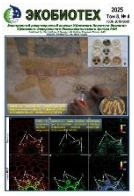
ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru



УДК 58.085 UDC 58.085

Линейное спектральное разделение сигналов при исследовании апопластных барьеров методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

Галин И.Р.[1*], Демченко К.Н.[2]

[1] Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия
[2] Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия
*E-mail: ilshat.rafkatovitch@gmail.com

Аннотация

С использованием метода линейного спектрального разделения сигналов изучено формирование апопластных барьеров у ячменя (*Hordeum vulgare*) сорта Bowman и его почти изогенной линии BLP. При исследовании апопластных барьеров, окрашенных флуоресцентным красителем берберином, автофлуоресценция клеточных стенок может затруднять интерпретацию данных, полученных с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для устранения этой проблемы были проанализированы три стратегии применения алгоритмов линейного спектрального разделения сигналов – автоматическое (слепое) разделение, разделение с использованием ROI и спектральный фингерпринтинг. В результате применения стратегии спектрального фингерпринтинга во всех случаях удалось добиться разделения сигналов, а также выявить различия в формировании апопластных барьеров в исследуемых корнях ячменя сорта Bowman и линии BLP. Было предположено, что данное различие обусловлено влиянием локуса black lemma and pericarp 1 (*Blp1*), который контролирует формирование черной окраски зерновки ячменя у линии BLP. Таким образом, примененный в данной работе подход – обнаружение и выделение целевого сигнала красителя берберина на фоне автофлуоресценции, может быть использован в исследованиях механизмов устойчивости растений к ряду неблагоприятных факторов, влияющих на формирование апопластных барьеров.

Ключевые слова

апопластные барьеры ◆ флуоресцентная микроскопия ◆ конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) ◆ линейное спектральное разделение ◆ спектральный фингерпринтинг ◆ почти изогенные линии Bowman ◆ автофлуоресценция клеточных стенок

Поступила в редакцию: 10.11.2025
Принято в печать: 23.12.2025

Linear spectral unmixing in the study of apoplast barriers with confocal laser scanning microscopy

Galin I.R.[1*], Demchenko K.N.[2]

[1] Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, Russia
[2] Komarov Botanical Institute RAS, Saint Petersburg, Russia
*E-mail: ilshat.rafkatovitch@gmail.com

Abstract

The formation of apoplastic barriers in barley (Hordeum vulgare), the cultivar Bowman, and its near-isogenic line BLP was studied using the linear unmixing method. When studying apoplastic barriers stained with the fluorescent dye berberine, cell wall autofluorescence can complicate the interpretation of data obtained by confocal laser scanning microscopy. To address this issue, we evaluated three linear spectral unmixing strategies – blind unmixing, ROI-based unmixing, and spectral fingerprinting. The spectral fingerprinting strategy successfully separated signals in all cases, revealing differences in the apoplastic barrier formation between the Bowman and the BLP line. This difference was hypothesized to be caused by the influence of the black lemma and pericarp 1 (*Blp1*) locus, which controls the development of black pigmentation in the barley grain of the BLP line. Thus, the method employed in this study – detecting and isolating the target signal of the berberine dye against the autofluorescence background – can be used in research on plant resistance mechanisms to a variety of adverse factors that affect the formation of apoplastic barriers.

Keywords

apoplastic barriers ◆ fluorescence microscopy ◆ confocal laser scanning microscopy (CLSM) ◆ linear spectral unmixing ◆ spectral fingerprinting ◆ Bowman's near-isogenic lines ◆ cell wall autofluorescence

Received: 10.11.2025
Accepted: 23.12.2025

Цитировать | Cite as

DOI: 10.31163/2618-964X/2025-43 EDN: YXDMEU

ВВЕДЕНИЕ

Автофлуоресценция различных молекул в растительных тканях может мешать исследованию развития органов растений с использованием флуоресцентных красителей, особенно если спектры эмиссии автофлуоресценции и флуорофора выбранного красителя перекрываются. В результате эмиссия автофлуоресценции маскирует сигнал флуорофора. В корнях одним из главных источников автофлуоресценции являются суберин и лигнин – биополимеры вторичной клеточной стенки, обладающие широким спектром флуоресценции вследствие наличия в составе множества типов флуорофоров [Donaldson 2020]. Лигнин придает прочность клеточной стенке, а суберин формирует водонепроницаемый барьер в эндодерме корня [Geng *et al.* 2013]. Эти биополимеры входят в состав поясков Каспари, которые формируют апопластные барьеры в корнях, тем самым блокируя апопластный путь движения воды и минералов для защиты растений от вредных веществ и патогенов [Schreiber *et al*. 1999, 2007; Geng *et al*. 2013]. Таким образом, формирование апопластных барьеров является ключевым механизмом адаптации растений к различным видам стресса и регуляцией транспорта воды и питательных веществ в корне, что определяет важность и актуальность изучения формирования поясков Каспари [Kim *et al.* 2018].

Суберин в апопластных барьерах, включая пояски Каспари, выявляют с помощью окрашивания разными красителями. Так, для световой микроскопии используют синтетический жирорастворимый азокраситель Sudan III [Zeier *et al.* 1999], а для выявления суберина во флуоресцентной микроскопии используют алкалоид растительного происхождения берберин [Soukup 2014]. Выбор в пользу берберина как флуоресцентного красителя оправдан тем, что пробоподготовка таких образцов обычно занимает меньше времени, что важно при экспресс-оценке формирования апопластных барьеров, а также позволяет использовать конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (КЛСМ), обладающую лучшим пространственным разрешением по сравнению со световой микроскопией.

Однако, при исследовании корней на наличие формирующихся поясков Каспари методом КЛСМ собственная автофлуоресценция клеточных стенок также существенно усложняет дальнейшую интерпретацию данных. Существуют различные способы решения данной проблемы, такие, как предварительное фотообесцвечивание (photobleaching) [Neumann, Gabel 2002] использование технологии Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) позволяющей регистрировать длительность флуоресценции после возбуждения [Wallrabe, Periasamy 2005], а также математических алгоритмов, к которым относится линейное спектральное разделение сигналов [Zimmermann *et al.* 2003; Kraus *et al.* 2007; Ilina *et al.* 2020]. Однако, фотообесцвечивание образцов под воздействием интенсивного источника света может повредить структуру образцов, а технология FLIM наиболее информативна при существенном различии между временем жизни целевого флуорофора и флуорофоров автофлуоресценции [Donaldson, Radotic 2013], поэтому данная работа была сосредоточена на изучении различных стратегий линейного спектрального разделения сигналов при исследовании формирования апопластных барьеров.

В качестве объекта исследования была выбрана контрастная пара генотипов ячменя: сорт Bowman и его почти изогенная линия BLP, характеризующаяся чёрной пигментацией чешуй и перикарпа зерновки вследствие накопления меланиноподобных пигментов (фитомеланинов) [Glagoleva *et al.* 2017]. Почти изогенные линии Bowman (Bowman near-isogenic lines, NILs) максимально схожи с референтным сортом, но несут небольшой

донорный сегмент (локус), что делает их удобными для изучения эффекта конкретного локуса без влияния общего генетического фона [Druka *et al.* 2011]. Известно, что линия BLP контролируется моногенно наследуемым локусом black lemma and pericarp 1 (*Blp1*) с плейотропным эффектом [Glagoleva *et al.* 2017]. В данном случае предполагается, что локус *Blp1* обуславливает повышение экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в биосинтезе суберина и лигнина. Анализ РНК-секвенирования (RNA-seq) линии BLP показал изменение экспрессии генов, вовлечённых в биосинтез мономеров суберина, кутикулярного воска, кутина и начальных реакций биосинтеза фенилпропаноидов, что указывает на связь между пигментацией семени и повышением уровня фенольных соединений, а также их окислением [Glagoleva *et al.* 2022]. Также анализ 130 фенольных соединений методом ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии с анализом на основе массы и фрагментации в тандемной масс-спектрометрии (УВЭЖХ МС/МС) выявил накопление в зерновках чёрнозерного ячменя сорта Erlenghei (тоже несущего локус *Blp1*) 17 дифференциальных метаболитов по сравнению с белозерным ячменем, связанных с путём биосинтеза фенилпропаноидов (кофейная, феруловая, сирингиловая кислоты и др.) [Liu *et al.* 2023]. Поскольку путь биосинтеза фенилпропаноидов поставляет предшественников для биосинтеза лигнина [Yao *et al.* 2021] и полифенольного домена суберина [Nomberg *et al.* 2022], мы уделяем особое внимание влиянию локуса *Blp1*, на формирование апопластных барьеров, через изменения в пути биосинтеза фенилпропаноидов [Andersen *et al.* 2021]. Значительные различия в формировании апопластных барьеров в корнях чернозерного и белозерного ячменя, в свою очередь могут служить хорошим селективным маркером при отборе растений устойчивых к таким стрессам, как засоление, действие тяжелых металлов, проникновение патогенов, радиальная потеря кислорода и т.д. [Kim *et al.* 2018; Uddin *et al.* 2024].

Цель настоящей работы – оценить эффективность линейного спектрального разделения для выявления различий в формировании апопластных барьеров в корнях двух генотипов ячменя (*Hordeum vulgare*) Bowman и его почти изогенной линии BLP, отличающихся наличием меланиновой окраски колоса, посредством выделения сигнала красителя берберина из общего сигнала автофлуоресценции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и получение растительного материала

В работе использовали зерновки Ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.) сорта Bowman (Bowman From Fargo, NGB 22812) и его почти изогенной линии i:BwBlp1 (Black lemma and pericarp 1.b, BW062, NGB 20470, далее линия BLP) из генного банка NordGen (www.nordgen.org), которые были любезно предоставлены коллегами из Института цитологии и генетики СО РАН. Зерновки проращивали в темноте в течение трех суток, а далее выращивали на светоплощадке при 14-часовом фотопериоде и освещенности 400 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$, на плотиках, помещенных на 10% модифицированную среду Хогланда-Арнона-I (0.5 мМ KNO_3, 0.5 мМ $Ca(NO_3)_2$, 0.1 мМ KH_2PO_4, 0.1 мМ $MgSO_4$, 0.5 мМ $CaSO_4$) в течение 12 суток. Детально технология выращивания описана ранее [Vysotskaya *et al.* 2020].

Пробоподготовка растительного материала

В работе анализировали сегменты из трех зон центрального корня проростков: сегмент кончика корня (0.5 см от кончика корня), сегмент средней части корня, далее

средняя зона (на удалении 5 – 6 см от кончика корня) и сегмент в 2 см от перехода корня в побег, далее базальная зона (на удалении 9 – 10 см от кончика корня).

Приготовление поперечных срезов проводили как описано в работе [Kitaeva *et al.* 2016] с некоторыми модификациями. Сегменты корней фиксировали в 3% параформальдегиде в фосфатно-солевом буфере (PBS, Phosphate-Buffered Saline; 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4, 1.8 мМ KH_2PO_4; pH=7.4) под вакуумом (10 мбар) в течение 1 ч и далее 24 ч без вакуума при температуре 4℃. После фиксации сегменты корней отмывали в PBS и далее заключали в 2% агарозный гель для последующего получения поперечных срезов на микротоме с вибрирующим лезвием Leica VT1200S (Leica Biosystems, США).

Полученные поперечные срезы корней толщиной 50 мкм окрашивали на суберин и лигнин – 0.1% бисульфатом берберина (ЗАО "Вифитех", Оболенск, Россия) в $H_2O_{дист}$ (масса/объем, м/о) в течение 1 ч с последующим подкрашиванием контрастирующим красителем на клеточные стенки для уменьшения фоновой автофлуоресценции – 0.5% толуидиновым синим О (ООО "Диаэм", Москва, Россия) в $H_2O_{дист}$ (м/о) в течение 10 мин [Soukup *et al.* 2007]. Окрашенные срезы помещали на предметные стекла и заключали под покровные стекла в растворе 50% глицерина в $H_2O_{дист}$ (объем/объем, о/о) с добавлением 6.17 мМ $FeCl_3$ для стабилизации красителя [Lux *et al.* 2015].

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Срезы анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Olympus Fluoview FW3000 (Olympus, Япония) с использованием объектива Olympus UPLSAPO 40x/NA 0.95, при возбуждении (Ex) лазером 488 нм [Man *et al.* 2018; Song *et al.* 2019] и длине волны эмиссии Em – 500–590 нм. Получение серии изображений (λ-стек) проводили с шагом 5 нм.

Документация изображений

Документацию изображений и применение алгоритмов линейного спектрального разделения к полученным сериям изображений выполняли с помощью программного обеспечения Olympus FV31S‑SW (Olympus).

Стратегии применения алгоритма линейного спектрального разделения

Для выявления окрашивания берберином апопластных барьеров на срезах корней ячменя, при имеющейся автофлуоресценции клеточных стенок, применяли алгоритмы линейного спектрального разделения сигналов [Zimmermann *et al.* 2003]. При этом при разделении спектров берберина и автофлуоресценции были испытаны три стратегии. Первая стратегия основана на автоматическом (слепом) способе разделения спектров: алгоритм находит независимые компоненты и выделяет спектры из общего полученного сигнала, обеспечивая быстрый результат и минимальные предпосылки к структуре сигнала [Neher *et al.* 2009]. Вторая стратегия заключается в выборе зоны интереса (ROI, Region of Interest) и поиске той зоны, где предполагается наличие сигнала целевого флуорофора, после чего алгоритм применяется к выделенной области для демонстрации источников разделения. Этот подход позволяет выделить несколько спектров из общего сигнала и впоследствии работать с ними отдельно. Третья стратегия предполагает использование эталонного спектра как образца для разделения, где источник для разделения заранее выделяется и записывается в виде эталонного спектра, который затем используется

алгоритмом. Данная стратегия известна под названием спектральный фингерпринтинг [Dickinson *et al.* 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ флуоресценции берберина с применением стандартного канального метода лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

На поперечных срезах трех зон корня ячменя сорта Bowman и линии BLP после окрашивания суберина берберином и подкрашивания клеточных стенок толуидиновым синим с целью снижения их автофлуоресценции в желто-зеленой области спектра были получены изображения в диапазоне длин волн 500–590 нм (Рис. 1). Флуоресценцию наблюдали в клеточных стенках всех тканей корня, что затрудняет интерпретацию специфического окрашивания апопластных барьеров.

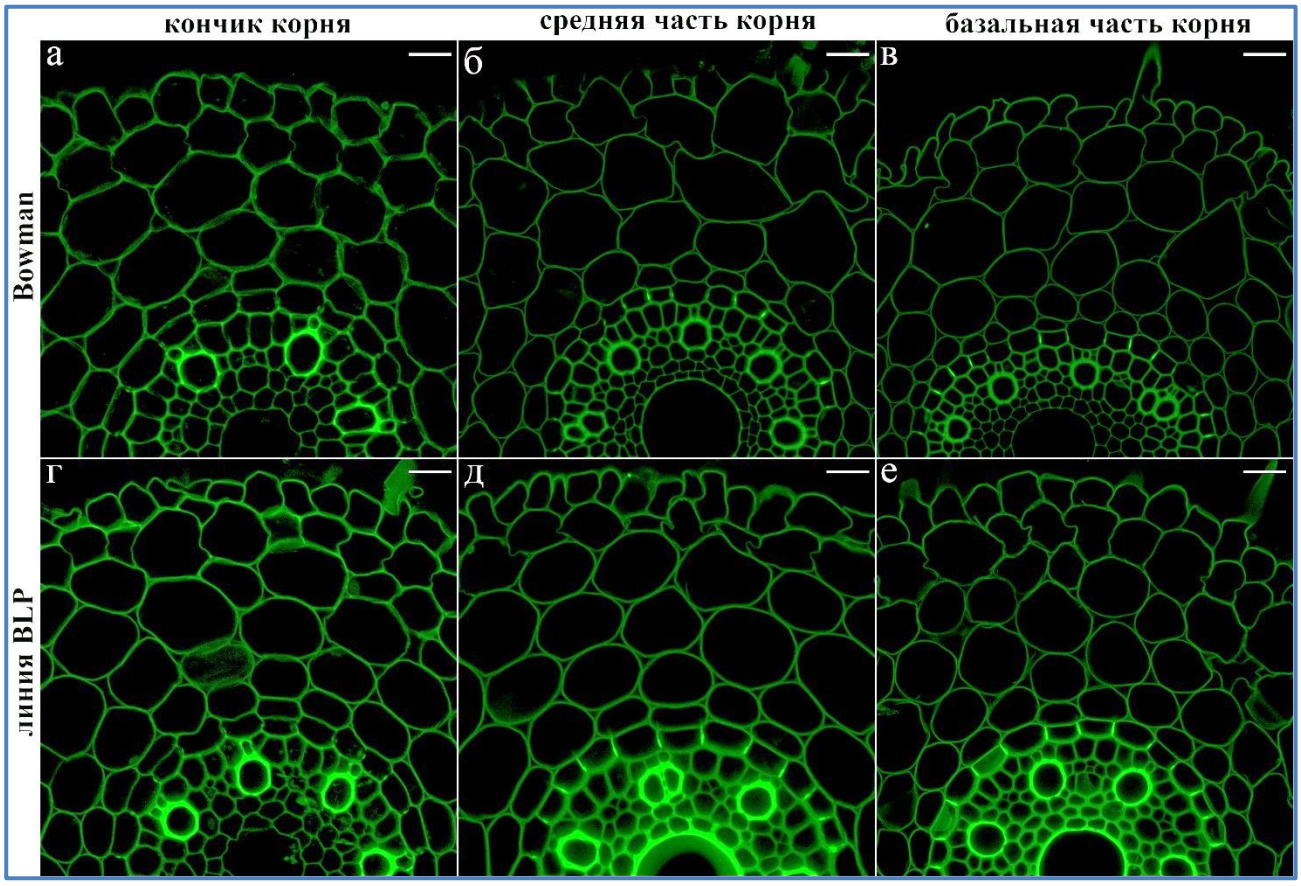


Рисунок 1. Визуализация флуоресценции берберина в различных зонах корня ячменя с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в канальном (стандартном) режиме. Поперечные срезы 12-ти суточных проростков ячменя сорта Bowman (а, б, в) и линии BLP (г, д, е), полученные на вибратоме из трех зон корня, были окрашены берберином и подкрашены толуидиновым синим. Длина волны возбуждения – 488 нм, диапазон детекции флуоресценции – 500–590 нм. а, г – кончик корня; б, д – средняя часть корня; в, е – базальная часть корня. Масштабная линейка – 30 мкм.

Использование алгоритмов линейного спектрального разделения сигналов для визуализации флуоресценции берберина

Для определения мест с преимущественным окрашиванием берберином были получены спектральные серии изображений (λ-стеки) поперечных срезов корня ячменя в трёх зонах корня (Рис. 3–5). В системе Olympus FV31S-SW доступно несколько способов спектрального разделения сигнала, соответствующих разным стратегиям, см. раздел «Материалы и методы». В нашем исследовании были протестированы три стратегии, но на

изображениях Рис. 3–5 приведены результаты стратегии спектрального фингерпринтинга, которая показала наилучшую эффективность во всех случаях применения и может быть рекомендована нами к применению при сходных условиях. При применении стратегий с использованием слепого источника разделения и разделения с использованием ROI, успешного разделения удалось добиться только для корней линии BLP в средней и базальной зоне (Дополнительные материалы: Рис Д1, Д2). Для сорта Bowman не удалось добиться однозначного и воспроизводимого разделения в тех же зонах корня (Дополнительные материалы: Рис. Д3, Д4). Для получения воспроизводимого разделения после применения двух стратегий была применена стратегия спектрального фингерпринтинга, для которой требуется получение эталонов источников флуоресценции входящих в общий сигнал.

Получение эталонного спектра флуоресценции берберина

Для идентификации спектра флуоресценции берберина при последующем линейном разделении сигналов, а также для применения стратегии спектрального фингерпринтинга, нами был получен эталонный спектр суберина пробкового слоя коры дуба пробкового (*Quercus suber*), окрашенного бисульфатом берберина (Рис. 2). При возбуждении лазером 488 нм эмиссию суберинизированного слоя коры дуба, окрашенного берберином, наблюдали на всем исследованном диапазоне 500–585 нм с пиком в 520–525 нм (Рис. 2). По данным литературы эмиссия флуорофора водного раствора берберина находится в диапазоне 450–700 нм [Díaz *et al.* 2009]. В качестве контроля, при тех же условиях, были получены спектры разделения общего сигнала излучения суберина пробкового слоя коры дуба пробкового, который окрасили только толуидиновым синим. С сигнатурами полученных спектров можно ознакомиться в дополнительных материалах (Дополнительные материалы: Рис. Д5).

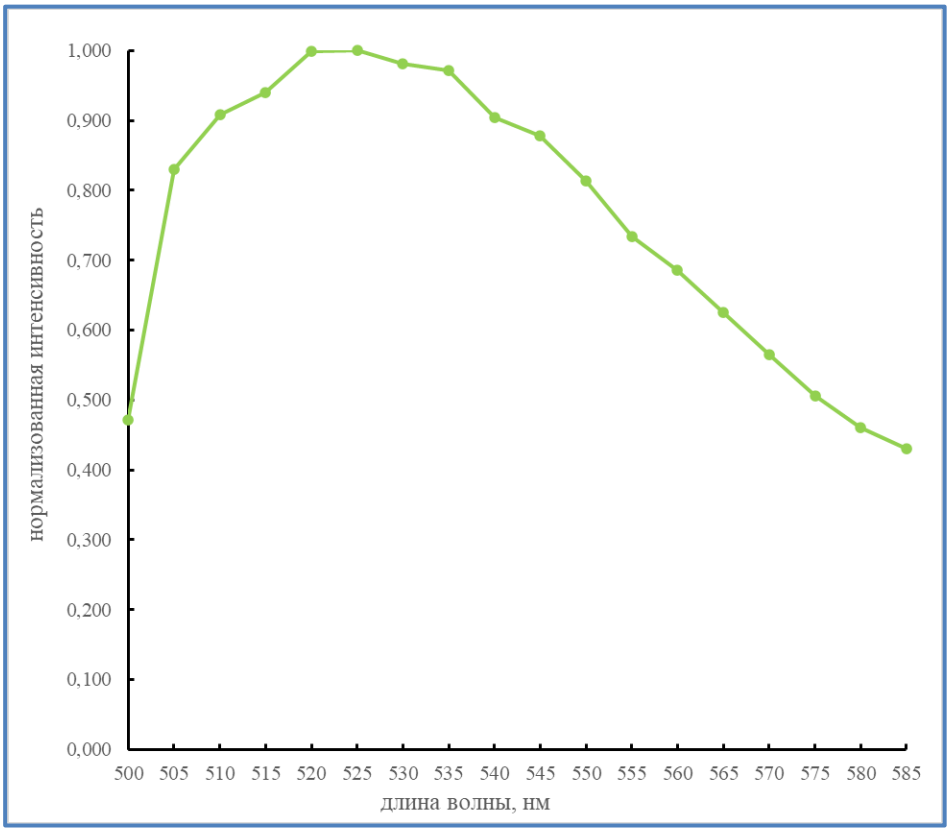


Рисунок 2. Нормализованый спектральный профиль суберина пробкового слоя коры дуба, окрашенной берберином и толуидиновым синим. λ-стек получен в диапазоне длины волны 500–585 нм (ось x) с шагом 5 нм, длина волны лазера возбуждения– 488 нм.

Линейное спектральное разделение сигналов в зоне кончика корня у сорта Bowman и линии BLP

В зоне кончика корня разделение сигналов оказалось возможным только благодаря стратегии спектрального фингерпринтинга (Рис. 3), тогда как попытки применения других стратегий как у сорта Bowman (Дополнительные материалы: Рис. Д6), так и у линии BLP (Дополнительные материалы: Рис. Д7) не показали результата. Анализ результатов работы применения алгоритма спектрального фингерпринтинга выявил наличие разделения сигналов, что можно увидеть при сравнении зон кончика корня, полученных до (Рис. 1а, 1г) и после разделения сигналов (Рис. 3б, 3д). После применения стратегии спектрального фингерпринтинга мы наблюдали существенное различие в окрашивании берберином (зеленый канал) (Рис. 3б, 3д) и толуидиновым синим (красный канал) (Рис. 3а, 3г). Толуидиновый синий окрашивал все клеточные стенки клеток кончика корня как у сорта Bowman, так и у линии BLP (Рис. 3б, 3д). Анализ тепловых карт с цветовой кодировкой интенсивности сигнала флуоресценции в зеленом канале не выявил существенной разницы между формированием апопластных барьеров у сорта Bowman и линии BLP (Рис. 3в, 3е). Берберин окрашивал преимущественно сосуды ксилемы примерно с одинаковой интенсивностью у исследуемых образцов сорта Bowman и линии BLP.

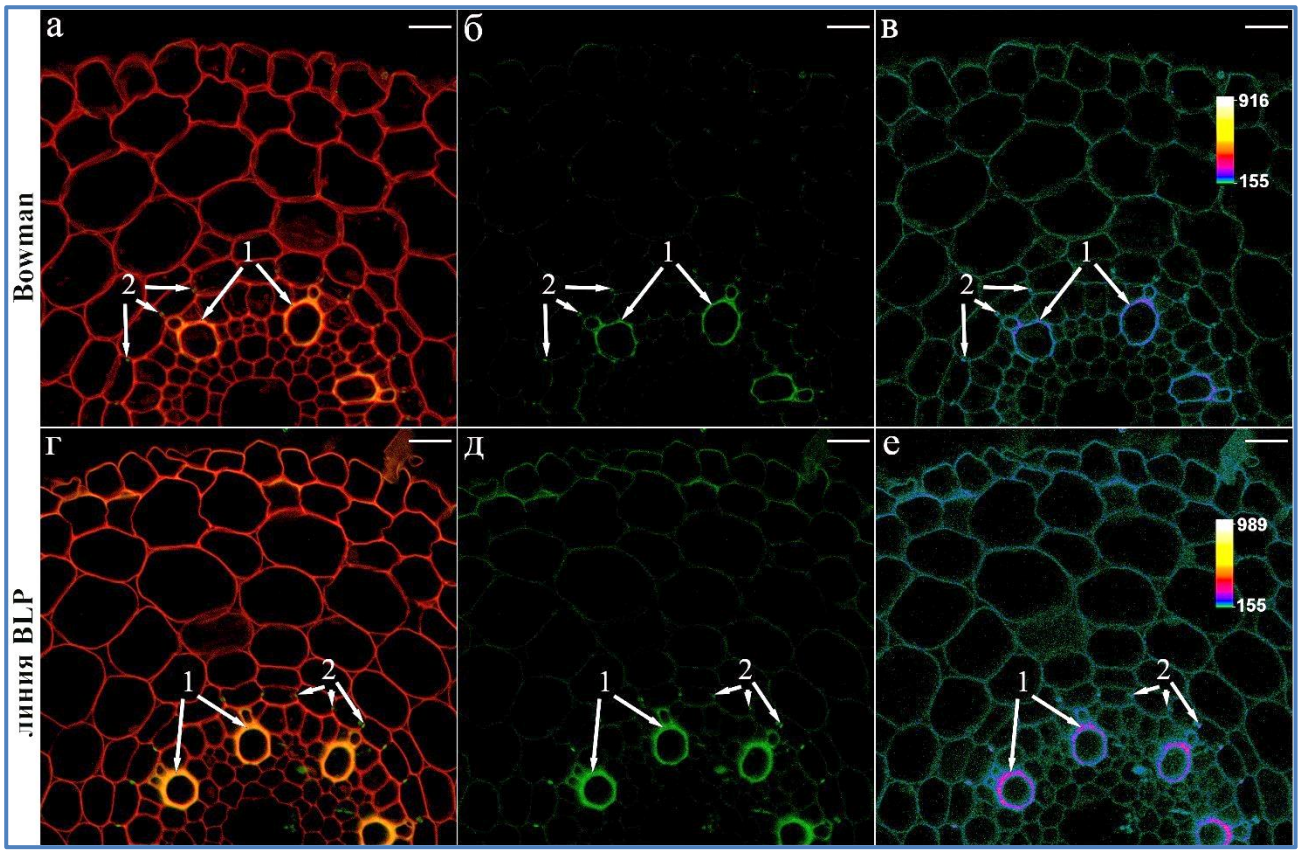


Рисунок 3. Визуализация флуоресценции берберина в апикальной части корня ячменя сорта Bowman (а, б, в) и линии BLP (г, д, е) с использованием алгоритма линейного спектрального разделения сигналов. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в спектральном режиме (λ-стек). Зеленый канал – флуоресценция берберина, красный канал – флуоресценция клеточных стенок окрашенных толуидиновым синим. Для зеленого канала приведена тепловая карта интенсивности сигнала флуоресценции (в, е). Условные обозначения: 1 – сосуды периферической метаксилемы; 2 – формирующиеся пояски Каспари. Масштабная линейка – 30 мкм.

Линейное спектральное разделение сигналов в средней зоне корня сорта Bowman и линии BLP

В средней зоне корня у сорта Bowman добиться разделения удалось только при применении стратегии спектрального фингерпринтинга (Рис. 4а, 4б), в то время как реализация способа автоматического применения алгоритма линейного спектрального разделения сигналов и способа с использованием ROI не дала результатов (Дополнительные материалы: Рис Д3, Д4).

У линии BLP в средней зоне корня разделение было успешным при всех примененных стратегиях (Рис. 4г, 4д; Дополнительные материалы: Рис. Д1, Д2). На Рис. 4 представлены результаты разделения сигналов после применения стратегии спектрального фингерпринтинга в средней зоне корня ячменя сорта Bowman и линии BLP, где видна значительная разница между зеленым и красным каналами. Анализ тепловых карт с цветовой кодировкой интенсивности сигнала флуоресценции в зеленом канале показал существенную разницу между формированием апопластных барьеров у сорта Bowman и линии BLP (Рис. 4в, 4е). Так пояски Каспари и сосуды метаксилемы в средней зоне корня у линии BLP были окрашены интенсивнее, чем у сорта Bowman, а окрашивание центрального сосуда метаксилемы наблюдали только у линии BLP.

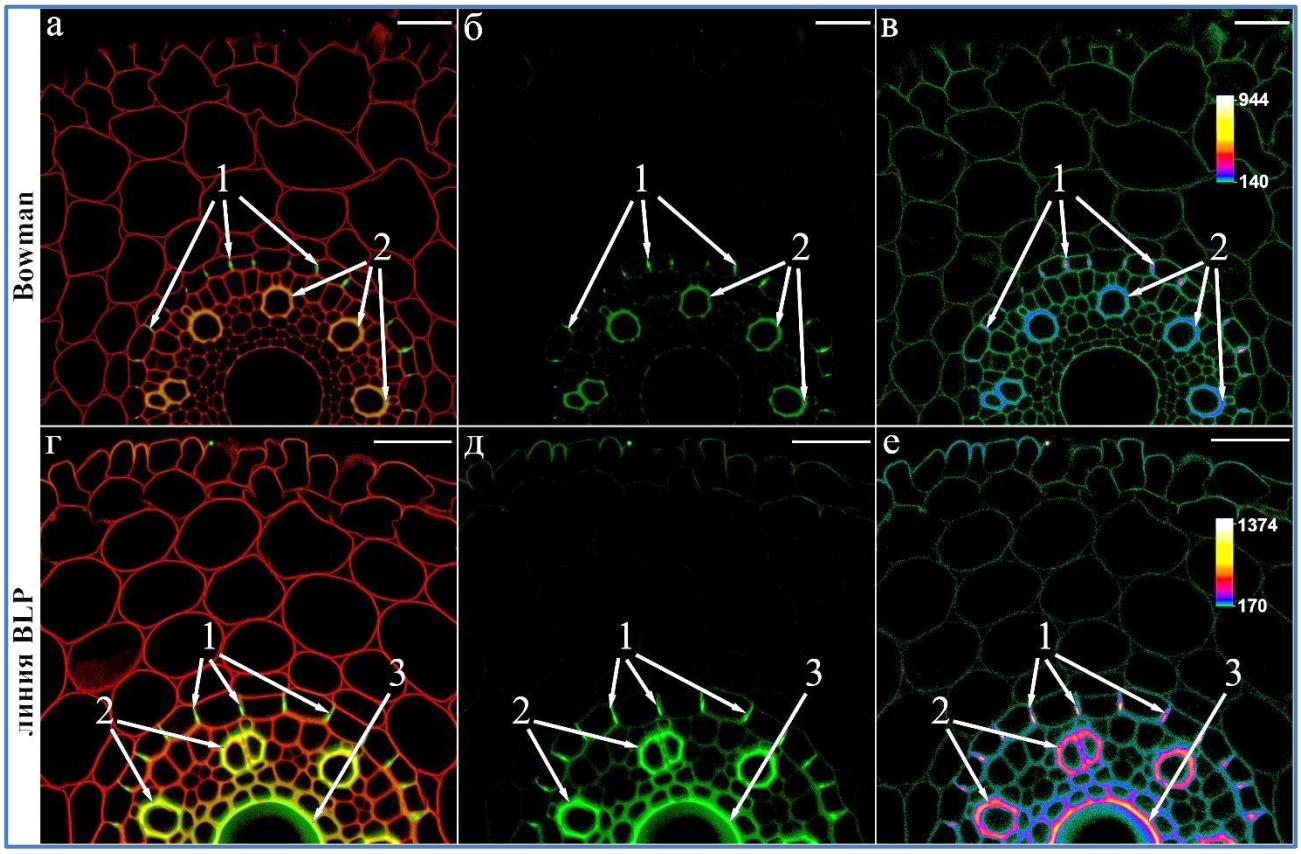


Рисунок 4. Визуализация флуоресценции берберина в средней части корня ячменя сорта Bowman (а, б, в) и линии BLP (г, д, е) с использованием алгоритма линейного спектрального разделения сигналов. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в спектральном режиме (λ-стек). Зеленый канал – флуоресценция берберина, красный канал – флуоресценция клеточных стенок окрашенных толуидиновым синим. Тепловая карта интенсивности сигнала флуоресценции для зеленого канала – в, е. Условные обозначения: 1 – сосуды периферической метаксилемы; 2 – пояски Каспари; 3 – центральный сосуд метаксилемы. Масштабная линейка – 30 мкм.

Линейное спектральное разделение сигналов в базальной зоне корня сорта Bowman и линии BLP

В базальной зоне корня ячменя сорта Bowman разделение оказалось возможным только благодаря стратегии спектрального фингерпринтинга (Рис. 5а, 5б), а с помощью остальных стратегий разделения добиться не удалось (Дополнительные материалы: Рис. Д3, Д4). У линии BLP все стратегии показали хорошее разделение (Рис. 5г, 5д; Дополнительные материалы: Рис. Д1, Д2). На Рис. 5 представлены результаты разделения сигналов после применения стратегии спектрального фингерпринтинга в базальной зоне корня ячменя у сорта Bowman и линии BLP. В базальной зоне корня анализ тепловых карт с цветовой кодировкой интенсивности сигнала флуоресценции в зеленом канале выявил существенную разницу между формированием апопластных барьеров у сорта Bowman и линии BLP (Рис. 5в, 5е). У линии BLP пояски Каспари и сосуды периферической метаксилемы были окрашены интенсивнее, чем у сорта Bowman, а окрашивание центрального сосуда метаксилемы было обнаружено только у линии BLP.

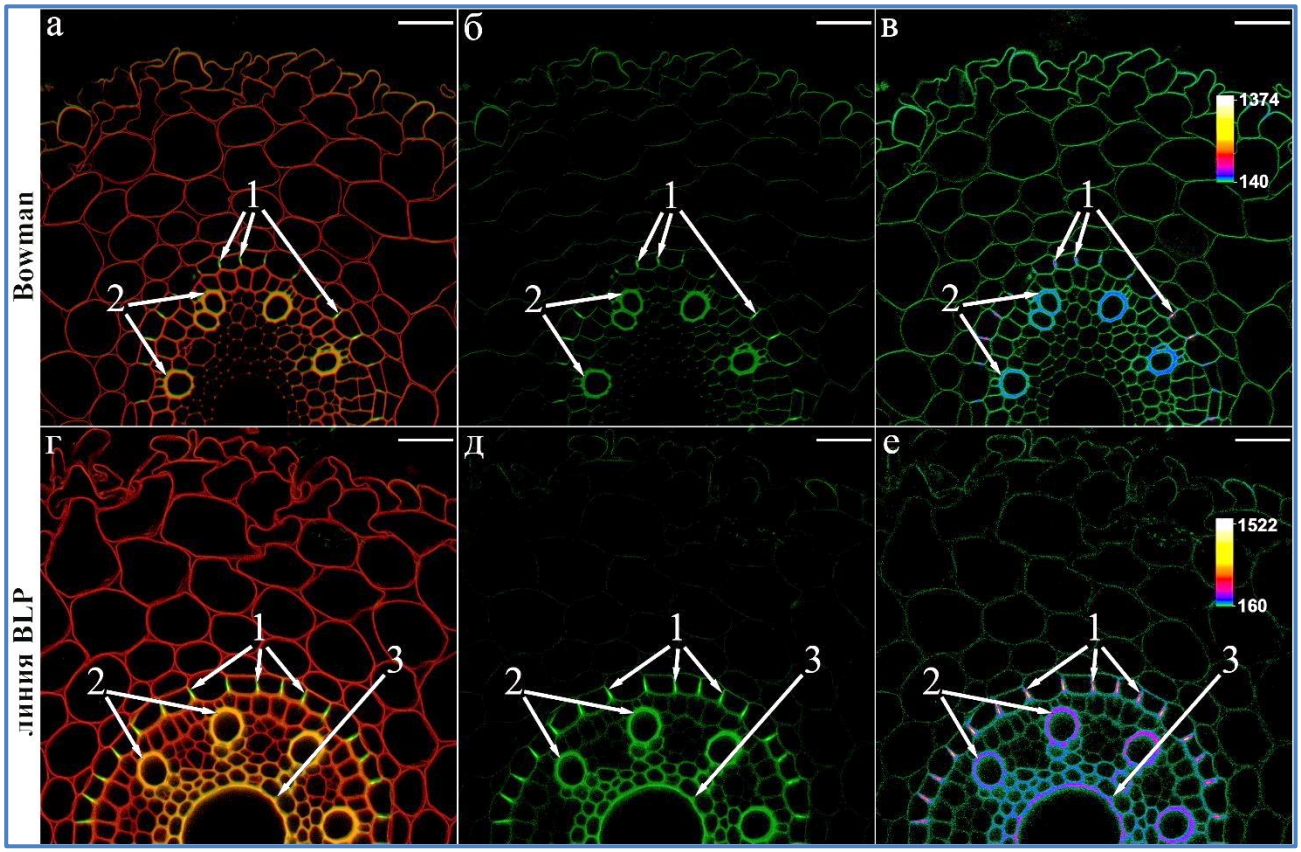


Рисунок 5. Визуализация флуоресценции берберина в базальной части корня ячменя сорта Bowman (а, б, в) и линии BLP (г, д, е) с использованием алгоритма линейного спектрального разделения сигналов. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в спектральном режиме (λ-стек). Зеленый канал – флуоресценция берберина, красный канал – флуоресценция клеточных стенок, окрашенных толуидиновым синим. Тепловая карта интенсивности сигнала флуоресценции для зеленого канала – в, е. Условные обозначения: 1 – пояски Каспари; 2 – сосуды периферической метаксилемы; 3 – центральный сосуд метаксилемы. Масштабная линейка – 30 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ изображения корней сорта Bowman и линии BLP без применения линейного спектрального разделения сигналов

Проведенный нами анализ изображений корней, окрашенных берберином, в общем сигнале не выявил различий в формировании апопластных барьеров между сортом Bowman и линией BLP, несущей локус *Blp1*, обеспечивающий наличие меланиновой окраски колоса (Рис. 1). Ранее, в работе Иванова с соавт. [2024], авторы анализировали изображения без последующего разделения сигналов. Однако, при сравнении полученных результатов формирования апопластных барьеров у нескольких почти изогенных линий различия удалось установить лишь у линии gBLP (в паре сравнения с Bowman), которая также относится к чернозерным линиям ячменя. При этом контраста между сортом Bowman и линией BLP выявлено не было, что соответствует нашим результатам при получении изображений без применения алгоритмов линейного спектрального разделения сигналов (Рис. 1), где эмиссия автофлуоресценции маскирует сигнал берберина.

Маскирующее действие автофлуоресценции в растительных образцах

В работе Brundrett с соавт. [1988] при получении изображений срезов корней Чистотела большого (*Chelidonium majus*), сочетание окрашивания берберином с окрашиванием контрастирующим красителем (анилиновый синий) снижало автофлуоресценцию стенок сосудов ксилемы и суберинoвых ламелл эндодермы, что позволило визуализировать свечение в области радиальных стенок поясков Каспари. В нашем эксперименте ожидалось, что применение контрастирующего красителя толуидинового синего также позволит выявить характерную структуру поясков Каспари, который наряду с анилиновым синим, голубым Эванса и кристаллическим фиолетовым также снижает автофлуоресценцию клеточных стенок в зеленой и желто-зеленой областях спектра и применяется в сочетании с окрашиванием берберином [Soukup 2014]. Однако, в наших образцах при использовании конфокальной микроскопии в канальном режиме заметного снижения уровня автофлуоресценции не наблюдалось (Рис. 1). Исходя из этого, мы применили метод линейного спектрального разделения для выявления характерного для поясков Каспари свечения радиальных стенок (Рис. 3–5).

Анализ флуоресценции суберина и берберина с применением алгоритмов линейного спектрального разделения сигналов

В нашей работе были использованы различные алгоритмы линейного спектрального разделения сигналов – автоматический (слепой) способ, выбор области интереса (ROI) и спектральный фингерпринтинг. Однако не все стратегии спектрального разделения дали положительный результат. Выбор стратегии при разделении сигналов может быть сделан исходя из различных условий. Автоматический способ разделения и способ с использованием области интереса (ROI), предложенные ранее [Neher *et al.* 2009], хорошо показали себя в нашей работе у линии BLP в базальной и средней зонах корня, где получаемые нормализованные графики (Дополнительные материалы: Рис. Д1, Д2) хорошо повторяли выделенный спектральный профиль пробки дуба окрашенной берберином (Рис. 2). Такой результат, прежде всего, связан с высоким уровнем интенсивности целевого сигнала у линии BLP. При этом, в базальной и средней зонах корня сорта Bowman, при применении автоматического способа разделения, а также выделения спектра с помощью указания ROI, сигнал не был разделен (Дополнительные материалы: Рис. Д3, Д4). Однако, сигнал был успешно разделен при применении стратегии спектрального

фингерпринтинга (Рис. 3–5). Поскольку стратегия спектрального фингерпринтинга может быть применена даже, когда уровень целевого сигнала не обладает достаточно высокой интенсивностью, мы предполагаем, что в случае с корнями ячменя сорта Bowman, эмиссия красителя была недостаточно интенсивной по отношению к имеющейся автофлуоресценции для того, чтобы она могла быть выделена с помощью применения стратегий автоматического разделения и разделения с использованием ROI. У линии BLP (что также верно и для сорта Bowman) проблемы при разделении возникли в зоне кончика корня, где целевой сигнал стало возможно разделить также, лишь благодаря стратегии спектрального фингерпринтинга (Рис. 3), тогда как при применении других стратегий сигнал не был разделен (Дополнительные материалы: Рис Д6, Д7).

В данной работе благодаря применению линейного спектрального разделения сигналов удалось впервые добиться визуального различия между сортом Bowman и линией BLP, что говорит об эффективности применяемого подхода. Результаты позволяют говорить об эффективности метода линейного спектрального разделения даже для флуорофора с низким квантовым выходом, какой показывает берберин [Díaz *et al.* 2009]. Эмиссия берберина была также успешно сепарирована от имеющейся автофлуоресценции клеточных стенок корней ячменя, которая, судя по литературным данным, находится в схожем диапазоне длины волны автофлуоресценции лигнина [Donaldson 2020].

Анализ влияния локуса Blp1 на формирование апопластных барьеров

Полученные данные указывают на различия в окрашивании корней ячменя в средней и базальной зонах между сортом Bowman и линией BLP, что, учитывая объект исследования, вероятно связано с влиянием локуса *Blp1*. В обоих генотипах наблюдали формирование апопластных барьеров, однако у линии BLP, несущей локус *Blp1* на изображениях срезов корней после применения линейного спектрального разделения сигналов, было обнаружено более интенсивное окрашивание поясков Каспари (Рис. 4, 5), по сравнению с сортом Bowman, что может свидетельствовать о влиянии локуса *Blp1* на процессы как суберинизации, так и лигнификации при формировании апопластных барьеров в корнях. Ранее было показано, что наличие локуса *Blp1* ответственно за повышение экспрессии генов, включенных в фенилпропаноидный путь и синтез мономера суберина, а также за накопление в семенах чернозерного ячменя метаболитов, участвующих в фенилпропаноидном пути [Glagoleva *et al.* 2022; Liu *et al.* 2023]. Поскольку синтез суберина и лигнина связаны с фенилпропаноидным путем [Yao *et al.* 2021; Nomberg *et al.* 2022], выявленные в нашем исследовании различия в формировании апопластных барьеров также могут быть следствием влияния локуса *Blp1* на фенилпропаноидный путь через влияние на формирование вторичной клеточной стенки.

Поскольку в поясках Каспари суберин и лигнин могут присутствовать одновременно [Schreiber *et al.* 1999], а берберин, согласно литературным данным, может окрашивать оба биополимера [Piccinini *et al.* 2024], то в дальнейшем, для разделения вклада суберина и лигнина в наблюдаемое окрашивание, целесообразно провести дифференциальное окрашивание апопластных барьеров на суберин и лигнин. Количественное определение относительного содержания лигнина в корнях сорта Bowman и линии BLP также может служить дополнительным доказательством влияния локуса *Blp1* на формирование апопластных барьеров.

Формирование апопластных барьеров, как известно, предотвращает неконтролируемое проникновение токсичных веществ с током воды в растение [Kim *et al.*

2018; Uddin *et al.* 2024]. Поэтому исследования влияния локуса *Blp1* на формирование апопластных барьеров являются перспективными при изучении устойчивости злаковых культур к различным стрессовым факторам, таким как, засуха, засоление или затопление, где скорость формирования апопластных барьеров может служить хорошим селективным маркером. Возможность быстрого выявления апопластных барьеров с помощью окрашивания флуоресцентными красителями, с последующим линейным спектральным разделением, при этом, является надежным подходом при подобном отборе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность применения метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с последующим линейным спектральным разделением сигналов была показана для модельных растений ячменя обыкновенного, которые различались наличием локуса *Blp1*. При этом было показано, что присутствие локуса *Blp1* усиливает формирование апопластных барьеров. Кроме того, была показана эффективность различных стратегий применения алгоритмов линейного спектрального разделения, а стратегия спектрального фингерпринтинга может быть рекомендована для подобных исследований как одна из наиболее успешных во всех случаях ее применения, так как обладает достаточной чувствительностью для выявления существующих различий. Метод в целом рекомендуется для исследований, связанных со скоростью формирования апопластных барьеров, которая может служить селективным маркером устойчивости растений к различным видам стрессам.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственных заданий Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № 123020800002-2, а также по теме № 124020100138-4 (Структурно-функциональные и молекулярно-генетические основы развития и адаптации высших растений, 1021071912890-3-1.6.11).

В работе использовалась приборная база Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Шоевой Олесе Юрьевне (Институт цитологии и генетики СО РАН) за предоставленный исследовательский материал.

Конфликт интересов (Conflicts of Interest)

Авторы заявляют об отсутствии известных им конкурирующих финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

The authors declare no competing financial interests or personal relationships of which they are aware that could influence the work reported in this article.

Авторский вклад (Author Contributions)

Галин И.Р. – концептуализация, методология, проведение исследования, визуализация, создание черновика рукописи, создание рукописи и ее редактирование.

Демченко К.Н. – руководство исследованием, верификация данных, создание рукописи и ее редактирование.

Galin I.R. – Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Demchenko K.N. – Project administration, Validation, Writing – review & editing.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Иванов Р.С., Галин И.Р., Ахтямова З.А., Шоева О.Ю. (**2024**) Формирование поясков Каспари в корнях почти изогенных линий ячменя, отличающихся наличием меланиновой окраски колоса. *Экобиотех*. **7**(1): 8–14. https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-1-8-14 EDN: QTRDTU

Andersen T.G., Molina D., Kilian J., Franke R.B., Ragni L., Geldner N. (**2021**) Tissue-autonomous phenylpropanoid production is essential for establishment of root barriers. *Current Biology*. **31**(5): 965-977.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.070

Brundrett M.C., Enstone D.E., Peterson C.A. (**1988**) A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma*. **146**: 133–142. https://doi.org/10.1007/BF01405922

Díaz M.S., Freile M.L., Gutiérrez M.I. (**2009**) Solvent effect on the UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopic properties of berberine. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **8**(7): 970–974. https://doi.org/10.1039/b822363g

Dickinson M.E., Bearman G., Tille S., Lansford R., Fraser S.E. (**2001**) Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *BioTechniques*. **31**(6): 1272–1278. https://doi.org/10.2144/01316bt01

Donaldson L. (**2020**) Autofluorescence in plants. *Molecules*. **25**(10): 2393. https://doi.org/10.3390/molecules25102393

Donaldson L.A., Radotic K. (**2013**) Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. *Journal of Microscopy*. **251**(2): 178–187. https://doi.org/10.1111/jmi.12059

Druka A., Franckowiak J., Lundqvist U. *et al.* (**2011**) Genetic dissection of barley morphology and development. *Plant Physiology*. **155**(2): 617–627. https://doi.org/10.1104/PP.110.166249

Geng Y., Wu R., Wee C.W., Xie F., Wei X., Chan P.M.Y., Tham C., Duan L., Dinneny J.R. (**2013**) A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **25**(6): 2132–2154. https://doi.org/10.1105/tpc.113.112896

Glagoleva A.Y., Shmakov N.A., Shoeva O.Y., Vasiliev G. V, Shatskaya N. V, Börner A., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K. (**2017**) Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the black lemma and pericarp (*Blp*) gene. *BMC Plant Biology*. **17**(1): 182. https://doi.org/10.1186/s12870-017-1124-1

Glagoleva A.Y., Vikhorev A. V, Shmakov N.A., Morozov S. V, Chernyak E.I., Vasiliev G. V, Shatskaya N. V, Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. (**2022**) Features of activity of the phenylpropanoid biosynthesis pathway in melanin-accumulating barley grains. *Frontiers in Plant Science*. **13**: 923717. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923717

Ilina E.L., Kiryushkin A.S., Demchenko K.N. (**2020**) Features of fluorescent protein application to study the root system development of cucurbits (*Cucurbitaceae*). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. **55**(5): 1040–1055. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.5.1040eng

Kim Y.X., Ranathunge K., Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. (**2018**) Composite transport model and water and solute transport across plant roots: An update. *Frontiers in Plant Science*. **9**: 337453. https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00193/BIBTEX

Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C.J., Tsyganov V.E. (**2016**) Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum:* bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytologist*. **210**(1): 168–183. https://doi.org/10.1111/nph.13792

Kraus B., Ziegler M., Wolff H. (**2007**) Linear fluorescence unmixing in cell biological research. *In: Méndez-Vilas A., Díaz J. (eds.) Modern research and educational topics in microscopy.* Formatex. Badajoz, Spain: 863–873.

Liu Y., Chen P., Li W., Liu X., Yu G., Zhao H., Zeng S., Li M., Sun G., Feng Z. (**2023**) Conjunctive analyses of BSA-seq and BSR-seq to identify candidate genes controlling the Black lemma and pericarp trait in barley. *International Journal of Molecular Sciences*. **24**(11): 9473. https://doi.org/10.3390/ijms24119473

Lux A., Vaculík M., Kováč J. (**2015**) Improved methods for clearing and staining of plant samples. *In: Yeung E.C.T., Stasolla C., Sumner M.J., et al. (eds.) Plant microtechniques and protocols.* Springer International Publishing. Cham: 167–178. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_10

Man Y., Zhao Y., Ye R., Lin J., Jing Y. (**2018**) *In vivo* cytological and chemical analysis of Casparian strips using stimulated Raman scattering microscopy. *Journal of Plant Physiology*. **220**: 136–144. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.11.002

Neher R.A., Mitkovski M., Kirchhoff F., Neher E., Theis F.J., Zeug A. (**2009**) Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. *Biophysical Journal*. **96**(9): 3791–3800. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.068

Neumann M., Gabel D. (**2002**) Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **50**(3): 437–439. https://doi.org/10.1177/002215540205000315

Nomberg G., Marinov O., Arya G.C., Manasherova E., Cohen H. (**2022**) The key enzymes in the suberin biosynthetic pathway in plants: An update. *Plants*. **11**(3): 392. https://doi.org/10.3390/plants11030392

Piccinini L., Nirina Ramamonjy F., Ursache R. (**2024**) Imaging plant cell walls using fluorescent stains: The beauty is in the details. *Journal of Microscopy*. **295**(2): 102–120. https://doi.org/10.1111/jmi.13289

Schreiber L., Franke R., Hartmann K. (**2007**) Chemical compositon of apoplastic transport barriers in roots. *In: Sattelmacher B., Horst W.J. (eds.) The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions.* Springer Netherlands. Dordrecht: 109–117. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5843-1_8

Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. (**1999**) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany*. **50**(337): 1267–1280. https://doi.org/10.1093/jxb/50.337.1267

Song C., Shen W., Du L., Wen J., Lin J., Li R. (**2019**) Development and chemical characterization of Casparian strips in the roots of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Trees*. **33**(3): 827–836. https://doi.org/10.1007/s00468-019-01820-x

Soukup A. (**2014**) Selected simple methods of plant cell wall histochemistry and staining for light microscopy. *In: Žárský V., Cvrčková F. (eds.) Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols.* Humana Press. Totowa, NJ: 25–40. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-643-6_2

Soukup A., Armstrong W., Schreiber L., Franke R., Votrubová O. (**2007**) Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: A chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist*. **173**(2): 264–278. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01907.x

Uddin N., Li X., Ullah M.W., Sethupathy S., Ma K., Zahoor, Elboughdiri N., Khan K.A., Zhu D. (**2024**) Lignin developmental patterns and Casparian strip as apoplastic barriers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. **260**: 129595. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129595

Vysotskaya L., Akhiyarova G., Feoktistova A., Akhtyamova Z., Korobova A., Ivanov I., Dodd I., Kuluev B., Kudoyarova G. (**2020**) Effects of phosphate shortage on root growth and hormone content of barley depend on capacity of the roots to accumulate ABA. *Plants*. **9**(12): 1722. https://doi.org/10.3390/plants9121722

Wallrabe H., Periasamy A. (**2005**) Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*. **16**(1): 19–27. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.12.002

Yao T., Feng K., Xie M., Barros J., Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., Muchero W., Chen J.-G. (**2021**) Phylogenetic occurrence of the phenylpropanoid pathway and lignin biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*. **12** https://doi.org/10.3389/fpls.2021.704697

Zeier J., Ruel K., Ryser U., Schreiber L. (**1999**) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta*. **209**(1): 1–12. https://doi.org/10.1007/s004250050601

Zimmermann T., Rietdorf J., Pepperkok R. (**2003**) Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. *FEBS Letters*. **546**(1): 87–92. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00521-0

REFERENCES

Ivanov R.S., Galin I.R., Akhtyamova Z.A., Shoeva O.Y. (**2024**) Formation of Casparian bands in the roots of almost isogenic barley lines, different by the presence of melanin color of the speak. *Ecobiotech.* **7**(1): 8-14. https://doi.org/10.31163/2618-964x-2024-7-1-8-14 (In Rus.)

Andersen T.G., Molina D., Kilian J., Franke R.B., Ragni L., Geldner N. (**2021**) Tissue-autonomous phenylpropanoid production is essential for establishment of root barriers. *Current Biology*. **31**(5): 965-977.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.070

Brundrett M.C., Enstone D.E., Peterson C.A. (**1988**) A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma*. **146**: 133–142. https://doi.org/10.1007/BF01405922

Díaz M.S., Freile M.L., Gutiérrez M.I. (**2009**) Solvent effect on the UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopic properties of berberine. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **8**(7): 970–974. https://doi.org/10.1039/b822363g

Dickinson M.E., Bearman G., Tille S., Lansford R., Fraser S.E. (**2001**) Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *BioTechniques*. **31**(6): 1272–1278. https://doi.org/10.2144/01316bt01

Donaldson L. (**2020**) Autofluorescence in plants. *Molecules*. **25**(10): 2393. https://doi.org/10.3390/molecules25102393

Donaldson L.A., Radotic K. (**2013**) Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. *Journal of Microscopy*. **251**(2): 178–187. https://doi.org/10.1111/jmi.12059

Druka A., Franckowiak J., Lundqvist U. *et al.* (**2011**) Genetic dissection of barley morphology and development. *Plant Physiology*. **155**(2): 617–627. https://doi.org/10.1104/PP.110.166249

Geng Y., Wu R., Wee C.W., Xie F., Wei X., Chan P.M.Y., Tham C., Duan L., Dinneny J.R. (**2013**) A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **25**(6): 2132–2154. https://doi.org/10.1105/tpc.113.112896

Glagoleva A.Y., Shmakov N.A., Shoeva O.Y., Vasiliev G. V, Shatskaya N. V, Börner A., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K. (**2017**) Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the black lemma and

pericarp (*Blp*) gene. *BMC Plant Biology*. **17**(1): 182. https://doi.org/10.1186/s12870-017-1124-1

Glagoleva A.Y., Vikhorev A. V, Shmakov N.A., Morozov S. V, Chernyak E.I., Vasiliev G. V, Shatskaya N. V, Khlestkina E.K., Shoeva O.Y. (**2022**) Features of activity of the phenylpropanoid biosynthesis pathway in melanin-accumulating barley grains. *Frontiers in Plant Science*. **13**: 923717. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923717

Ilina E.L., Kiryushkin A.S., Demchenko K.N. (**2020**) Features of fluorescent protein application to study the root system development of cucurbits (*Cucurbitaceae*). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. **55**(5): 1040–1055. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.5.1040eng

Kim Y.X., Ranathunge K., Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. (**2018**) Composite transport model and water and solute transport across plant roots: An update. *Frontiers in Plant Science*. **9**: 337453. https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00193/BIBTEX

Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., Timmers A.C.J., Tsyganov V.E. (**2016**) Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum:* bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytologist*. **210**(1): 168–183. https://doi.org/10.1111/nph.13792

Kraus B., Ziegler M., Wolff H. (**2007**) Linear fluorescence unmixing in cell biological research. *In: Méndez-Vilas A., Díaz J. (eds.) Modern research and educational topics in microscopy.* Formatex. Badajoz, Spain: 863–873.

Liu Y., Chen P., Li W., Liu X., Yu G., Zhao H., Zeng S., Li M., Sun G., Feng Z. (**2023**) Conjunctive analyses of BSA-seq and BSR-seq to identify candidate genes controlling the Black lemma and pericarp trait in barley. *International Journal of Molecular Sciences*. **24**(11): 9473. https://doi.org/10.3390/ijms24119473

Lux A., Vaculík M., Kováč J. (**2015**) Improved methods for clearing and staining of plant samples. *In: Yeung E.C.T., Stasolla C., Sumner M.J., et al. (eds.) Plant microtechniques and protocols.* Springer International Publishing. Cham: 167–178. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_10

Man Y., Zhao Y., Ye R., Lin J., Jing Y. (**2018**) *In vivo* cytological and chemical analysis of Casparian strips using stimulated Raman scattering microscopy. *Journal of Plant Physiology*. **220**: 136–144. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.11.002

Neher R.A., Mitkovski M., Kirchhoff F., Neher E., Theis F.J., Zeug A. (**2009**) Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. *Biophysical Journal*. **96**(9): 3791–3800. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.068

Neumann M., Gabel D. (**2002**) Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **50**(3): 437–439. https://doi.org/10.1177/002215540205000315

Nomberg G., Marinov O., Arya G.C., Manasherova E., Cohen H. (**2022**) The key enzymes in the suberin biosynthetic pathway in plants: An update. *Plants*. **11**(3): 392. https://doi.org/10.3390/plants11030392

Piccinini L., Nirina Ramamonjy F., Ursache R. (**2024**) Imaging plant cell walls using fluorescent stains: The beauty is in the details. *Journal of Microscopy*. **295**(2): 102–120. https://doi.org/10.1111/jmi.13289

Schreiber L., Franke R., Hartmann K. (**2007**) Chemical compositon of apoplastic transport barriers in roots. *In: Sattelmacher B., Horst W.J. (eds.) The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport and reactions.* Springer Netherlands. Dordrecht: 109–117. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5843-1_8

Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. (**1999**) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany*. **50**(337): 1267–1280. https://doi.org/10.1093/jxb/50.337.1267

Song C., Shen W., Du L., Wen J., Lin J., Li R. (**2019**) Development and chemical characterization of Casparian strips in the roots of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Trees*. **33**(3): 827–836. https://doi.org/10.1007/s00468-019-01820-x

Soukup A. (**2014**) Selected simple methods of plant cell wall histochemistry and staining for light microscopy. *In: Žárský V., Cvrčková F. (eds.) Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols.* Humana Press. Totowa, NJ: 25–40. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-643-6_2

Soukup A., Armstrong W., Schreiber L., Franke R., Votrubová O. (**2007**) Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: A chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *New Phytologist*. **173**(2): 264–278. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01907.x

Uddin N., Li X., Ullah M.W., Sethupathy S., Ma K., Zahoor, Elboughdiri N., Khan K.A., Zhu D. (**2024**) Lignin developmental patterns and Casparian strip as apoplastic barriers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. **260**: 129595. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129595

Vysotskaya L., Akhiyarova G., Feoktistova A., Akhtyamova Z., Korobova A., Ivanov I., Dodd I., Kuluev B., Kudoyarova G. (**2020**) Effects of phosphate shortage on root growth and hormone content of barley depend on capacity of the roots to accumulate ABA. *Plants*. **9**(12): 1722. https://doi.org/10.3390/plants9121722

Wallrabe H., Periasamy A. (**2005**) Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*. **16**(1): 19–27. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.12.002

Yao T., Feng K., Xie M., Barros J., Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., Muchero W., Chen J.-G. (**2021**) Phylogenetic occurrence of the phenylpropanoid pathway and lignin biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*. **12** https://doi.org/10.3389/fpls.2021.704697

Zeier J., Ruel K., Ryser U., Schreiber L. (**1999**) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta*. **209**(1): 1–12. https://doi.org/10.1007/s004250050601

Zimmermann T., Rietdorf J., Pepperkok R. (**2003**) Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. *FEBS Letters*. **546**(1): 87–92. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00521-0

Цитировать как

Галин И.Р., Демченко К.Н. (**2025**). Линейное спектральное разделение при исследовании апопластных барьеров методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. *Экобиотех*. **8**(4): 593-616. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-43 EDN: YXDMEU

Cited as

Galin I.R., Demchenko K.N. (**2025**). Linear spectral unmixing in the study of apoplast barriers with confocal laser scanning microscopy. *Ecobiotech*. **8**(4): 593-616. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-43 EDN: YXDMEU In Rus.

Сведения об авторах

Галин Ильшат Рафкатович, к.б.н, Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия. E-mail: ilshat.rafkatovitch@gmail.com, AuthorID: 863521, SPIN-код: 9385-3724, ORCID: 0000-0003-2964-0805, Scopus Author ID: 57189662651, WoS Research ID: O-7146-2017

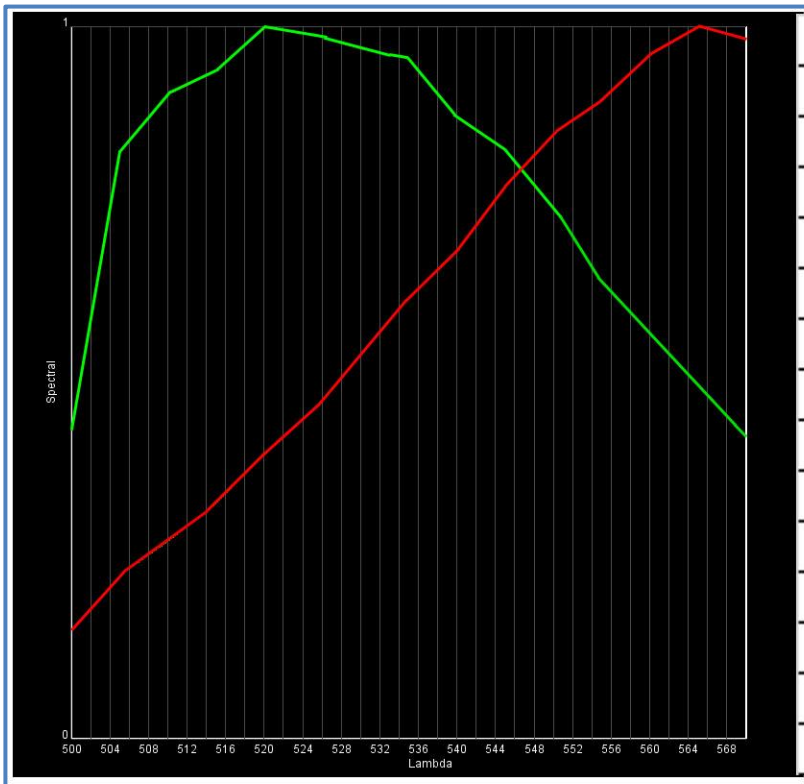
Демченко Кирилл Николаевич, к.б.н, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: demchenko@binran.ru, AuthorID: 89095, SPIN-код: 2383-2830, ORCID: 0000-0001-9422-3106, Scopus Author ID: 6505942342, WoS Research ID: A-7857-2012

Information About the Authors

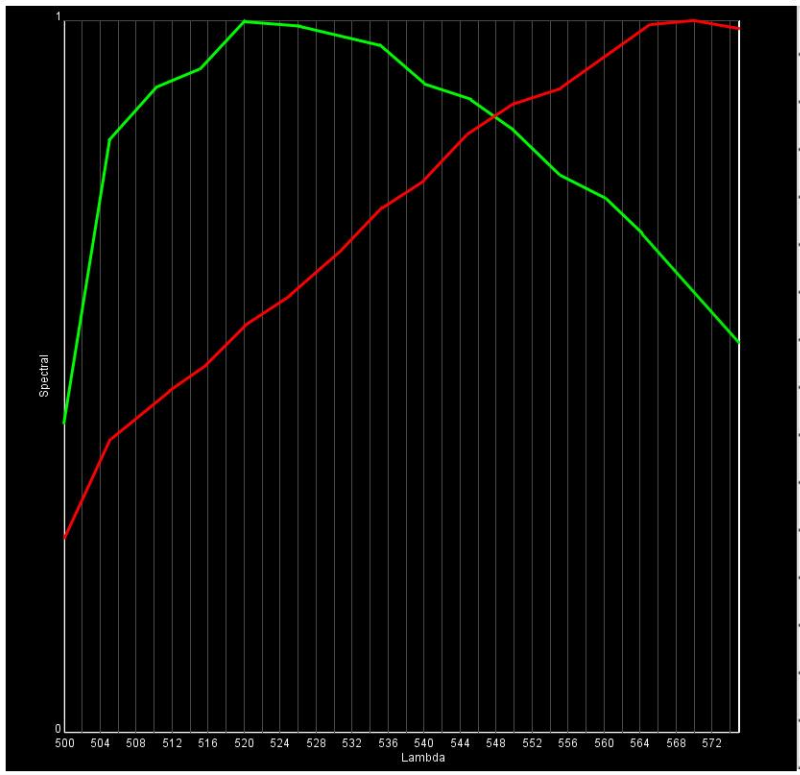
Galin Ilshat Rafkatovich, Candidate of Biological Sciences, Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, Russia. E-mail: ilshat.rafkatovitch@gmail.com, AuthorID: 863521, SPIN-код: 9385-3724, ORCID: 0000-0003-2964-0805, Scopus Author ID: 57189662651, WoS Research ID: O-7146-2017

Demchenko Kirill Nikolaevich, Candidate of Biological Sciences, Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. E-mail: demchenko@binran.ru, AuthorID: 89095, SPIN-код: 2383-2830, ORCID: 0000-0001-9422-3106, Scopus Author ID: 6505942342, WoS Research ID: A-7857-2012

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ



500	0,432
505	0,823
510	0,905
515	0,937
520	1,000
525	0,989
530	0,969
535	0,956
540	0,874
545	0,827
550	0,747
555	0,642
560	0,568
565	0,499
570	0,425



500	0,433
505	0,833
510	0,905
515	0,932
520	1,000
525	0,994
530	0,981
535	0,966
540	0,912
545	0,891
550	0,846
555	0,784
560	0,752
565	0,691
570	0,618
575	0,547

Рисунок Д1: ***Нормализованные графики эмиссии после применения слепого способа разделения (Blind Unmixing) в корнях линии BLP средней (сверху) и базальной (снизу) зоны окрашенных берберином и толуидиновым синим.*** **Таблица справа от графиков показывает длину волны эмиссии и нормализованную интенсивность флуоресценции для графика, обозначенного зеленым цветом.**

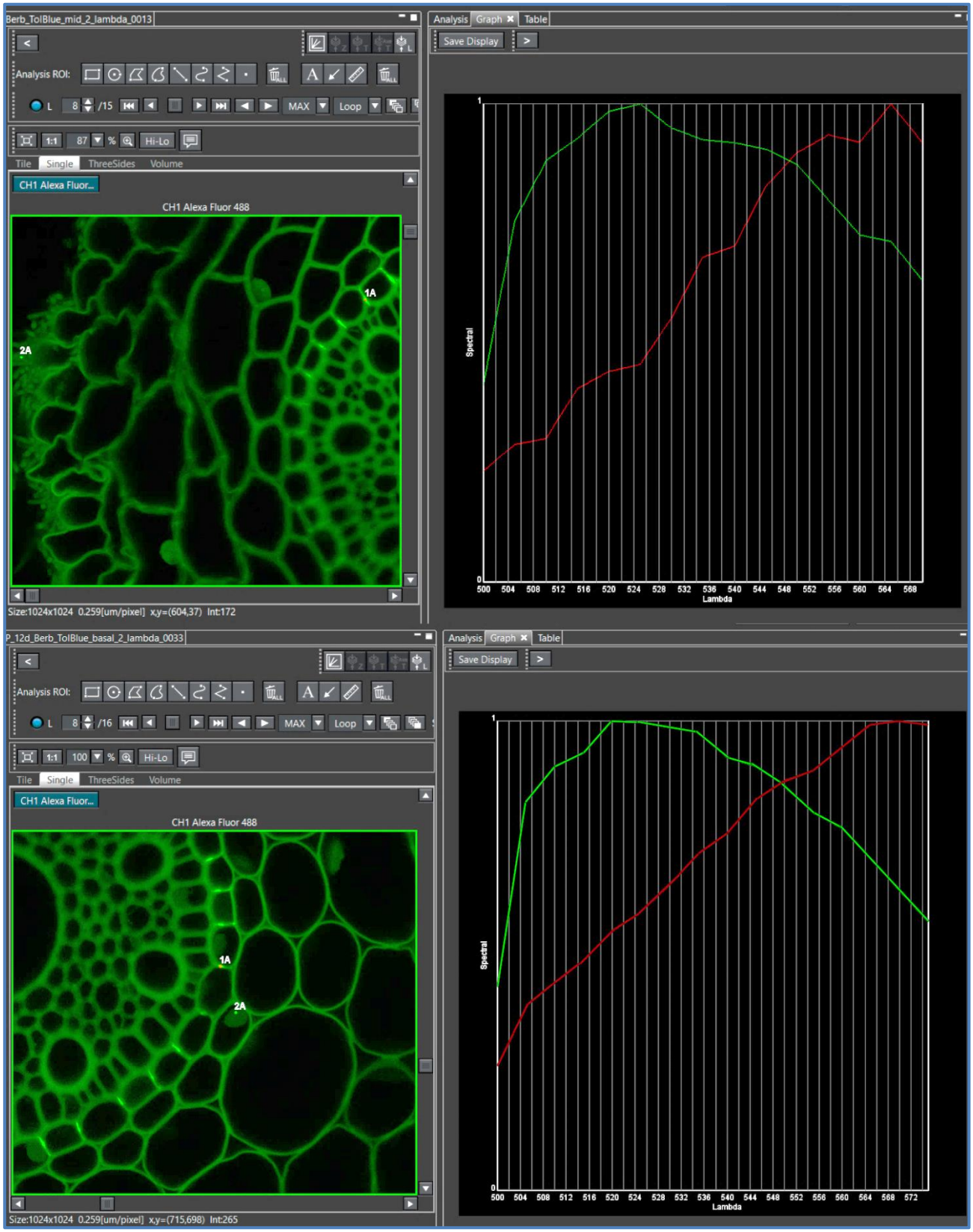
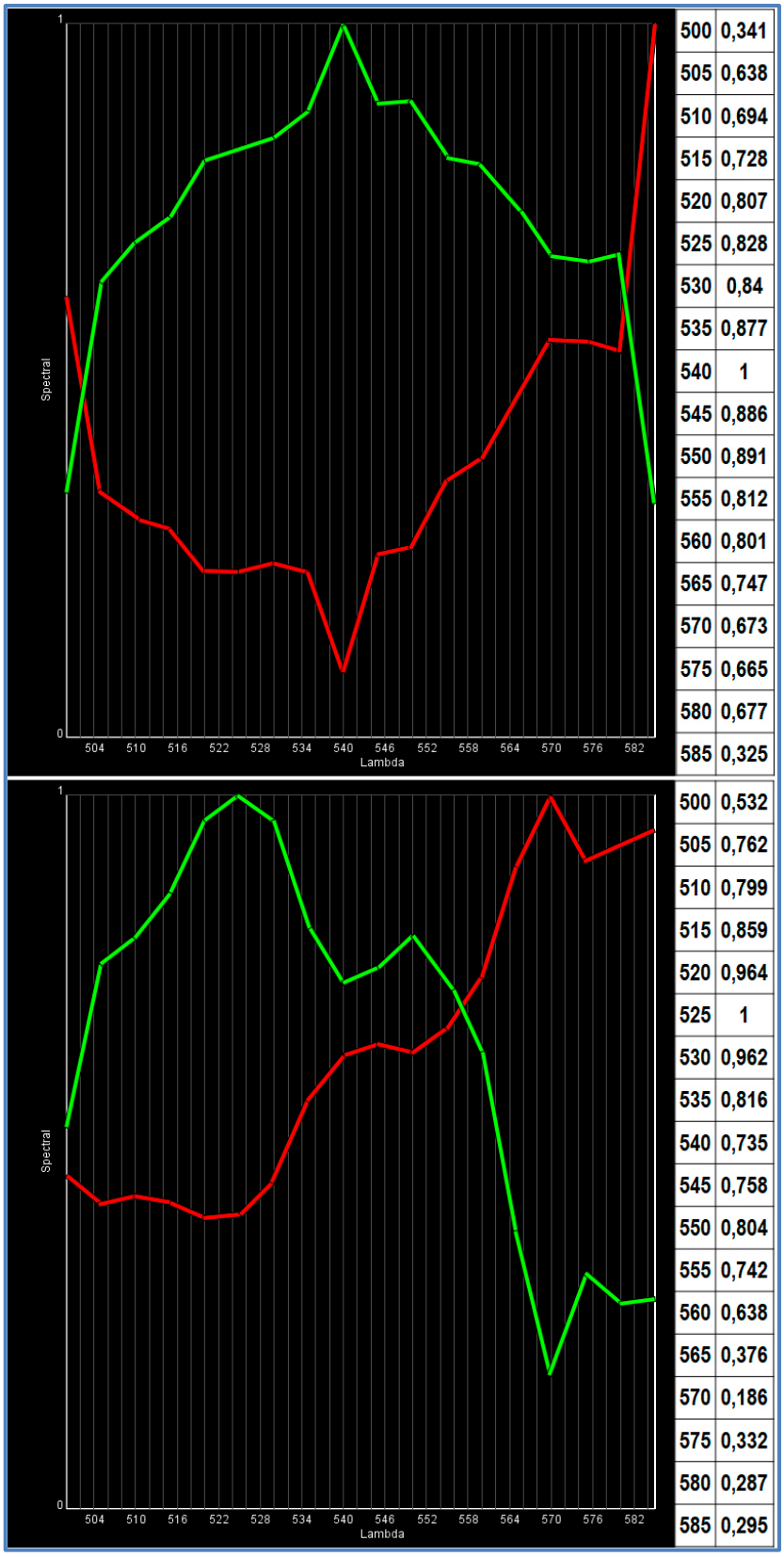


Рисунок Д2: ***Нормализованные графики эмиссии после применения разделения способом обозначения зоны интереса (ROI – region of interest) в корнях линии BLP средней (сверху) и базальной (снизу) зоны окрашенных берберином и толуидиновым синим*****. 1A и 2A – ROI, для которых рассчитаны графики справа.**



500	0,341
505	0,638
510	0,694
515	0,728
520	0,807
525	0,828
530	0,84
535	0,877
540	1
545	0,886
550	0,891
555	0,812
560	0,801
565	0,747
570	0,673
575	0,665
580	0,677
585	0,325

500	0,532
505	0,762
510	0,799
515	0,859
520	0,964
525	1
530	0,962
535	0,816
540	0,735
545	0,758
550	0,804
555	0,742
560	0,638
565	0,376
570	0,186
575	0,332
580	0,287
585	0,295

Рисунок Д3: ***Нормализованные графики эмиссии после применения слепого способа разделения (Blind Unmixing) в корнях сорта Bowman средней (сверху) и базальной (снизу) зоны окрашенных берберином и толуидиновым синим.*** **Таблица справа от графиков показывает длину волны эмиссии и нормализованную интенсивность флуоресценции для графика, обозначенного зеленым цветом.**

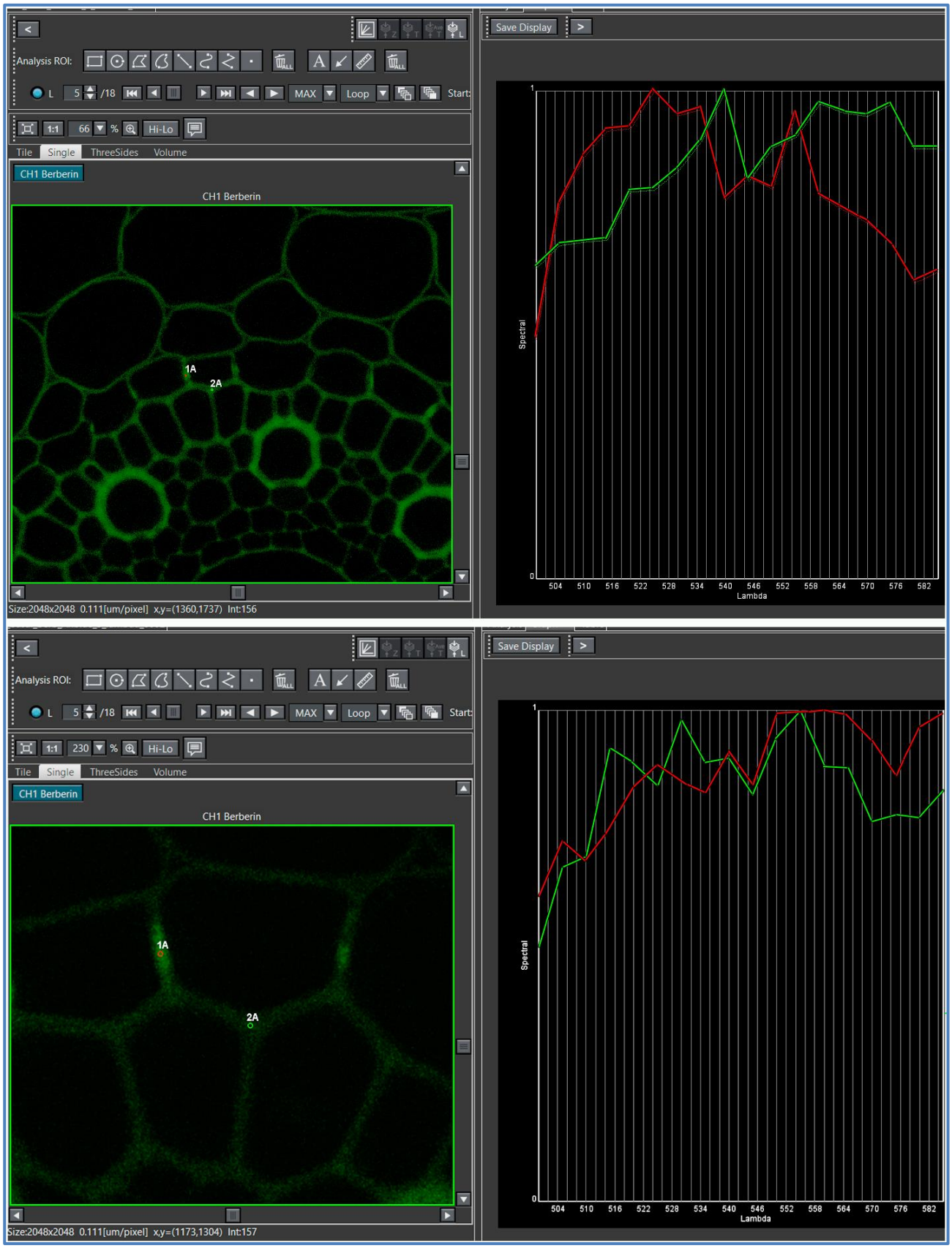
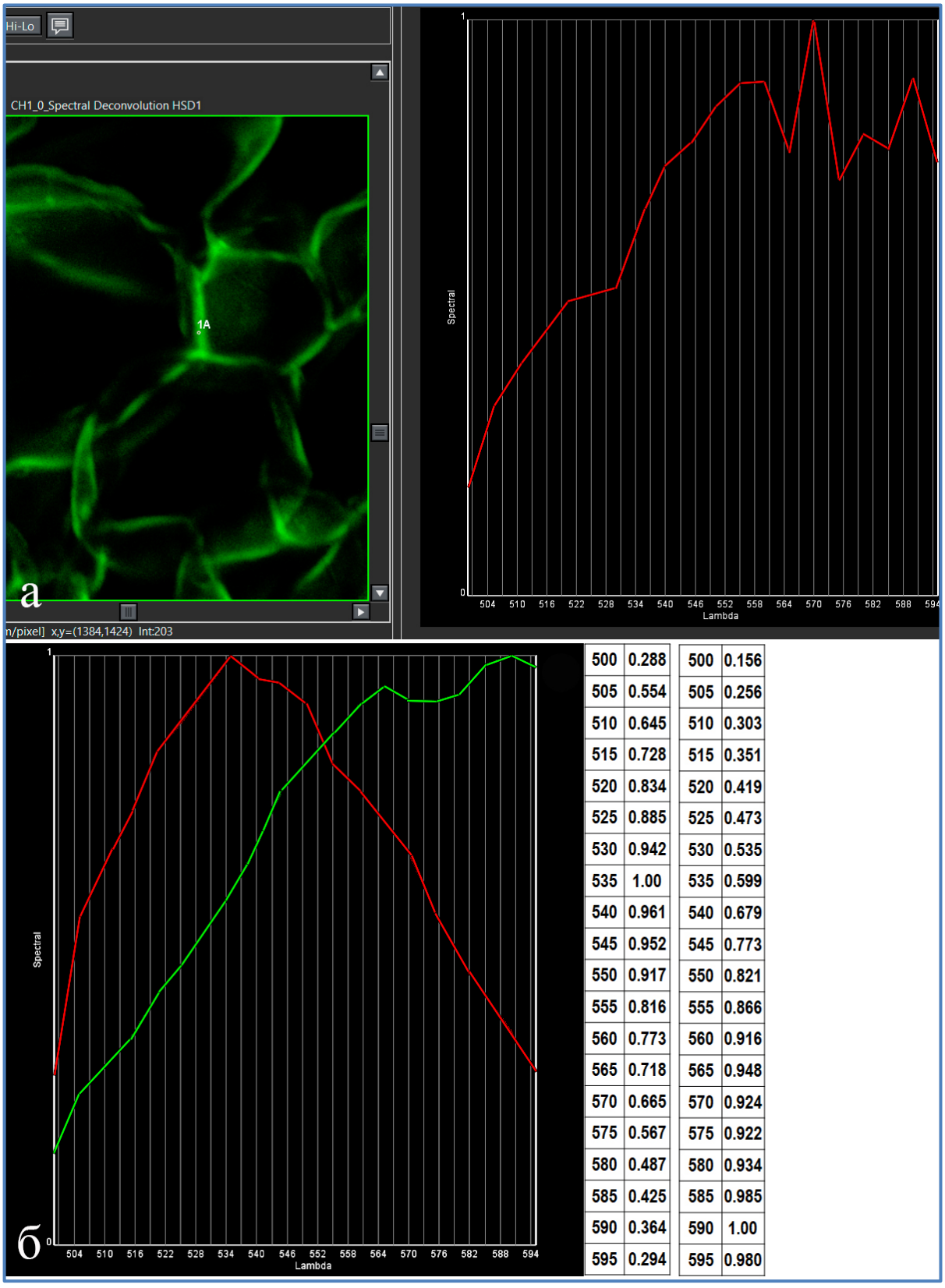
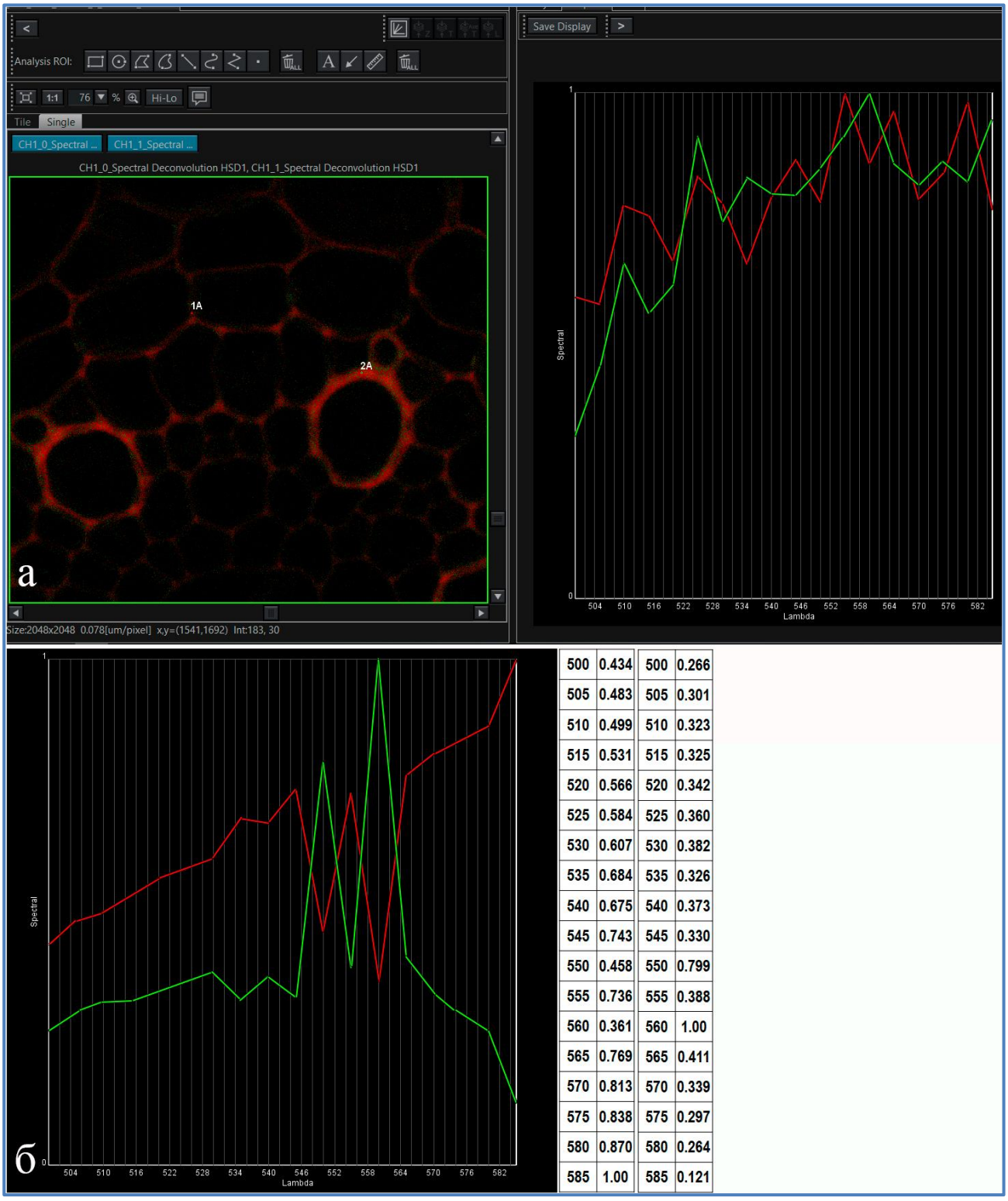


Рисунок Д4: ***Нормализованные графики эмиссии после применения разделения способом обозначения зоны интереса (ROI – region of interest) в корнях сорта Bowman в средней (сверху) и базальной (снизу) зоны окрашенных берберином и толуидиновым синим*****. 1A и 2A – ROI, для которых рассчитаны графики справа.**



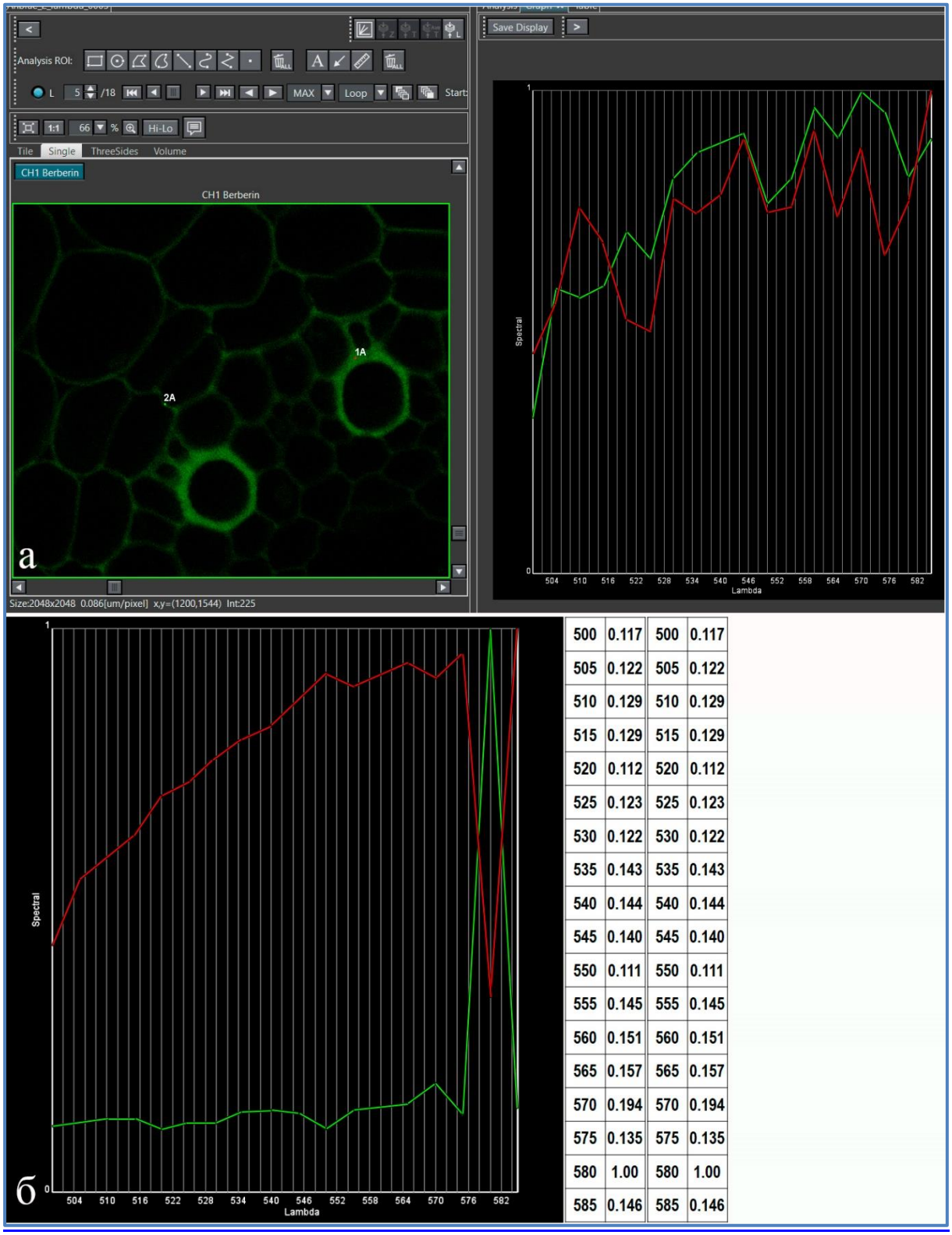
500	0.288	500	0.156
505	0.554	505	0.256
510	0.645	510	0.303
515	0.728	515	0.351
520	0.834	520	0.419
525	0.885	525	0.473
530	0.942	530	0.535
535	1.00	535	0.599
540	0.961	540	0.679
545	0.952	545	0.773
550	0.917	550	0.821
555	0.816	555	0.866
560	0.773	560	0.916
565	0.718	565	0.948
570	0.665	570	0.924
575	0.567	575	0.922
580	0.487	580	0.934
585	0.425	585	0.985
590	0.364	590	1.00
595	0.294	595	0.980

Рисунок Д5: ***Нормализованные графики эмиссии*** **пробкового слоя коры дуба пробкового (*Quercus suber*), окрашенного толуидиновым синим,** ***после применения разделения с использованием ROI (а) и слепого способа разделения (б).*** **Для (а): 1А – ROI, для которого рассчитан график (справа). Для (б): Таблицы справа от графиков показывают соответствие длины волны нормализованной интенсивности флуоресценции.**



500	0.434	500	0.266
505	0.483	505	0.301
510	0.499	510	0.323
515	0.531	515	0.325
520	0.566	520	0.342
525	0.584	525	0.360
530	0.607	530	0.382
535	0.684	535	0.326
540	0.675	540	0.373
545	0.743	545	0.330
550	0.458	550	0.799
555	0.736	555	0.388
560	0.361	560	1.00
565	0.769	565	0.411
570	0.813	570	0.339
575	0.838	575	0.297
580	0.870	580	0.264
585	1.00	585	0.121

Рисунок Д6: ***Нормализованные графики эмиссии после применения разделения способом обозначения зоны интереса (ROI – region of interest) в зоне кончика корня сорта Bowman,*** **окрашенных берберином и толуидиновым синим,** ***после применения разделения с использованием ROI (а) и слепого способа разделения (б).*** **Для (а): 1А и 2А – ROI, для которого рассчитаны графики (справа). Для (б): Таблицы справа от графиков показывают соответствие длины волны нормализованной интенсивности флуоресценции.**



500	0.117	500	0.117
505	0.122	505	0.122
510	0.129	510	0.129
515	0.129	515	0.129
520	0.112	520	0.112
525	0.123	525	0.123
530	0.122	530	0.122
535	0.143	535	0.143
540	0.144	540	0.144
545	0.140	545	0.140
550	0.111	550	0.111
555	0.145	555	0.145
560	0.151	560	0.151
565	0.157	565	0.157
570	0.194	570	0.194
575	0.135	575	0.135
580	1.00	580	1.00
585	0.146	585	0.146

Рисунок Д7: ***Нормализованные графики эмиссии после применения разделения способом обозначения зоны интереса (ROI – region of interest) в зоне кончика корня линии BLP,*** **окрашенных берберином и толуидиновым синим,** ***после применения разделения с использованием ROI (а) и слепого способа разделения (б).*** **Для (а): 1А и 2А – ROI, для которого рассчитаны графики (справа). Для (б): Таблицы справа от графиков показывают соответствие длины волны нормализованной интенсивности флуоресценции.**