kaczmarek I., Medlin L. Reply to comment by Theriot (2008) on Kaczmarek et al. (2006) // *J. Phycol.* 2009. V. 45. P. 987.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00721.x>
 20. Amato A. Species concepts and definitions: reproductive isolation as a tool to reveal species boundaries // *The International Journal of Plant Reproductive Biology*. 2010. V. 2. P. 114.
 21. Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М.: Мир, 1974. 460 с.
 22. Churro C.I., Carreira C.C., Rodrigues F.J., Craveiro S.C., Calado A.J., Casteleyn G., Lundholm N. Diversity and abundance of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Aveiro coastal lagoon, Portugal and description of a new variety, *P. pungens* var. *aveirensis* var. nov. // *Diatom Res.* 2009. V. 24. P. 35.
<https://doi.org/10.1080/0269249X.2009.9705782>
 23. Moschandreaou K.K., Nikolaidis G. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Greek coastal waters // *Bot. Mar.* 2010. V. 53. P. 159.
 24. Stonik I.V., Orlova T.Y., Lundholm N. Diversity of *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from the western North Pacific // *Diatom Res.* 2011. V. 26. P. 121.
<https://doi.org/10.1080/0269249X.2011.573706>
 25. Ajani P., Murray S., Hallegraeff G., Lundholm N., Gillings M., Brett S., Armand L. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New South Wales, Australia: morphotaxonomy, molecular phylogeny, toxicity, and distribution // *J. Phycol.* 2013. V. 49. P. 765.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12087>
 26. Teng S.T., Leaw C.P., Lim H.C., Lim P.T. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Malaysia, including new records and a key to species inferred from morphology-based phylogeny // *Bot. Mar.* 2013. V. 56. P. 375.
<https://doi.org/10.1515/bot-2012-0194>
 27. Kim J.H., Ajani P., Murray S.A., Kim J.H., Lim H.Ch., Teng S.T., Lim P.T., Han M.S., Park B.S. Sexual reproduction and genetic polymorphism within the cosmopolitan marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* // *Sci. Rep.* 2020. V.10. 10653.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67547-9>
 28. Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M. *Algal Culturing Techniques*. London, Elsevier Academic Press, 2005. 578 p.
 29. Рошчин А.М. Жизненные циклы диатомовых водорослей. Киев: Наукова думка, 1994. 171 с.
 30. Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3. С. 73.
<https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.2.06>

31. *Latimer G. W.* AOAC International // Official methods of analysis of AOAC International. 19th ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International. 2012.
32. *Alverson A.J., Jansen R.K., Theriot E.C.* Bridging the Rubicon: phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms // *Mol. Phyl. Evol.* 2007. V. 45. P. 193. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.024>
33. *Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // *Mol Biol Evol.* 2018. V. 35. P. 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
34. *Hasle G.R.* Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? // *Harmful Algae.* 2002. V 1. P. 137. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00014-8)
35. *Casteleyn G., Chepurnov V.A., Leliaert F., Mann D.G., Bates S.S., Lundholm N., Rhodes L., Sabbe K., Vyverman W.* *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? // *Harmful Algae.* 2008. V. 7. P. 241. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.08.004>
36. *Kim J.H., Park B.S., Kim J.H., Wang P.* Intraspecific diversity and distribution of the cosmopolitan species *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): morphology, genetics, and ecophysiology of the three clades // *J. Phycol.* 2015. V. 51. P. 159. <https://doi.org/10.1111/jpy.12263>
37. *Quijano-Scheggia S., Garcés E., Andree K., Fortuño, J.M., Camp, J.* Homothallic auxosporulation in *Pseudo-nitzschia brasiliiana* (Bacillariophyta) // *J. Phycol.* 2009. V. 45. P. 100.
38. *Martin J.L., Haya K., Burrige L.E., Wildish D.J.* *Nitzschia pseudodelicatissima* a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1990. V. 67. P. 177.
39. *Рябушко Л.И., Бесиктене С., Едигер Д., Илмаз Д., Зенгинер А., Рябушко В.И., Лу Р.И.* Токсичная диатомовая водоросль *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle из Черного моря: морфология, таксономия, экология // *Морской экологический журнал.* 2008. Т. 7. С. 51.
40. *Rhodes L., White D., Syhre M., Atkinson M.* *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links to shellfish toxicity // *Harmful and Toxic Algal Blooms / Eds. T. Yasumoto, Y. Oshima, Y. Fukuyo* Paris, IOC of UNESCO. 1996. P. 155.