

藻類学最前線



珪藻の生殖研究あれこれ

佐藤晋也

珪藻はガラスでできた細胞壁をもつ。この細胞壁は被殻と呼ばれ、複雑な構造を形作り美しい模様をもつ。数多くの人がこのミクロの造形美に魅了され、珪藻を愛する人々の集まりである国際珪藻学会 International Society for Diatom Research は2年に一度大会を開き、学会誌 Diatom Research は年4巻の刊行を維持している。国内に目を向けても日本珪藻学会は大会と研究集会を毎年開催し、さらに年会誌 Diatom の発行と、おそらく単一の藻類グループを研究対象とした集団の中では最も研究者人口が多くアクティビティの高い部類に入るのではないと思われる。この情熱は電子顕微鏡の普及と共に被殻の形態研究という一大ムーブメントを生み出し、今日に至るまで上述の珪藻専門雑誌やその他の藻類学関連誌上において盛んに被殻形態に関する報告や新種記載が行われている。

珪藻分類に必要な情報はほぼ被殻のみから得られるため、野外で採集した試料もしくは単離培養して得られた細胞は、まず薬品により有機物を洗い流し、残ったシリカの被殻のみを研究に用いる。つまり、この方法では生細胞の情報は全く得られず、そのため被殻形態の情報蓄積量を考えると、生き物としての珪藻に関する知見は驚くほど少なかった。近年分子生物学的ツールやタイムラプス撮影装置の普及により珪藻の生き様についての知見、特に生殖に関して興味深い発見が相次いでいる。本稿ではこれまでの珪藻の生殖研究についてこれまでの流れを簡単に紹介し、最新的话题を提供したい。

珪藻の生殖研究 歴史的背景

珪藻の最大の特徴の一つがそのユニークな生活史だろう。ガラスのシャーレのような被殻中に新しい被殻を形成するため、細胞は分裂を繰り返すと徐々に小さくなる。ある程度小さくなった細胞は生殖能を獲得し、環境条件が整うと配偶子を形成する。配偶子は接合後にただちにシリカ沈着を開始し、増大胞子と呼ばれるようになる。増大胞子は伸長し、その中に生活史を通じて最大サイズとなる栄養細胞を形成し、この細胞が再び栄養分裂を繰り返すステップへと戻る。

珪藻は祖先的な中心類と、そこから派生した羽状類の2つのグループからなる。羽状類はさらに縦溝と呼ばれるスリット状構造の有無により、無縦溝類と縦溝類とに分けられる。中心類と羽状類は被殻形態が大きく異なるほか、生殖様式の違いでも明瞭に区別できる。すなわち中心類は卵と精子からなる卵生殖、羽状類はその多くが同形配偶を行うのである(図1A)。

珪藻の生活史は種によって異なる。多くの種の栄養分裂期は数か月間から数年間続くとされるが(注:後述の *Pseudo-*

nitzschia の研究参照)、有性生殖は数日で完了する短いプロセスである。そのため採集してきた試料に生殖細胞が含まれる確率は低く、これを研究に用いるのは困難である。四半世紀程前までは珪藻生殖に関する知見の大部分は、以下の3人の研究者によって得られたものであった。オーストリア・ウィーン大学の L. Geitler は主に野外試料を用いていたため交配に関する情報はそれほど得られていないものの、多くの羽状類の生殖細胞や増大胞子形成を驚くほど詳細に観察している。一方ドイツ・マールブルグ大学植物研究所の H. A. von Stosch は、観察した種数は少ないが、主に中心類の培養株を用い生殖プロセスの観察や透過型電子顕微鏡を用いた緻密な細胞学的研究を行った。また20世紀後半、当時東西冷戦下のソビエト連邦・クリミア生物学実験所で珪藻研究を行っていた A. M. Roshchin は培養株を用いた生殖の観察に加え、雌雄同株/異株性や栄養細胞の増大や縮小の発見といったオリジナリティの高い成果を出していたが、当時の情勢によりその研究が西側諸国に知られることはなかった。

その後の冷戦終結とソ連崩壊による混乱により、Roshchin 門下生である V. A. Chepurnov は国外への移住を余儀なくされ、英国・エジンバラ王立植物園の D. G. Mann に受け入れの打診をした。その際にいくつかの実験データを同封したが、あまりの新奇性に Mann は最初その信憑性を疑ったほどだったという。培養細胞にもとづく生殖観察のノウハウを携えエジンバラに渡った Chepurnov は Mann とタッグを組み珪藻生殖研究をリードし、多くの種の生殖観察を行った。当時は中心類も羽状類も雌雄同株であるとする Drebes (1977) の説が受け入れられていたが、彼らは交配実験により多くの羽状類が雌雄異株であることを明らかにした。また Mann は交配実験に分子系統解析と被殻の形態計測とを組み合わせ、多数の形態種が複数の隠蔽種から成る種複合群であることを証明している。Mann は現在も生殖や種概念についての研究を精力的に行い、この分野の牽引役として活躍している。

第三の生殖様式の発見 *Pseudostaurosira*

2010年、筆者はドイツ・アルフレッドウェゲナー研究所での博士課程研究を終え、ポスドクとしてエジンバラ王立植物園にて珪藻の生殖研究を開始した。博士課程では特に無縦溝類の系統進化について分子系統や被殻の形態比較といった視点からアプローチしてきたが、更に生殖様式の違いという新たな視点から無縦溝類の進化を考えるためであった。当時すでに生殖に関する情報が系統推定に有効であることが示唆されており、生殖細胞の微細構造観察の分野では文教大学の

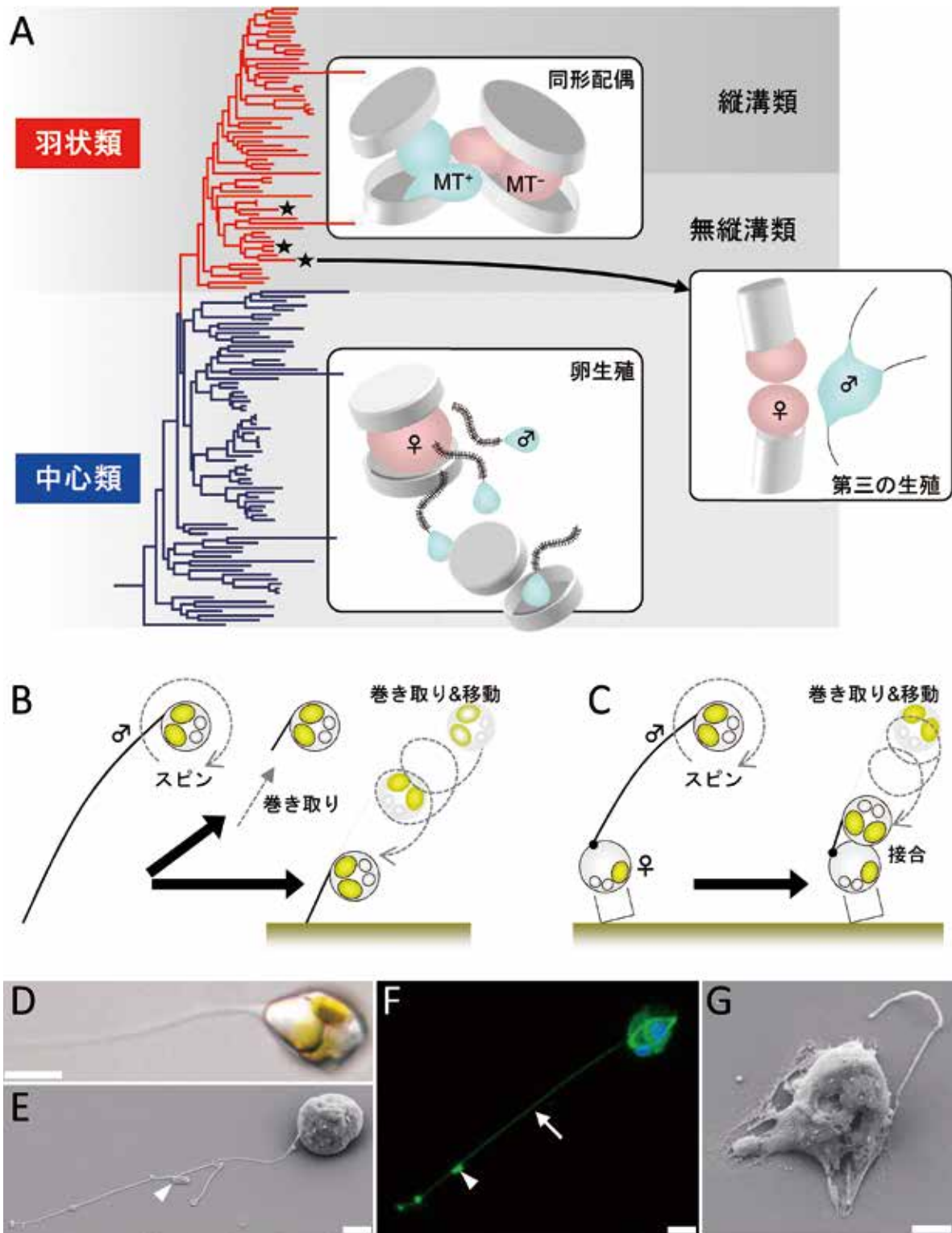


図1. 珪藻の系統と生殖。

A 分子系統樹と生殖様式。珪藻は祖先的な中心類とそこから派生した羽状類の2グループに分かれ、さらに羽状類は縦溝の有無により縦溝類と無縦溝類に分けられる。系統樹上の★は第三の生殖様式が確認されている無縦溝類。同形配偶では雌雄ではなく交配型 MT^+/MT^- と区別する。細胞あたり2つの配偶子が形成され、うち一つずつを他の交配型の細胞の配偶子と交換する。樹形は Theriot *et al.* (2010) の3遺伝子 (18S rDNA, *psbC*, *rbcL*) 結合データセットによる最尤系統樹をもとに作図。 B–G. *Pseudostaurosira trainorii* の雄性配偶子 B 配偶子運動。スピンによるスレッド巻き取りの際、スレッドが基質に付着していると配偶子の移動がおこる。 C 特に粘性の高い部分である小塊が卵に付着し、その状態でスレッドを巻き取ると、雄性配偶子は卵と接近し接合がおこる。 D 光学顕微鏡下では精子に似る。 E 分枝するスレッドの一部に小塊 (矢頭) が形成されている。 F スレッドはチューブリン蛍光抗体 (緑) によりラベルされる。(矢印: スレッド, 矢頭: 小塊)。 G 卵に接近した際に見られるアメーバ運動。 D–G は Sato *et al.* (2011) より一部改変。スケールバー = $3\mu\text{m}$

出井雅彦教授をはじめとする日本勢が活躍していたが、特に無縦溝類の生殖に関する情報はごく限られていた。

中心類の多くは浮遊性であり、その栄養細胞には運動性はないものの、生殖時に大量の精子を環境中に放出することで受精を成功させる。一方羽状類の多くは付着性である。進化的なグループである縦溝類の栄養細胞は基質上を動き回り、対合した細胞が同形の配偶子を形成しこれを交換する。縦溝類が形成する配偶子は1-2個と少なく、その運動能力もごく低い。交配前に雌雄の栄養細胞が隣り合うことで、配偶子のロスを少なくしている。無縦溝類も縦溝類と同様運動性のごく低い2個の配偶子を形成するが、縦溝類と違い栄養細胞は動き回ることができない。つまり無縦溝類の生殖チャンスは、相手の栄養細胞が運よく隣に流れ着いた時に限られる、というのが従来の説だった。

我々は無縦溝類 *Pseudostaurosira trainorii* において、定説を覆す新たな生殖様式を見出した (Sato *et al.* 2011)。この種の生殖では雌雄の親細胞が配偶子を2個ずつ形成する。雌性配偶子(卵)は中心類で見られるものと同様の不動細胞である。雄性配偶子は鞭毛様の構造である「スレッド」をもつが、スレッドは雄性配偶子細胞から複数本形成されることがあり、また細胞に巻き付いたり分枝したりと、その特徴は鞭毛とは大きく異なる (図 1B-G)。雄性配偶子はスレッドをランダムな方向に放出、その後細胞自体がスピンすることによりスレッドを巻き取るという、魚釣りに使うリールに似た運動を繰り返す。スレッドは粘性をもつため配偶子から放出されたスレッドが基質表面に付着することがあり、その際にスピンによる巻き取りがおこると細胞は付着方向に引き寄せられることになる (図 1B)。雄性配偶子はこのスレッド放出/巻き取り運動を繰り返すことで基質表面をランダムに動き回る。また放出されたスレッドは部分的に折りたたまれて小塊を形成することがあるが、この部位は特に粘性が高いため、偶然小塊が卵に付着すると巻き取りにより卵へと近づき接合に至ることがある (図 1C)。このランダム探索により卵に遭遇しなかった場合でも、雄性配偶子は運よく卵に接近すると球形の細胞をアメーバ状に変形させ、アメーバ運動により卵に向かって移動し接合することもある (図 1G)。

中心類の卵生殖が第一の生殖様式、羽状類の同形配偶子が第二の生殖様式とすると、そのどちらも全く異なる本生殖は第三の生殖様式といえるだろう。また本研究では生殖プロセスにおける性フェロモンの関与も実験的に示された。すなわち培養ろ液を用いた有性化誘発実験の結果、雌の栄養細胞が分泌するフェロモン1により雄の有性化が起こり、雄性配偶子から分泌されるフェロモン2により雌の有性化が起こったのである。また雄性配偶子のアメーバ運動は卵が放出するフェロモン3により誘導されることが示唆されている。

第三の生殖様式 - 更なる発見 *Tabularia*, *Ulnaria*

Roshchin 門下生の一人 N. A. Davidovich はウクライナ・カラダグ自然保護区研究所を拠点とし、カナダ・マウントア

リソン大学の I. Kaczmarek と共に珪藻生殖研究に取り組んでいる。筆者が2011年に上述の観察結果を PLoS ONE 誌に発表した直後、彼らのチームは無縦溝類 *Tabularia* 属の2種がスレッドをもつ雄性配偶子を形成することを Protist 誌上で報告し (Davidovich *et al.* 2012, 注: 彼らは pseudopodia-like structure と呼んでいるが混乱を避けるため、本稿ではスレッドで統一する)、更にその後 *Ulnaria* 属の一種からも同様の配偶子を見出している (Podunay *et al.* 2014)。*Tabularia/Ulnaria* で見られた雄性配偶子は、複数本のスレッドをもち、そのスレッドに分枝や小塊の形成がみられる点、また細胞がスピン運動によりスレッド巻き取るといった点で *Pseudostaurosira* のそれと共通しており、これらもまた第三の生殖様式といえるだろう。

彼らは *Tabularia* 雄性配偶子に方向性のあるアメーバ運動が見られないことから、卵の探索・発見はランダム探索のみに基づくと仮定し、その運動パターンの解析を行った (Edgar *et al.* 2014)。ランダム探索に際しその最適探索戦略はターゲットの量と分布に拠るが、本種のように卵の集合体がパッチ状に分布しているようなケースでは理論上は Lévy walk が最適となる。Lévy walk は局地的探索に散発的な長距離移動を伴うランダム探索法で、これによりトナカイからミツバチに至るまで多くの生物の行動様式を説明できることが知られている。しかし各種条件下における *Tabularia* 雄性配偶子のタイムラプス撮影とその数学的解析の結果、その運動はターゲットが豊富でランダムに分布している場合の最適戦略であるブラウン運動であることが判明した。本種は生殖に際し理論上の最適戦略を採用していないことになるが、彼らはこの理由を、スレッド最大長との関係で単純に Lévy walk の長距離移動ステップを実行できないという物理的制約の可能性や、本種では探索戦略ではなく性比を最適化することで受精率を上げる戦略をとっているためではないかと考察している。

その細胞学的類似性から、*Pseudostaurosira*, *Tabularia*, *Ulnaria* でみられるスレッドをもつ雄性配偶子は相同と考えられるものの、分子系統樹上でこれらは単系統とならない。無縦溝類には生殖様式が明らかとなっていない種類がまだまだ多く、また分子系統解析において頑健なトポロジーが得られておらず系統関係に不明な点が多いため、現時点でスレッドの進化について考察するのは困難である。

いずれにせよ、我々と Davidovich らの両グループは互いに異なる生物を用いていたとはいえ、おそらく第三の生殖の発見やその観察はほぼ同時期に進行していたと思われる。珪藻の生殖が初めて羽状類で観察されたのが1847年 (Thwaites 1847)、中心類の卵生殖の報告が1950年 (von Stosch 1950: ちなみに現在では考えられないが、これは Nature 誌に掲載された) であることを考えると、60年以上に渡り珪藻には卵生殖と同形配偶のみと考えられていた中で、期せずして同様の発見が別々に、しかしほぼ同時期に得られたことになる。実際、科学界においてこうした偶発の同時発見の例は多く、ダーウィンとウォレスによる進化論、

ニュートンとライブニッツによる微分法、マイヤーとヘルムホルツによるエネルギー保存の法則と枚挙にいとまがない。今回のスレッドの発見はごくマイナーで、これらの大発見の例を引き合いに出すのは気が引けるが、まさか自分がこうした偶然の当事者となるとは驚きである。

珪藻生殖研究の新たなモデル *Seminavis*

珪藻のモデル生物種といえば *Thalassiosira pseudonana* と *Phaeodactylum tricornutum* の2種がよく知られている。これらは実験生物として扱いが容易で全ゲノム配列が決定されている。しかし両種の生殖に関しては知られておらず、そのためごく最近まで珪藻生殖の分子生物学的研究はほとんど行われていなかった（唯一の例外として Armbrust 1999 による *Thalassiosira weissflogii* の精子特異的遺伝子発現の研究が挙げられる）。

ソ連からエジンバラ王立植物園に移り珪藻生殖研究の発展に大きく貢献した Chepurinov はその後ベルギー・ゲント大学へと移り、そこで培養や生殖誘導の容易な、同型配偶を行う羽状類 *Seminavis robusta* に目をつけ、この種を生殖研究のモデルへと押し上げた。生活史の解明や交配系の作成に加え、各世代の株が大量に冷凍保存されていることから、現在この *Seminavis* 株コレクションは遺伝学的解析に非常に有用なリソースとなっている。

ゲント大のグループはこの *Seminavis* の系を活用し、性決定に関与する遺伝領域を解析した (Vanstechelman *et al.* 2013)。両交配型（本種は形態的に雌雄の区別がない同形配偶のため、交配型 Mating Type, MT⁺/MT⁻と表現される）の交雑により作成した同一の親に由来する 116 株の F1 集団を用い 463 の Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) マーカーによって連鎖解析を行ったところ、MT⁺ で 162 個のマーカーが座乗する 13 連鎖群（全長 963.7 センチモルガン：cM）、MT⁻ で 221 個のマーカーが座乗する 15 連鎖群（全長 972.2 cM）からなる連鎖地図を得た。各交配型に特異的なマーカーを地図上にマッピングし探索したところ、これらが MT⁺ 連鎖群の1か所のみから検出されたことから、本種の交配型は単一遺伝子座にコードされており、MT⁺ がヘテロ型の性決定システムをもつことがわかった。

また彼らは *Seminavis* を用い、ドイツ・イエナ大学の G. Pohnert グループとの共同研究により世界で初めて珪藻性フェロモンの構造決定にも成功している (Gillard *et al.* 2013)。まず彼らは *Seminavis* においても我々の報告した *Pseudostaurosira* と同様、3種のフェロモンにより生殖がコントロールされていることを明らかにした。すなわち *Pseudostaurosira* のフェロモン 1 と 2 に相当するシグナルにより両交配型で相互認識を行い、MT⁻ より放出されるフェロモン 3 に相当する物質により MT⁺ を誘引するのである。栄養細胞株と有性化株のメタボローム解析により化合物プロファイルと比較した結果、分子量 194 で3つの環状構造と二つのアミノ結合をもつジプロリン L-Diproline (図 2) が MT⁺ 株の細胞を誘引する性フェロモンであることをつきとめ

た。これを合成しガラスビーズに吸着させたものを MT⁺ 培養株に与えたところ、細胞がビーズに群がる様子が観察され、その性フェロモンとしての生理活性が証明されている。驚いたことに合成した光学異性体 D-Diproline も同様の活性をもっていたことから、本フェロモン受容体の認識には鍵と鍵穴のような構造的特徴ではなく、磁気カードのように電気的特性を利用したシステムを採用している可能性が考えられた。フェロモン受容体タンパク質の同定や、生合成過程の解明が待たれる。

雑種形成 *Eunotia*, *Pseudo-nitzschia*

次に紹介するのもゲント大学グループによる研究で、フィールドから採集した試料を用いた雑種形成および種分化に関する研究である。Vanormelingen *et al.* (2008) は *Eunotia bilunaris* の培養株を用い交配実験を行った。本種は重複合群であり、被殻の輪郭および ITS rDNA 塩基配列が明瞭に異なる3つのグループからなる。グループ間交配を行ったところ、遺伝的にかなり異なっているものの雑種が形成され、それらには中間型の形態が観察された。雑種はほぼすべて不稔であり、第一減数分裂の前期に分裂停止が起こっていた。

Pseudo-nitzschia pungens の2つの変種 (var. *pungens* と var. *cingulata*) は核コード ITS rDNA および葉緑体コード *rbcL* により明瞭に区別できるほか、被殻形態にもわずかな違いがある。Casteleyn *et al.* (2009) はフィールド試料から多数のクローン培養株を作成しジェノタイピングを行ったところ、変種間で形成されたと考えられる雑種が検出された。多くは F1 世代と考えられたが、F2 世代以降と思われる株も発見されたことから雑種の稔性が示唆された。雑種の形態は中間的ではなく、var. *pungens* に似ていた。

フィールド研究からの新たな展開 *Pseudo-nitzschia*

イタリア・ナポリ動物学研究所では *Pseudo-nitzschia* を対象とした研究を幅広く展開している。*Pseudo-nitzschia* はおそらく珪藻の中でも最も広い生殖可能細胞レンジをもつ種類のうちのひとつである。多くの珪藻は最大サイズの半分～1/3程度まで細胞が小さくなるのを待ち初めて生殖能をもつのに対し、*Pseudo-nitzschia* では2/3程度のサイズに達すると生殖能をもつため培養期間が短く済み、交配が必要な研究に重宝されている。この特性を生かし、葉緑体の遺伝様式 (Levaldi Ghiron *et al.* 2008) や、マイクロサテライトマーカーのメン

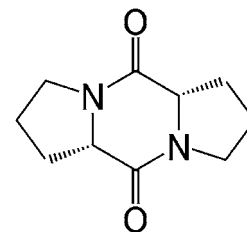


図 2. 初めて構造が決定された珪藻性フェロモンである L-ジプロリン (Gillard *et al.* 2013)。

デル遺伝 (Tesson *et al.* 2013) が明らかになっている。

彼らはナポリ湾を拠点として10年にわたる *Pseudo-nitzschia multistriata* の出現記録と細胞サイズ分布データを詳細に解析することで、晩夏から初秋にかけてのブルームが毎年みられるものの、集団の生殖は2年毎に起こっていることを明らかにした。この観察結果はモデルによっても支持され、またこのモデルにより、生殖が4年間行われなかった場合その集団が絶滅することが予測された (D'Alelio *et al.* 2010)。

未だ謎の多い中心類 *Cyclotella*, *Skeletonema*

最後に中心類について最新の知見を紹介する。中心類珪藻は雌雄同株であり、クローン内で精子と卵の両方が形成される。株の混合により生殖を誘発することも可能ではあるものの、遊泳精子がどちらの株由来か判断できないため、果たして株間の交配が行われているのか、それとも自殖なのかを観察によって議論することは困難であった。Godhe *et al.* (2014) は中心類 *Skeletonema marinoi* の2株を混ぜ合わせ生殖を誘発した。得られたF1世代11株を用いマイクロサテライトマーカー8遺伝子座による親子鑑定を実施したところ、7株はクローン内交配に由来したが、4株はクローン間の交配によって形成されたことが明らかとなった。本研究は *Skeletonema* という海洋生態系における主要なメンバーが自殖だけでなく他殖も行うことを証明した興味深い研究であり、今後の集団遺伝学的解析にも大きな影響を与えるだろう。

中心類では一つの株から精子と卵の両方が形成されるため、性決定機構は羽状類の遺伝的なものとは異なるはずである。東京大学の城川祐香特任研究員と嶋田正和教授 (Shirokawa & Shimada 2013) は独創的なアプローチで中心類の性比調節機構を明らかにした。彼らは中心珪藻 *Cyclotella meneghiniana* の数細胞をマイクロチャンバーに閉じ込め有性化を誘発し、顕微鏡下で1細胞ごとに卵または精子への分化過程を追跡した。一連の生殖プロセスを観察できたことにより、同じ遺伝子をもつクローン細胞集団であっても、細胞サイズ、細胞密度、細胞系譜といった条件により細胞は性比調節を行っていることが明らかになった。

上述の2つの研究で生殖率と親株密度との間に正の相関関係がみられた。これは中心類においても性フェロモンによる生殖コントロール機構が存在することを示している。

今後の展望

次世代シーケンサーによる大規模配列決定が年々安価になり、これにより非モデル生物のトランスクリプトームや全ゲノム配列の取得ですら容易になりつつある。例えば羽状類において雌雄を決定している遺伝的要因や、生殖可能サイズの決定機構等はこうした技術により近いうちに明らかになるだろう。かつて電子顕微鏡の普及と共に被殻観察の一大ムーブメントが起こったように、珪藻研究においても次世代シーケンサーによるオミクス研究のムーブメントが訪れるだろう。ただ、観察によってのみ明らかにできる現象も未だ多く残されており、例えば城

川らが行ったような根気の必要な仕事が今後も必要とされるの言うまでもない。クラシカルな観察に基づく研究と最先端のオミクス研究とのバランスの良い融合により、多くのエキサイティングな発見がなされることを期待したい。

引用文献

- Armbrust, E. V. 1999. Identification of a new gene family expressed during the onset of sexual reproduction in the centric diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3121–3128.
- Casteleyn, G., Adams, N. G., Vanormelingen, P., Debeer, A. E., Sabbe, K. & Vyverman, W. 2009. Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence. *Protist* 160: 343–354.
- D'Alelio, D., Ribera d'Alcalà, M., Dubroca, L., Sarno, D., Zingone, A. & Montresor, M. 2010. The time for sex: a biennial life cycle in a marine planktonic diatom. *Limnol. Oceanogr.* 55: 106–114.
- Davidovich, N. A., Kaczmarzka, I., Karpov, S. A., Davidovich, O. I., MacGillivray, M. L. & Mather, L. 2012. Mechanism of male gamete motility in araphid pennate diatoms from the genus *Tabularia* (Bacillariophyta). *Protist* 163: 480–494.
- Drebes, G. 1977. Sexuality. In: Werner, D. (ed.) *The Biology of diatoms*. pp. 250–283. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Edgar, R., Drolet, D., Ehrman, J. M. & Kaczmarzka, I. 2014. Motile male gametes of the araphid diatom *Tabularia fasciculata* search randomly for mates. *PLoS ONE* 9: e101767.
- Gillard, J., Frenkel, J., Devos, V., Sabbe, K., Paul, C., Rempt, M., Inzé, D., Pohnert, G., Vuylsteke, M. & Vyverman, W. 2013. Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52: 854–857.
- Godhe, A., Kremp, A. & Montresor, M. 2014. Genetic and microscopic evidence for sexual reproduction in the centric diatom *Skeletonema marinoi*. *Protist* 165: 401–416.
- Levaldi Ghiron, J. H., Amato, A., Montresor, M. & Kooistra, W. H. 2008. Plastid inheritance in the planktonic raphid pennate diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Protist* 159: 91–98.
- Podunay, Y. A., Davidovich, O. I. & Davidovich, N. A. 2014. Mating system and two types of gametogenesis in the fresh water diatom *Ulnaria ulna* (Bacillariophyta). *Algologia* 24: 3–19.
- Sato, S., Beakes, G., Idei, M., Nagumo, T. & Mann, D. G. 2011. Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms. *PLoS ONE* 6: e26923.
- Shirokawa, Y. & Shimada, M. 2013. Sex allocation pattern of the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Proc. Biol. Sci.* 280: 20130503.
- von Stosch, H. A. 1950. Oogamy in a centric diatom. *Nature* 165: 531–532.
- Tesson, S. V., Legrand, C., van Oosterhout, C., Montresor, M., Kooistra, W. H. & Procaccini, G. 2013. Mendelian inheritance pattern and high mutation rates of microsatellite alleles in the diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Protist* 164: 89–100.
- Theriot, E. C., Ashworth, M., Ruck, E., Nakov, T. & Jansen, R. K. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecol. Evol.* 143: 278–296.
- Thwaites, G. H. K. 1847. On conjugation in the Diatomaceae. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 20: 9–11.
- Vanormelingen, P., Chepurinov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K. & Vyverman, W. 2008. Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta). *Protist* 159: 73–90.
- Vanstechelma, I., Sabbe, K., Vyverman, W., Vanormelingen, P. & Vuylsteke, M. 2013. Linkage mapping identifies the sex determining region as a single locus in the pennate diatom *Seminavis robusta*. *PLoS ONE* 8: e60132.