

## ИЗМЕНЕНИЕ КРЕМНЕЗЕМНЫХ СТВОРОК ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *SYNEDRA ACUS* subsp. *RADIANS* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПАКЛИТАКСЕЛА

© Е. Д. Бедошвили,<sup>1</sup> К. В. Гнеушева, Е. В. Лихошвай

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033;

<sup>1</sup>электронный адрес: [bedoshvilied@list.ru](mailto:bedoshvilied@list.ru)

Диатомеи — одноклеточные микроскопические эукариоты, способные формировать из биогенного кремнезема микро- и наноструктурированные видоспецифические панцири. Морфогенез элементов панцирей происходит внутри клеток в специализированных органеллах (silica deposition vesicle, SDV) под контролем цитоскелета. Механизмы контроля процесса морфогенеза во многом неясны. В данной работе исследовано влияние ингибитора микротрубочек паклитаксела на морфогенез створок у пеннатной бесшовной диатомеи *Synedra acus* subsp. *radians*. Показано, что нарушение работы микротрубочек на ранних стадиях морфогенеза вызывает смещение оси симметрии в формирующихся створках, что в свою очередь может приводить к искривлению створки. На последующих стадиях формирования створки происходит нарушение тонких кремнеземных структур микронного и субмикронного размеров — ареол и велумов. Предполагается, что необходимым условием успешного синтеза створок у диатомеи является баланс между стабильными и динамическими микротрубочками.

Ключевые слова: диатомеи, морфогенез, паклитаксел, биокремнезем, микротрубочки.

Принятые сокращения: ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия, SDV — везикула отложения кремнезема (silica deposition vesicle).

Диатомовые водоросли — одноклеточные автотрофные микроорганизмы — создают свой экзоскелет (панцирь) из кремнезема и отличаются особым морфологическим многообразием (Round et al., 1990). Панцирь состоит из двух перекрывающихся створок: эпитеки и гипотеки и нескольких кольцеобразных (обычно разомкнутых) структур, поясковых ободков (Pickett-Heaps et al., 1990). Все элементы кремнеземного панциря формируются внутри клетки. Строение створок диатомеи видоспецифично, и на основе симметрии диатомеи делятся на центрических с радиальной симметрией, центрических с биполярной симметрией и пеннатных с билатеральной симметрией. Последние по наличию или отсутствию шва делятся на шовных и бесшовных (Round et al., 1990).

Диатомеи привлекают внимание в качестве модельного объекта, понимание механизмов контроля над морфогенезом которого может открыть горизонты получения микро- и наноматериалов заданной структуры (Gordon et al., 2009). Еще в 1964 г. было показано, что отложение кремнезема у диатомеи начинается во время или сразу после цитокинеза и происходит в специализированной органелле — везикуле отложения кремнезема (SDV, silica deposition vesicle), окруженной специфической мембраной — силикалеммой (Drum, Pankratz, 1964; Reimann, 1964). Однако то, каким образом происходит контроль видоспецифического морфогенеза на молекулярном и клеточном уровнях, неизвестно. Считается, что в этом процессе участвует цитоскелет. Так, на примере некоторых видов было показано, что ингибирование микротру-

бочек колхицином не останавливает морфогенез кремнеземной створки, а приводит к его различным нарушениям (Blank, Sullivan, 1983a, 1983b; Cohn et al., 1989). Было предположено, что микротрубочки определяют место начала морфогенеза, положение формирующейся створки относительно материнской зрелой, контролируют развитие крупных структур на панцире (Pickett-Heaps, 1998; Tesson, Hildebrand, 2010a). Было показано, что обработка живых клеток центрических диатомеи ингибиторами полимеризации микротрубочек вызывает искривления крупных (микронных) структур на панцире и меняет расположение краевых выростов, фультопортул (Van de Meene, Pickett-Heaps, 2002; Tesson, Hildebrand, 2010b). Участие микротрубочек в формировании различных выростов на створке не вызывает сомнений. Благодаря конфокальной микроскопии со специфическими к тубулину красителями установлено наличие микротрубочек рядом с формирующимися римопортулами у *Coscinodiscus granii* (Tesson, Hildebrand, 2010a) и фультопортулами у *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin & Guillard (Tesson, Hildebrand, 2010b). Наиболее полно показана роль цитоскелета в формировании хоботков у *Proboscia alata* (Brightwell) Sundstrom (Van de Meene, Pickett-Heaps, 2002), в частности установлена локализация микротрубочек в процессе морфогенеза хоботков в виде поддерживающего «рукава»; разрушение микротрубочек под действием оризалина приводит к искривлению хоботков. Все перечисленные структуры имеют разные форму, размер и функции.

В недавнем исследовании, проведенном в нашей лаборатории, на синхронизированной культуре пеннатной бесшовной диатомеи *Synedra acus* subsp. *radians* (Kützing) Skabitshevskii было показано, что добавление колхицина — ингибитора полимеризации микротрубочек — в определенный момент морфогенеза дает возможность получения новых кремнеземных форм с определенной структурой (Kharitonenko et al., 2015). Целью настоящей работы было исследование возможности влияния на морфогенез створок этого же вида «антагонистом» колхицина, ингибитором деполимеризации микротрубочек — паклитаксолом, который, связываясь с  $\beta$ -тубулином, блокирует деполимеризацию микротрубочек и вызывает образование пучков микротрубочек (Dumontet, Jordan, 2010). Ранее паклитаксел, как и другие ингибиторы деполимеризации микротрубочек, не использовались в исследованиях морфогенеза створок диатомей.

### Материал и методика

Культуры клеток и синхронизация. Культуры клеток *S. acus* subsp. *radians* выделяли из природной популяции зал. Лиственничный оз. Байкал и выращивали на среде DM (Thompson et al., 1988) при 7—8 °С и естественном освещении.

Для синхронизации клетки *S. acus* subsp. *radians* концентрировали путем центрифугирования (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Германия) при 1000 *g* в течение 10 мин при 10 °С. Переносили в среду DM, не содержащую кремния, и культивировали при 10 °С в отсутствие света в пластиковых флаконах для культивирования объемом 200 мл (TPP, Швейцария). Через 3 сут после начала синхронизации добавляли силикат натрия ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) до конечной концентрации 57 мкг/мл, для того чтобы клетки снова начали делиться.

Световая и флуоресцентная микроскопия. Для прижизненной окраски формирующихся створок к живой несинхронизированной культуре добавляли LysoTracker Yellow NCK-123; концентрация красителя в среде — 0,3 мкМ. Клетки исследовали на микроскопе проходящего света Axiovert 200 (Zeiss, Германия) с синим фильтром для света с длиной волны 546 нм. Фотографии были получены с помощью видеокамеры Pixera Penguin 600CL и пакета программ ВидеоТест 5.0.

Определение субтоксичной концентрации паклитаксела для *S. acus* subsp. *radians*. Для определения субтоксичной концентрации паклитаксела клетки из несинхронизированной культуры инкубировали в присутствии 1, 2, 3 и 5 нМ паклитаксела в среде. Для получения кривых роста культуры в контроле и при различных концентрациях паклитаксела культуру выращивали на 96-луночном планшете (CELLSTAR® 96W Microplate). Подсчет численности всех клеток в каждой ячейке проводили с помощью микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия) в течение 4 сут. Эксперимент повторяли трижды. Данные каждой кривой выражены в процентах от первоначальной численности клеток в лунке, которая принималась за 100 %. Планки погрешностей на графиках показывают стандартное отклонение.

Обработка паклитаксолом синхронизированной культуры. В синхронизированную, как описано выше, культуру диатомеи *S. acus* subsp. *radians* во флаконах объемом 200 мл (TPP, Швейцария) добавляли паклитаксел до конечной концентрации 3 нМ через

0,5, 1,5, 2,5, 3,5 и 4,5 ч после добавления кремния в среду DM или одновременно с ним. Через 0,5 ч экспозиции с паклитаксолом клетки отмывали средой DM с последующим центрифугированием, как указано выше, переносили в свежую среду DM, также содержащую кремний, инкубировали 1 сут, концентрировали центрифугированием и фиксировали 70%-ным этанолом для ПЭМ. Эксперимент повторяли трижды. Для контроля была использована синхронизированная культура, зафиксированная через 1 сут после добавления кремния в среду.

Очистка створок для электронной микроскопии. Клетки диатомей трижды инкубировали в 6 % SDS по 0,5 ч на водяной бане (100 °С), отмывали 5-кратно дистиллированной водой с осаждением клеток центрифугированием. Осадок в пробирках заливали концентрированной азотной кислотой и инкубировали 1 ч на водяной бане. Кислоту удаляли, осадок трижды отмывали этанолом с осаждением центрифугированием, после этого инкубировали в концентрированной соляной кислоте 1 сут, затем створки отмывали водой не менее 5 раз.

Химическая фиксация и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Клетки фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом на фосфатном буфере Соренсена (pH 7.4) в течение 2 ч, трижды отмывали буфером и постфиксировали 1%-ным раствором оксида осмия на том же буфере 2 ч при комнатной температуре. Дегидратацию материала проводили в растворах этанола возрастающей концентрации: 10, 30, 50, 70, 80, 96 и 100 % по 10 мин в каждом; дважды выдерживали в абсолютном ацетоне (обезвоженном сульфатом меди) по 30 мин. Предварительную пропитку материала проводили в смеси абсолютного ацетона и эпоксидной смолы (Araldite 502 Kit; SPI). После пропитки материал переносили в полипропиленовые капсулы Veem™ в свежую смесь смолы с катализатором (DMP-30; SPI), полимеризовали с открытыми крышками при 60 °С в течение 48 ч. Срезы, полученные на микротоме Ultracut R LEICA (Австрия) алмазным ножом Diatom Diamond Knife, монтировали на медные сетки. Препарат контрастировали цитратом свинца и отмывали в дистиллированной воде.

Суспензии очищенных створок *S. acus* subsp. *radians* (30 мкл) наносили на медные сетки с формваровой пленкой-подложкой. Морфологический анализ створок *S. acus* subsp. *radians* проводили среди 200 встреченных створок. Полученные усредненные данные представлены в виде гистограмм с планками погрешностей, показывающими стандартное отклонение.

Исследование всех препаратов проводили на электронном микроскопе Leo 906 E (Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микрофотографии получены с помощью камеры Mega View II Zeiss.

Использованные реактивы: паклитаксел, глутаровый альдегид и оксид осмия (Sigma-Aldrich, Швейцария); SDS (Unger Fabrikker AS, Норвегия); азотная кислота (ООО Реактив, Россия); соляная кислота (ОАО Каустик, Россия); LysoTracker Yellow NCK-123 (Eugene, США); Araldite 502 Kit (SPI, США).

### Результаты

При исследовании ультратонких срезов клеток *S. acus* subsp. *radians* нами были выделены начальные стадии морфогенеза створки: 1) начальная стадия, когда размер формирующейся створки очень мал (рис. 1, а, б);

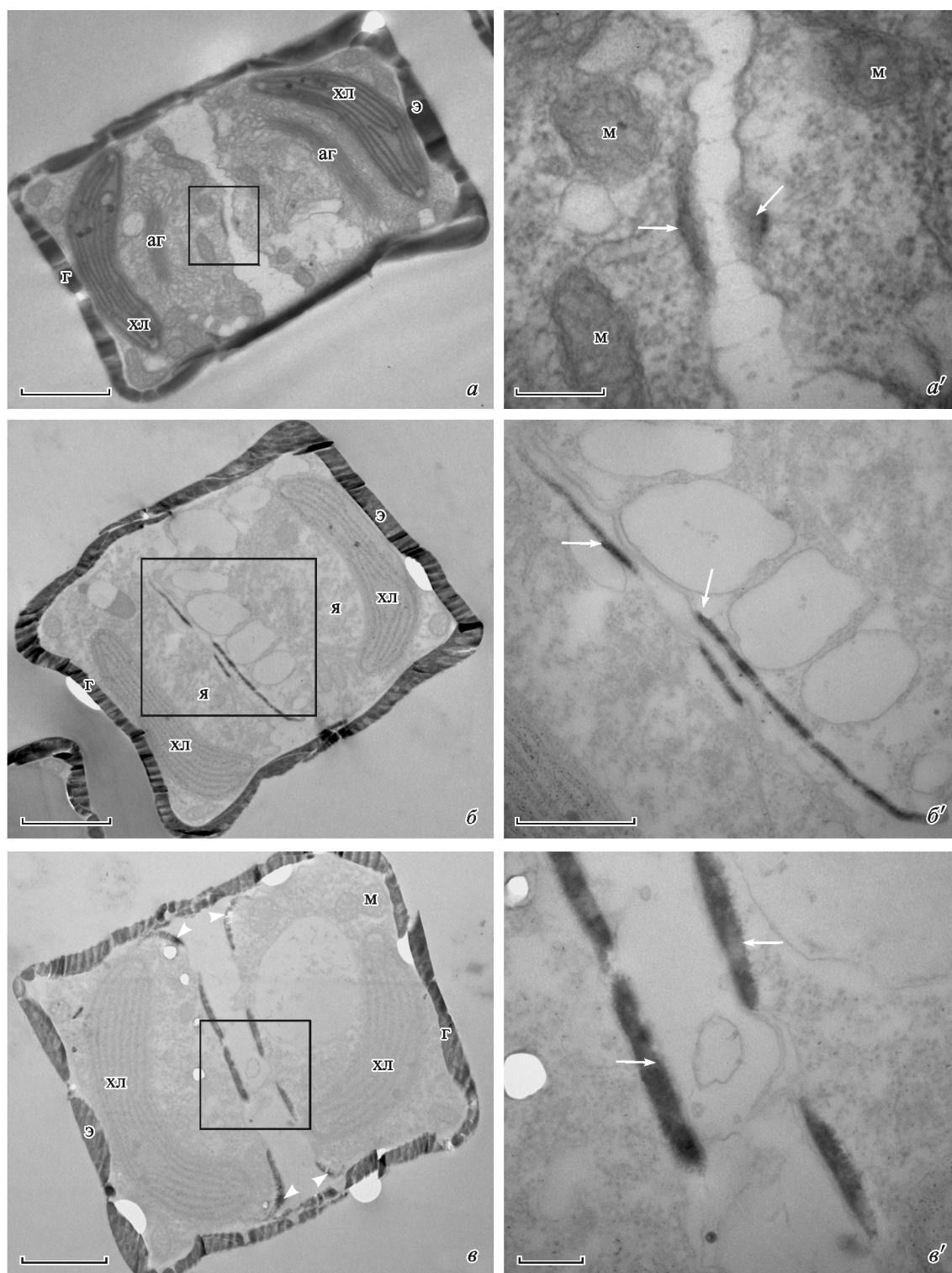


Рис. 1. Последовательные стадии морфогенеза створки *Synedra acus subsp. radians*.

*a* — формирование SDV и начало отложения кремнезема, *б* — стадия роста SDV, *в* — стадия формирования загиба створки (показан головками стрелок); *а'*–*в'* — увеличенные фрагменты соответствующих изображений (выделены рамкой). ПЭМ поперечных срезов. аг — аппарат Гольджи, г — гипотека, м — митохондрия, хл — хлоропласт, э — эпитека, я — ядро; стрелки — формирующиеся створки внутри SDV. Масштабные отрезки: *a*–*в* — 1 мкм; *а'*, *б'* — 200 нм; *б''* — 500 нм.

2) рост SDV, когда ширина родительской створки примерно равна ширине SDV (рис. 1, *в*, *г*); 3) образование загиба створки (рис. 1, *д*, *е*). На стадии образования загиба створки можно различить тонкую зону рыхлого кремнезема, обращенную к цитоплазме (рис. 1, *е*).

Эксперименты с выращиванием несинхронизированной культуры клеток *S. acus subsp. radians* с паклитакселом в среде показали, что из выбранных концентраций паклитаксела уже 5 нМ оказывает цитотоксичный эффект и полностью блокирует деление клеток. При меньших



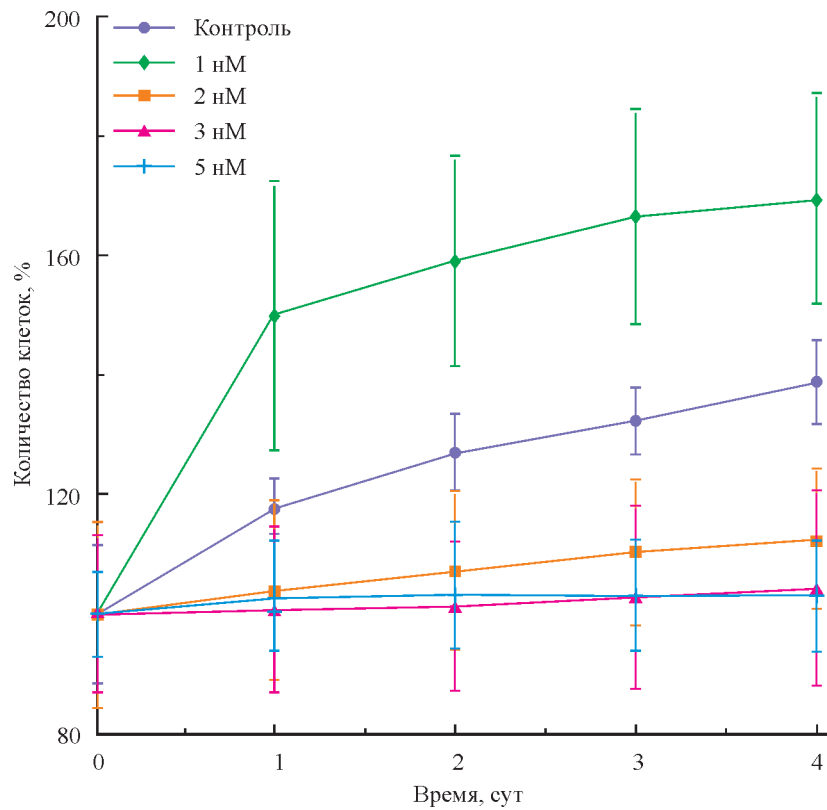


Рис. 2. Эффект разных концентраций паклитаксела на рост культуры *Synedra acus* subsp. *radians*. За 100 % было принято количество клеток в ячейке в день посева (нулевой день).

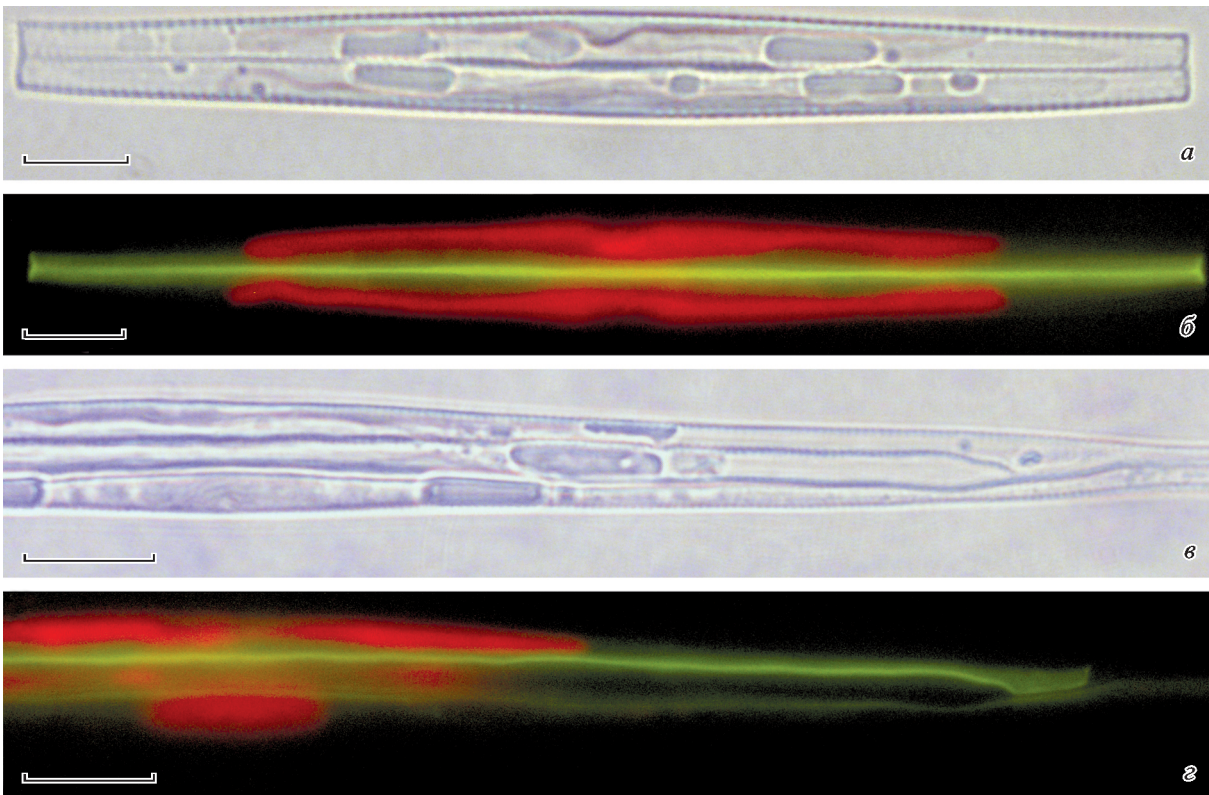


Рис. 3. Живые клетки из несинхронизированной культуры *Synedra acus* subsp. *radians*. а, в — световая микроскопия; б, г — флуоресцентная микроскопия, окрашивание формирующихся створок прижизненным флуоресцентным красителем Lysotracker Yellow (зеленая флуоресценция), красная флуоресценция — автофлуоресценция хлоропластов. а, б — контрольная клетка; в, г — клетка, делящаяся в присутствии паклитаксела в среде. Масштабные отрезки — 10 мкм.



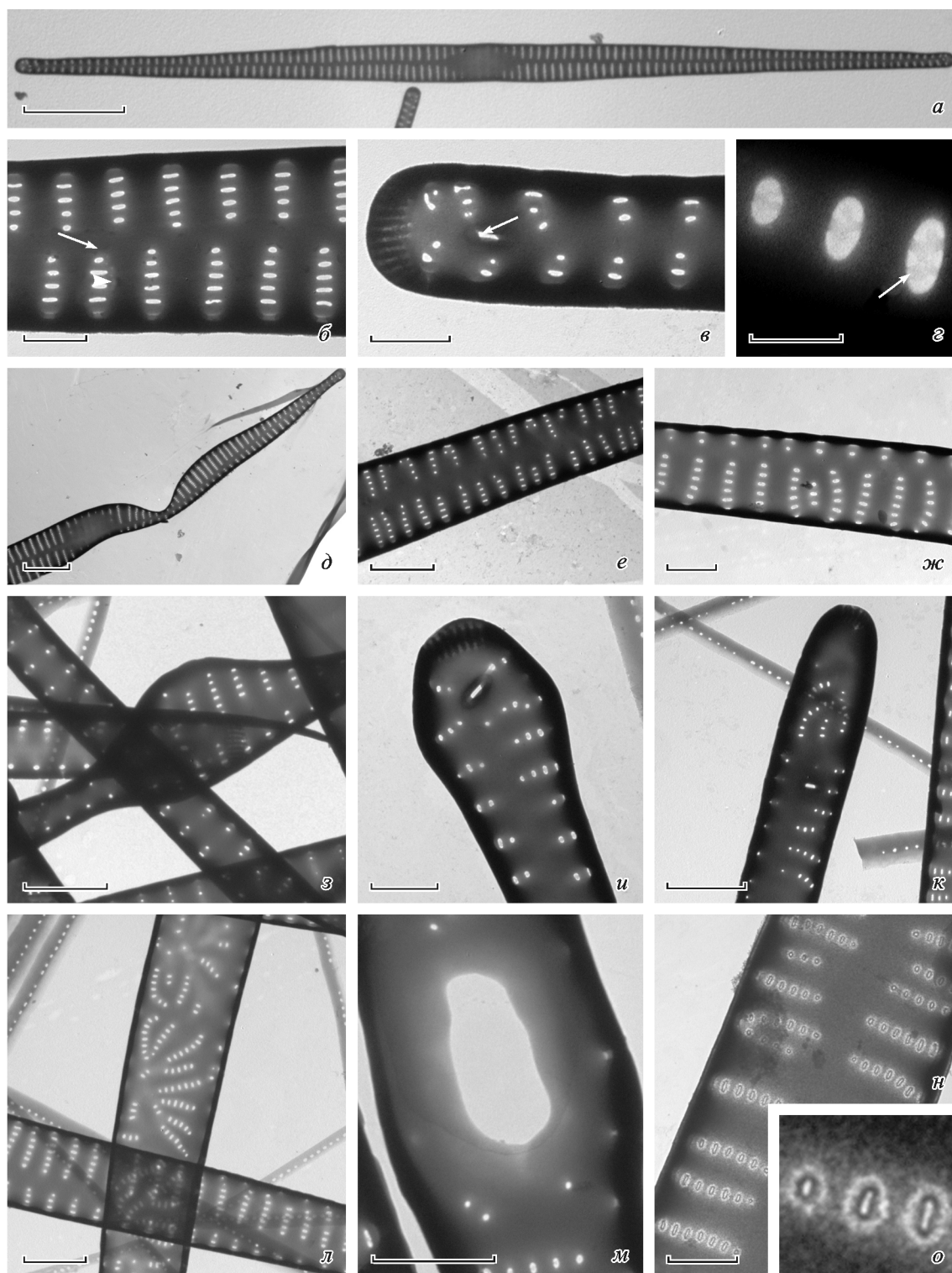


Рис. 4. Нормальная морфология створок *Synedra acus* subsp. *radians* (а–з) и ее изменения при культивировании клеток в присутствии паклитаксела (д–о). ПЭМ.

а — зрелая створка; б — увеличенный фрагмент рис. 3, а, стрелкой показано осевое поле, головкой стрелки — вирги; в — увеличенный фрагмент рис. 3, а, апекс створки, двугубый вырост показан стрелкой; г — ареолы с велумами (стрелка) на зрелой створке; д — искривление створки; е — утолщение осевого поля и вирги; ж — смещение осевого поля; з — расширение створки; и — изменение формы апекса; к — смещение двугубого выроста; л — неупорядоченные ряды ареол; м — крупное отверстие в створке; н — нарушение формирования ареол; о — увеличенный фрагмент изображения рис. 4, и. Масштабные отрезки: а — 10 мкм; б, в, ж, и, м, н — 1 мкм; г — 200 нм; д — 5 мкм; е, з, к, л — 2 мкм.

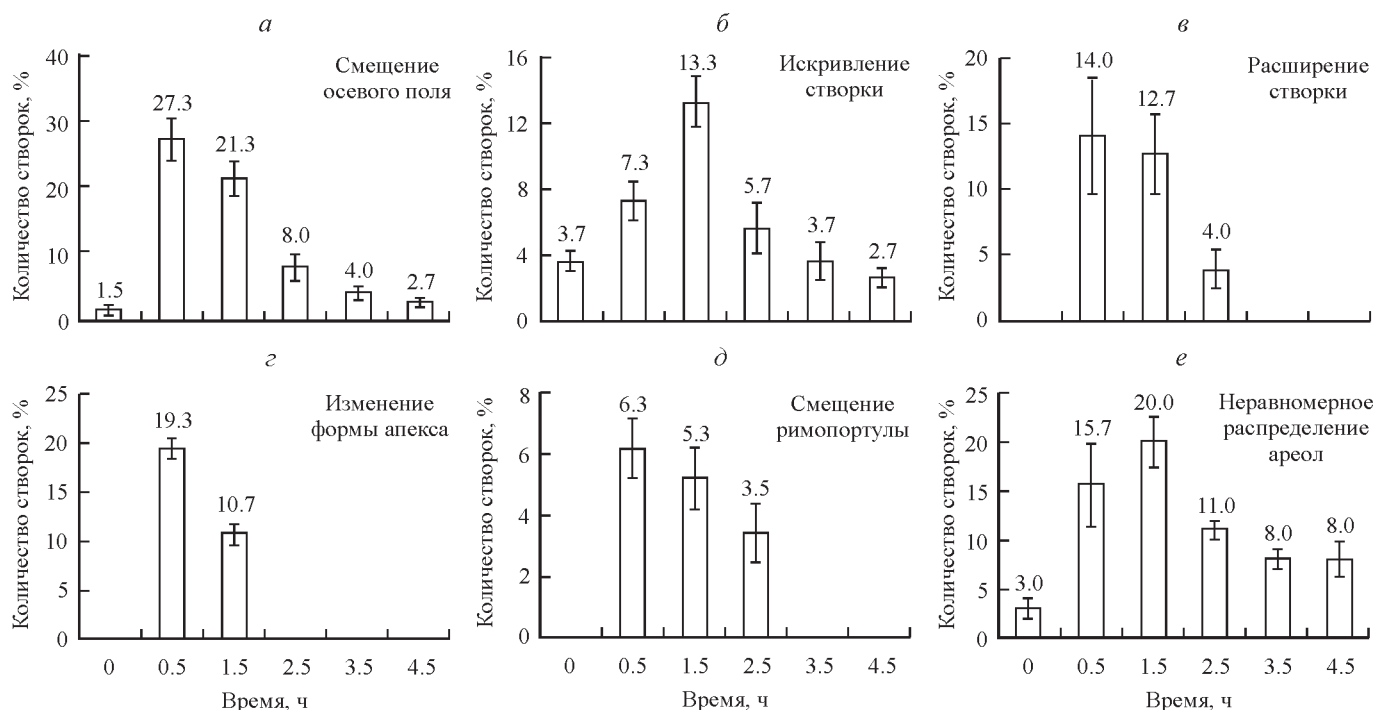


Рис. 5. «Точечное» влияние паклитаксела в определенное время клеточного цикла на формирование различных типов аномалий створок (а—е).

концентрациях паклитаксела наблюдается угнетение роста культуры, но клетки сохраняют способность к делению; в дальнейших экспериментах в качестве субтоксичной использовали концентрацию 3 нМ (рис. 2).

Световая и флуоресцентная микроскопия живых клеток в несинхронизированной культуре с использованием красителя LysoTracker Yellow, включающегося в формирующуюся створку, показали, что при использовании паклитаксела в сравнении с контролем на 20 % возрастает количество пучков, т. е. неразошедшихся клеток (рис. 3), в которых, во всей видимости, нарушен нормальный процесс деления.

С помощью ПЭМ очищенных створок, морфогенез которых происходил под воздействием паклитаксела, были выделены основные типы аномалий их строения: дефекты формы створки (рис. 4, д), утолщение (рис. 4, е) и смещение (рис. 4, ж) осевого поля, неравномерные расширения некоторых частей створки (рис. 4, з), нарушения формы апекса (рис. 4, и), смещение двугубого выроста (рис. 4, к) и изменения расположения рядов ареол (рис. 4, л). Единично встречались крупные отверстия на створках и аномалии в формировании ареол «кольцо-в-кольце» (рис. 4, м—о). В контрольных образцах были обнаружены только искривленные створки и створки с нарушенной регулярностью рядов ареол.

Эксперименты с «точечным» воздействием паклитаксела во время прохождения определенных стадий морфогенеза (Kharitonenko et al., 2015) проводили в течение 4.5 ч (рис. 5). Оказалось, что добавление паклитаксела сразу вместе с кремнием в начале роста культуры не приводит к большому количеству аномальных створок (не более 4 %); добавление паклитаксела через 0.5 ч роста синхронизированной культуры вызывает смещение осевого поля (рис. 4, ж; 5, а) у 27.5 % створок. На это же время приходится максимальное количество створок с нарушением формы (рис. 4, д; 5, б), неравномерными расшире-

ниями некоторых частей створки (рис. 4, з; 5, в) и изменением формы апекса (рис. 4, и; 5, г), а также наибольшее количество створок со смещением двугубых выростов (рис. 4, к; 5, д). Добавление паклитаксела через 1.5 ч роста синхронизированной культуры вызывает нарушение параллельности рядов ареол у 20 % створок (рис. 4, л; 5, е).

## Обсуждение

Известно, что симметрия створок диатомовых водорослей определяется на самых ранних стадиях морфогенеза (Mann, 1984), и у пеннатных диатомей этот процесс начинается с образования осевого тяжа — стернума (для *S. acus* subsp. *radians* — см.: Kaluzhnaia, Likhoshway, 2007). При исследовании синхронизированной культуры было показано, что закладка стернума и начало формирования вирги (ответвлений от стернума первого порядка) (Kharitonenko et al., 2015) происходят в пределах 0.5 ч после окончания синхронизации и добавления кремния (рис. 6). Затем в течение следующего часа происходят рост вирги и образование загиба створки. Через 2.5 ч после окончания синхронизации морфогенеза начинается формирование вимин (ответвлений второго порядка), а через 3.5 ч — оформление ареол. Таким образом, через 3.5 ч после начала морфогенеза готов общий план створки, после этого усиливается ее вертикальный рост, т. е. утолщение, и формируются тонкие элементы — велумы на ареолах.

Чаще всего исследования морфогенеза створок диатомовых водорослей проводятся на очищенных от органики препаратах кремнистых панцирей (см., например: Sato et al., 2011; Cox, 2012). В этих случаях исследователи имеют дело со «скелетами» створок, не только извлеченными из клеток, но и лишенными всех присущих им органических оболочек (Von Stosch, 1981). В таком виде они

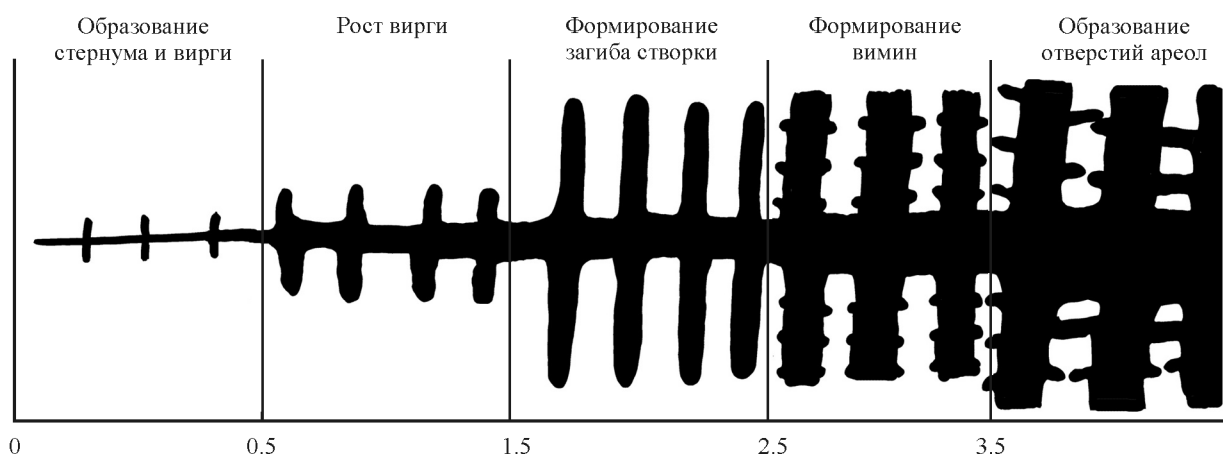


Рис. 6. Схема начала морфогенеза створки *Synedra acus subsp. radians* с указанием основных стадий и их продолжительности (ч).

доступны для просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии. Однако детально исследовать процесс морфогенеза створки на субклеточном уровне, визуализировать формирующиеся створки на самых начальных стадиях из развития (рис. 1) и определять их клеточное окружение в этот момент позволяет только просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов. Поскольку на срезах сложно идентифицировать отдельные структуры панциря на разных стадиях их развития, стадии морфогенеза створки *S. acus subsp. radians*, выявляемые при анализе срезов, не всегда возможно точно соотносить с данными литературы (Kaluzhnaya, Likhoshway, 2007). Вероятно, самую раннюю стадию морфогенеза из обнаруженных на срезах у *S. acus subsp. radians* (рис. 1, а, б) можно считать равнозначной стадии образования осевого поля, а рост SDV (рис. 1, в, г) — образованию поперечных отростков створки вирги (Kaluzhnaya, Likhoshway, 2007).

Ингибиторы как полимеризации (колхицин; Kharitonenko et al., 2015), так и деполимеризации микротрубочек (паклитаксел) (рис. 4, 5) в 1-й ч морфогенеза створки *S. acus subsp. radians* меняют положение стернума, что вызывает впоследствии смещение осевого поля и искривление створки. Интересно, что как колхицин, так и паклитаксел имеют сходные эффекты — максимальная доля створок со смещением осевого поля наблюдается при добавлении ингибитора через 0.5 ч после окончания

синхронизации (см. таблицу). Следствием смещения осевого поля может быть и изменение локализации римопортулы, при воздействии как колхицином, так и паклитакселом. Вероятно, контроль положения створки на начальных стадиях морфогенеза происходит не только за счет ее удержания на месте стабильными микротрубочками, динамика микротрубочек также играет существенную роль.

При влиянии паклитаксела на морфогенез створки наблюдается и другое существенное нарушение симметрии — заметно увеличивается доля створок с нерегулярными рядами ареол (рис. 4, л), т. е. происходит перестройка ветвящихся элементов створки первого порядка (рис. 6). Следует отметить, что максимум таких аномалий приходится на 1.5 ч (20%), однако и через 2.5 ч остается заметным — 11%. Согласно ранее полученным данным, в это время у большинства формирующихся створок уже есть вирги и начинается рост загиба створки; такой же эффект на строение створок оказывает и колхицин (см. таблицу). Это явление может объясняться состоянием кремнезема внутри SDV. По мнению некоторых авторов (Grachev et al., 2008), кремнезем внутри SDV в начале морфогенеза достаточно мягкий и пластичный, что косвенно подтверждается данными просвечивающей электронной микроскопии срезов (рис. 1). Даже на стадии образования загиба створки видно, что кремнезем формирующейся створки довольно «рыхлый» (рис. 1, е).

#### Аномалии строения створок *Synedra acus subsp. radians* при воздействии колхицина и паклитаксела

Нарушения морфологии створок	Паклитаксел (настоящее исследование)		Колхицин (по Kharitonenko et al., 2015)	
	срок воздействия, при котором частота данной аномалии максимальна, ч	доля аномальных створок, %	срок воздействия, при котором частота данной аномалии максимальна, ч	доля аномальных створок, %
Искривление формы створки	1.5	13.5	0.5	20.3
Смещение осевого поля	0.5	27.0	0.5	27.3
Нарушение формы апекса	0.5	19.3	0.5—1.5	4.0
Смещение двугубого выроста	0.5	6.3	0.5	5.0
Нарушение расположения ареол	1.5	20.0	1.5	28.0
Заращение ареол <sup>а</sup>	—	—	2.5	17.3
Расширение створки <sup>а</sup>	0.5	14.0	—	—

Примечание. Знак «—» — нет таких аномалий, <sup>а</sup> — аномалии, специфичные для одного из ингибиторов.



Без поддержки микротрубочек даже на стадии роста вирги смещение оси симметрии в отдельных местах формирующейся створки приводит к нерегулярности рядов ареол. Применение паклитаксела и наличие стабильных микротрубочек там, где их не должно быть, приводят к похожим последствиям, что говорит о необходимости поддержки микротрубочками в морфогенезе створки, а также о балансе между их динамикой и стабильностью.

Расширение створки — одна из отличительных аномалий, которые вызывает паклитаксел (рис. 4, з). В течение морфогенеза вплоть до того момента, пока не начнется вертикальный рост створки, ее форма нуждается в постоянной поддержке микротрубочками, а нарушение баланса между их динамикой и стабильностью — в данном случае в сторону большей стабильности — приводит к подобным аномалиям в строении. К похожим явлениям можно отнести и изменение формы апекса — в отличие от колхицина, от действия которого апекс приобретал усеченную форму (Kharitonenko et al., 2015), паклитаксел вызывает расширение этой части створки (рис. 4, и), что также объясняется поддержкой апекса микротрубочками во время его роста.

Ранее было показано, что добавление в среду колхицина приводило к заращиванию ареол на створках *S. acus* subsp. *radians*. Аномалии в строении ареол — «кольцо-в-кольце», по-видимому, являются следствием неправильного расположения микротрубочек, а точнее — микротрубочки остаются на месте, возможно в отверстии ареолы, и отложение кремнезема происходит вокруг них. Наличие и правильное расположение микротрубочек — важное условие для формирования ареол на поверхности створки. Единичные случаи образования крупных отверстий на створке могут быть результатом нарушения динамики микротрубочек, расположенных рядом на большой площади.

Таким образом, показана существенная роль микротрубочек в формировании первичной симметрии створки на начальных стадиях морфогенеза, а также в образовании ареол и велумов. Вероятно, в морфогенезе створок у диатомей участвует два вида микротрубочек — стабильных и динамических (Infante et al., 2000; Akhmanova, Steinmetz, 2008). Баланс между стабильностью и динамикой микротрубочек играет заметную роль в контроле морфогенеза створки. На наш взгляд, диатомеи — перспективные модельные организмы для изучения роли модификаций микротрубочек и их роли в морфогенезе клеточных структур.

Работа выполнена в рамках темы ФАНО России 0345-2014-0001 «Исследование генетических, молекулярных, эволюционных и экологических аспектов представителей царства Chromista как основных продуцентов биогенного кремнезема и участников круговорота биогенных элементов водных экосистем» (№ гос. регистрации 01201353441).

#### Список литературы

- Akhmanova A., Steinmetz M.O. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9 : 309—322.
- Blank G., Sullivan C. 1983a. Diatom mineralization of silicon acid. VI. The effects of microtubule inhibitors on silicic acid metabolism in *Navicula saprophila*. *J. Phycol.* 19 : 39—44.
- Blank G., Sullivan C. 1983b. Diatom mineralization of silicon acid. VII. Influence of microtubule drugs on symmetry and pattern formation in valves of *Navicula saprophila* during morphogenesis. *J. Phycol.* 19 : 294—301.
- Cohn S., Nash J., Pickett-Heaps J. 1989. The effects of drugs on diatom valve morphogenesis. *Protoplasma.* 149 : 130—143.
- Cox E.J. 2012. Ontogeny, homology, and terminology — wall morphogenesis as an aid to character recognition and character state definition for pennate diatom systematics. *J. Phycol.* 48 : 1—31.
- Drum R.W., Pankratz S. 1964. Pyrenoids, raphes, and other fine structure in diatoms. *Amer. J. Bot.* 51 : 401—418.
- Dumontet C., Jordan M.A. 2010. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 : 790—803.
- Gordon R., Losic D., Tiffany M.A., Nagy S.S., Sterrenburg F.A.S. 2009. The glass menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends Biotech.* 27 : 116—127.
- Grachev M.A., Annenkov V.V., Likhoshway Ye. V. 2008. Silicon nanotechnologies of pigmented heterokonts. *BioEssays.* 30 : 328—337.
- Infante A.S., Stein M.S., Zhai Y., Borisy G.G., Gundersen G.G. 2000. Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap. *J. Cell Sci.* 113 : 3907—3919.
- Kaluzhnaya O., Likhoshway Ye. 2007. Valve morphogenesis in an araphid diatom *Synedra acus* subsp. *radians*. *Diatom Res.* 22 : 81—87.
- Kharitonenko K.V., Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye. V. 2015. Changes in the micro- and nanostructure of siliceous valves in the diatom *Synedra acus* under the effect of colchicine treatment at different stages of the cell cycle. *J. Struct. Res.* 190 : 73—80.
- Mann D.G. 1984. An ontogenetic approach to diatom systematics. In: *Proc. of the Internat. Diatom Symp.* Koenigstein, Germany: O. Koeltz. 113—144.
- Pickett-Heaps J.D. 1998. Cell division and morphogenesis of the centric diatom *Chaetoceros decipiens* (Bacillariophyceae). II. Electron microscopy and a new paradigm for tip growth. *J. Phycol.* 34 : 995—1004.
- Pickett-Heaps J.D., Schmid A.-M. M., Edgar L.A. 1990. The cell biology of diatom valve formation. *Progress in Phycological Research.* 7 : 1—168.
- Reimann B.E.F. 1964. Deposition of silica inside a diatom cell. *Exp. Cell Res.* 34 : 605—608.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990. *The diatoms: biology and morphology of the genera.* Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 747 p.
- Sato S., Watanabe T., Nagumo T., Tanaka J. 2011. Valve morphogenesis in an araphid diatom *Rhaphoneis amphicerus* (Rhaphoneidaceae, Bacillariophyta). *Phycol. Res.* 59 : 236—243.
- Tesson B., Hildebrand M. 2010a. Extensive and intimate association of the cytoskeleton with forming silica in diatoms: control over patterning on the meso- and micro-scale. *PLoS ONE.* 5 : e14300.
- Tesson B., Hildebrand M. 2010b. Dynamics of silica cell wall morphogenesis in the diatom *Cyclotella cryptica*: substructure formation and the role of microfilaments. *J. Struct. Biol.* 169 : 62—74.
- Thompson A., Rhodes J., Pettman I. 1988. *Culture collection of algae and protozoa: Catalogue of strains.* Kendal: Titus, Wilson and Son. 164 p.
- Van de Meene A.M.L., Pickett-Heaps J.D. 2002. Valve morphogenesis in the centric diatom *Proboscia alata* Sundström. *J. Phycol.* 38 : 351—363.
- Von Stosch H.-A. 1981. Structural and histochemical observations on the organic layers of the diatom cell wall. In: *Proc. of the 6th Symp. on recent and fossil diatoms.* Koenigstein: Koeltz. 231—252.

---

CHANGING OF SILICA VALVES OF DIATOM *SYNEDRA ACUS* subsp. *RADIANS* INFLUENCED BY PACLITAXEL

*Ye. D. Bedoshvili,<sup>1</sup> K. V. Gneusheva, Ye. V. Likhoshway*

Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, 664033;

<sup>1</sup> e-mail: bedoshvilied@list.ru

Diatoms are unicellular microscopic eukaryotes able to form species-specific frustules with micro- and nanostructures of biogenic silica. The morphogenesis of frustules components occurs intracellularly within special organelles under control of cytoskeleton. The mechanisms of morphogenesis control are not clear. The influence of paclitaxel, the microtubule inhibitor, onto morphogenesis of valve of pennate diatom *Synedra acus* subsp. *radians* was investigated. It has been shown that microtubule disturbance on the early morphogenesis stages provoke symmetry axis displacement of immature valve followed by curvature of the valve. At subsequent stages of morphogenesis stages, disturbance of the fine silica micro- and submicroscale structures (areolae and velums) occurs. It is supposed that a necessary condition for successful diatom valve morphogenesis is a balance between stable and dynamic microtubules.

Key words: diatoms, morphogenesis, paclitaxel, biosilica, microtubules.

---