

Паттерн эпидермиса листа пшеницы как модель для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез

У.С. Зубаирова¹, А.В. Дорошков^{1, 2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Эпидермис листа однодольного растения – широко используемая модельная система для изучения дифференцировки клеток растений. Он содержит специализированные клетки, которые легко наблюдать. В настоящей работе предлагается концепция использования растущего листа злаков для изучения стресс-индуцированных изменений морфогенеза в динамике. Линейный лист пшеницы во время своего формирования длительное время сохраняет фазу стационарного роста. Это позволяет наблюдать серию последовательных событий морфогенеза, зафиксированных в клеточной структуре взрослого листа. Для изучения клеточной архитектуры эпидермиса листа пшеницы применен подход, основанный на получении и обработке конфокальных 3D изображений листьев пшеницы, окрашенных флуоресцентными красителями. Он дает возможность проводить точное морфометрическое описание и определять количественные характеристики паттерна эпидермиса листа. Низкие температуры являются одним из факторов, лимитирующих возделывание культурных растений в умеренной зоне. Показаны значимые нарушения морфогенеза устьичного аппарата в эпидермисе предфлаговых листьев сортов Саратовская 29 и Янецкис Пробат в ответ на холодовой стресс. Установлено, что в зоне максимального проявления стрессового воздействия преобладают функционально нарушенные устьица, тогда как в зонах, сформированных до и после него, аномалии развития сводятся только к нарушению морфогенеза обкладочных клеток. Для сорта Саратовская 29 было выявлено формирование значимого количества эктопических трихом в рядах, детерминированных к образованию устьиц. С применением предлагаемого подхода можно получать стандартизованные качественные и количественные оценки стресс-индуцированных нарушений морфогенеза эпидермиса листа пшеницы. Впоследствии эти данные могут быть использованы для верификации компьютерных моделей морфогенеза листа. Дальнейшее изучение механизмов действия холодового стресса на морфогенез позволит найти дополнительные возможности повышения урожайности пшеницы в зонах рискованного земледелия.

Ключевые слова: холодовой стресс; морфогенез; мягкая пшеница; эпидермис листа; устьица; клеточная структура ткани; конфокальная микроскопия; анализ изображений.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Зубаирова У.С., Дорошков А.В. Паттерн эпидермиса листа пшеницы как модель для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):837-844. DOI 10.18699/VJ18.32-0

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zubairova U.S., Doroshkov A.V. Wheat leaf epidermal pattern as a model for studying the influence of stress conditions on morphogenesis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):837-844. DOI 10.18699/VJ18.32-0 (in Russian)

УДК 633.111.1:575.224.46

Поступила в редакцию 14.02.2018

Принята к публикации 27.05.2018

Опубликована онлайн 18.07.2018

© АВТОРЫ, 2018

Авторы внесли равный вклад.

✉ e-mail: ulyanochka@bionet.nsc.ru; ad@bionet.nsc.ru

Wheat leaf epidermal pattern as a model for studying the influence of stress conditions on morphogenesis

U.S. Zubairova¹, A.V. Doroshkov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The leaf epidermis of a monocotyledonous plant is a widely used model system for studying the differentiation of plant cells, as it contains readily observable specialized cells. The approach proposed in this paper uses a growing cereal leaf to study stress-induced dynamic changes in morphogenesis. In the process of formation, the linear leaf of wheat remains in the stationary growth phase for long. This fact permits us to observe a series of successive morphogenetic events recorded in the cellular structure of the mature leaf. In studying the cellular architecture of the wheat leaf epidermis, we obtained and processed confocal 3D images of wheat leaves stained with fluorescent dyes. This procedure allows an accurate morphometric description and determination of quantitative characteristics of the leaf epidermal pattern. Low temperatures are among the factors limiting the growing of crop plants in the temperate zone. In the present work, we show significant aberrations of stomatal morphogenesis in the epidermis of boot leaves of wheat varieties Saratovskaya 29 and Yanetskis Probat in response to cold stress. We found that nonfunctional stomata predominated in the zone of maximum manifestation of stress, whereas in the zones formed before and after the stress impact, the developmental anomalies come to the disturbance in the morphogenesis of subsidiary cells. In Saratovskaya 29, a significant amount of ectopic trichomes formed in rows predetermined to stoma formation. The proposed approach can provide standardized qualitative and quantitative data on stress-induced morphogenesis aberrations in wheat leaf epidermis. Subsequently, these data can be used for verification of computer models of leaf morphogenesis. Further study of the mechanisms of the effect of cold stress on morphogenesis will add to the search for additional opportunities to increase wheat yields in areas of risky agriculture.

Key words: cold stress; morphogenesis; wheat; leaf epidermis; stomata; cellular pattern; confocal microscopy; image analysis.

Низкие температуры – один из абиотических стрессовых факторов среды, лимитирующих продуктивность и ареал сельскохозяйственных растений в умеренных зонах Земли. В настоящее время в мире интенсивно ведутся работы по исследованию механизмов формирования растительных тканей и органов в норме и в ответ на различные стрессовые факторы (Xiong et al., 2002), гормоны (Matías-Hernández et al., 2015) и др. В качестве модельной системы для исследования морфогенеза растительных тканей рассматривается развитие эпидермиса листа и формирование в нем специализированных клеток (Yang, Ye, 2013).

В процессе адаптации к низким температурам происходит перестройка ростовых процессов (Yadav, 2010), что, в свою очередь, приводит к снижению негативного воздействия низких температур на клеточные структуры. Известно, что растениям свойственно динамическое изменение размеров клеток. Это служит важной адаптивной функцией в реакции растений на абиотические стрессы (Limin, Fowler, 2001). Воздействие холода при закладке органов растений может вызывать изменение морфогенеза и сказаться впоследствии на размере, форме и функции зрелых органов.

Клетки растений объединены общей клеточной стенкой в механический ансамбль и не имеют возможности сдвигаться друг относительно друга в процессе роста. Для злаков характерен линейный тип роста листа за счет деления и удлинения клеток в базальной части листовой пластинки (рис. 1, а). По скорости роста листа злаков можно выделить три стадии (Skinner, Nelson, 1995). На первой стадии наблюдается увеличение скорости, на второй она постоянна, а на третьей снижается. Во время роста листа в базальной части наблюдаются характерные участки: зона роста делением и зона роста растяжением (см. рис. 1, а). На второй стадии, продолжающейся несколько дней, размер этих зон остается относительно постоянным. Одновременно с ростом листа в его базальной части происходит специализация отдельных клеток и формирование клеточной архитектуры тканей. В частности, в эпидермисе наблюдается морфогенез специализированных структур – трихом (см. рис. 1, б) и устьичных комплексов (см. рис. 1, в).

Отличительная черта эпидермального паттерна злаков – организация клеток в виде продольных клеточных рядов. При этом специализированные клетки, в частности трихомы и устьица, образуются в отдельных рядах клеток (Gallagher, Smith, 2000; Rudall et al., 2017; Herpworth et al., 2018). Трихомы образуются в результате асимметричного деления. На дистальном конце материнской клетки отделяется меньшая по размеру инициаль, которая в дальнейшем формирует внешний эпидермальный вырост. Устьичные комплексы у злаков, в частности у ячменя, кукурузы и пшеницы, также наблюдаются в обособленных продольных рядах клеток (см. рис. 1, в) (Gallagher, Smith, 2000; Liu et al., 2009; Peterson et al., 2010; Chateret et al., 2017; Rudall et al., 2017; Herpworth et al., 2018). На первом этапе в результате асимметричного деления клеток этого ряда на дистальном конце образуется материнская клетка (см. рис. 1, в2). Перед следующим митозом она индуцирует асимметричные деления в соседних клетках смежных клеточных рядов (см. рис. 1, в3). Они производят обкла-

дочные клетки, важные для функционирования устьища. Далее материнская клетка симметрично делится и образует две замыкающие клетки (см. рис. 1, в4). Таким образом, правильно сформированный устьичный комплекс состоит из четырех клеток (см. рис. 1, в5).

Описанные этапы морфогенеза протекают последовательно вдоль оси роста листа и позволяют наблюдать несколько стадий одновременно. Это делает эпидермис листа злаков удобным объектом для изучения морфогенеза. Понижение температуры влияет на биомеханические свойства и скорость деления клеток, происходят изменения структуры растительной клетки (Yadav, 2010), в частности значительные изменения претерпевает фотосинтетический аппарат (Венжик и др., 2012). Воздействие низкой температуры может привести к биомеханическим ограничениям, изменениям активности макромолекул и уменьшению осмотического потенциала в клеточной среде (Xiong et al., 2002). Так, рост листьев может сильно замедлиться в течение двух минут охлаждения корней (Dale et al., 1990). Однако механизм действия холодового стресса на морфогенез клеточной архитектуры растительных тканей до конца не ясен.

В настоящей работе предлагается методика использования паттерна эпидермиса листа пшеницы в качестве модели для изучения влияния стрессовых условий на морфогенез. Предложена и апробирована методика создания стрессовых условий и извлечения качественных и количественных оценок о динамике нарушений морфогенеза специализированных клеток во время стационарного роста листа. В контролируемых условиях холодового стресса были проведены основные этапы анализа – от подбора длительности воздействия до получения данных о типах и частотах нарушений морфогенеза трихом и устьиц. Для изучения клеточной архитектуры эпидермиса листа пшеницы применен подход, основанный на получении и обработке конфокальных 3D изображений эпидермиса листьев пшеницы, окрашенных флуоресцентными красителями.

Материалы и методы

Генетический материал и условия выращивания. Для экспериментальной работы использовали растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Саратовская 29 (С29) и Янецкис Пробат (ЯП). Сорт С29 имеет разнообразный клеточный состав эпидермиса, содержащий как основные клетки эпидермиса и устьица, так и трихомы различного размера (Дорошков и др., 2011; Doroshkov et al., 2016), поэтому он приемлем для апробации метода изучения стресс-индуцированного нарушения морфогенеза клеточной архитектуры эпидермиса. Сорт ЯП имеет слабо выраженное опушение листа (Doroshkov et al., 2016). Для создания стандартных условий использовали гидропонную теплицу и вазоны с керамзитным грунтом. Длина светового дня поддерживалась 16 ч. Всего было выращено по 20 растений каждого сорта.

Создание стрессовых условий. Схема эксперимента приведена на рис. 2. На стадии четырех зрелых листьев положение свободной части растущего пятого листа отмечалось маркером. В это время в нормальных условиях пятый (предфлаговый) лист находится в фазе стационар-

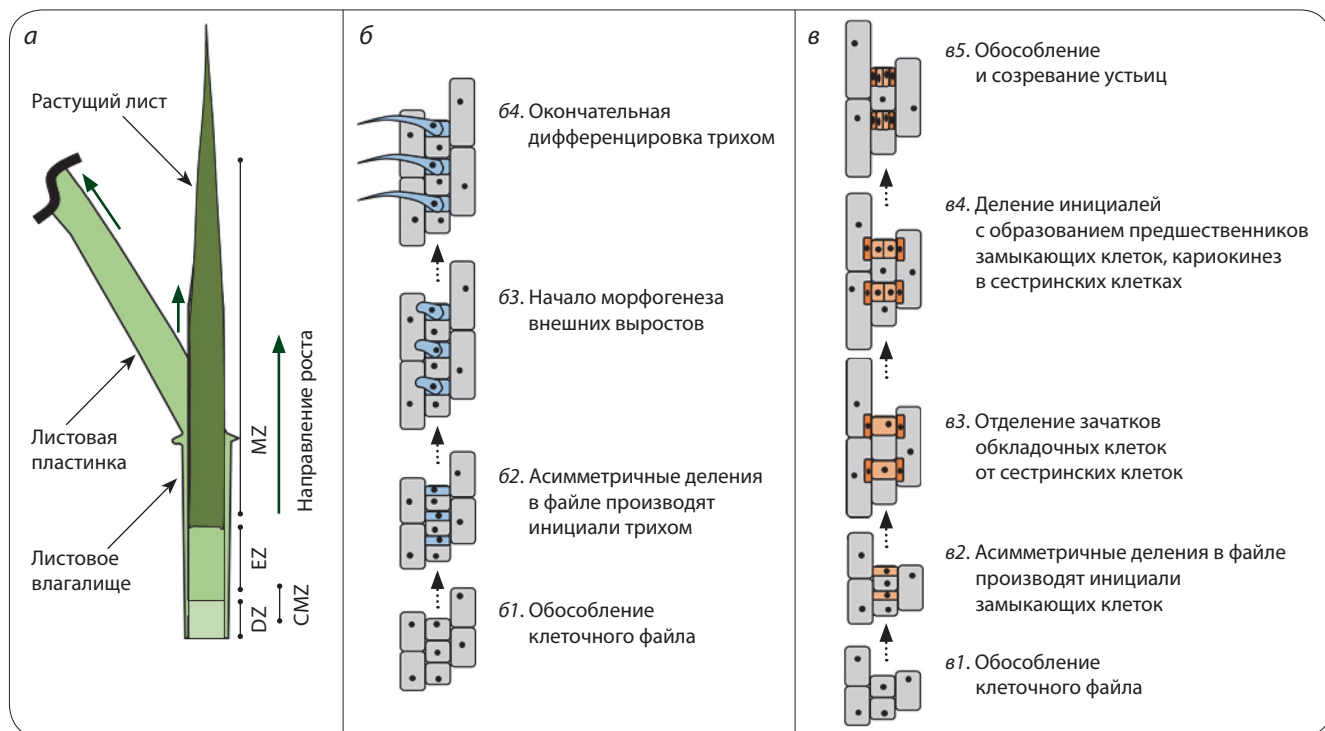


Рис. 1. Схема морфогенеза эпидермиса листа мягкой пшеницы по (Rudall et al., 2017; Herpworth et al., 2018).

а – формирование листа в фазе стационарного роста; *б* – морфогенез трихом; *в* – морфогенез устьиц. DZ – зона роста делением; EZ – зона роста растяжением; MZ – зона зрелых клеток; CMZ – зона морфогенеза трихом и устьиц. Серым цветом обозначены обычные клетки эпидермиса, голубым – трихомы, оранжевым – устьица.

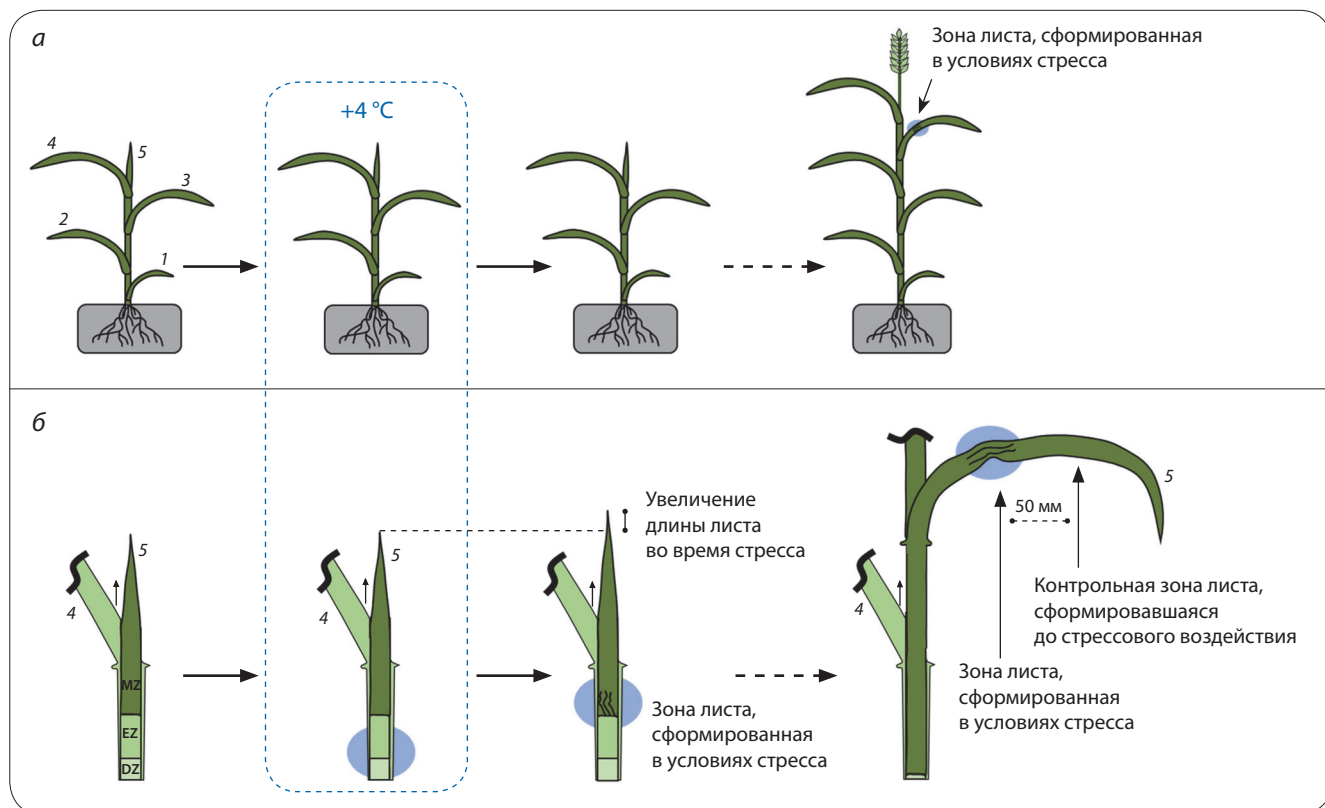


Рис. 2. Схема эксперимента по созданию стрессовых условий: *а* – общая схема; *б* – изменение локализации стресс-индуцированных нарушений морфогенеза специализированных клеток эпидермиса листа в процессе роста листа.

DZ – зона роста делением; EZ – зона роста растяжением; MZ – зона зрелых клеток. Цифры обозначают ярус листа.

ного роста и эпидермис последовательно проходит все этапы формирования с постоянной скоростью. Растения на этой стадии помещали в климатическую камеру при +4 °C с сохранением светового дня (см. рис. 2). Для яровых сортов мягкой пшеницы в период вегетации оптимальная температура – в интервале от +10 до +24 °C, а температура +4 °C служит стрессовым воздействием и вызывает значительное замедление роста. Были сформированы группы растений, подвергавшиеся разной длительности холодового воздействия (2, 4, 6 и 8 сут), а также контрольная группа растений. В каждой группе было по восемь растений двух изучаемых сортов. После холодового воздействия все группы растений возвращали в благоприятные условия и выращивали до стадии колошения. Растения каждой группы затем были подвергнуты визуальной инспекции. Для анализа отбирали пятые (предфлаговые) листья с метками (см. рис. 2, б).

Окраска препаратов и извлечение данных о динамике нарушений морфогенеза специализированных клеток. Области листа с нарушениями морфогенеза инкубировали в фиксаторе 3 : 1 (этанол : уксусная кислота) в течение трех или более часов. Для окрашивания использовали красители 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, Sigma-Aldrich) и Propidium Jodide (PJ, Sigma-Aldrich). Этот набор красителей на фиксированном материале обеспечивает достаточно устойчивую к выгоранию окраску ядер и клеточных стенок, а также позволяет различать глубоко залегающие сосуды. Окраску проводили в два этапа с промежуточной промывкой нейтральным фосфатным буфером. Отмытые двукратно фрагменты листа помещали в раствор PJ 10 мкг/мл на 30 мин, затем снова отмывали два раза по 15 мин. Далее фрагменты листа разделяли на зоны (см. рис. 2, б), окрашивали раствором DAPI 10 мкг/мл в течение 30 мин и заключали под покровное стекло. В качестве реагента, препятствующего выгоранию (антифейда), использовали реагент DABCO (Sigma-Aldrich). Это позволило в дальнейшем проводить многократный микроскопический анализ. DABCO был разведен согласно стандартной методике (25 мг/мл DABCO в смеси 90 % глицерин, 10 % 1 × PBS pH = 8.6). Такая смесь для заключения обладает достаточной вязкостью для удержания покровного стекла на фрагменте листа пшеницы.

Полученные препараты оценивали при помощи флуоресцентного микроскопа ZEISS Axioskop 2 с целью нахождения оптимальной длительности холодового воздействия, которая обеспечивает длину зоны нарушения морфогенеза на взрослом листе в пределах 20 мм. Зона такого размера, по нашим оценкам, содержит около 200 элементов клеточного паттерна в каждом изучаемом продольном ряду, что позволяет определить статистическую достоверность изменения частот появления нарушений морфогенеза устьиц по сравнению с контрольной зоной. Затем препараты с отобранной группы растений были изучены при помощи микроскопа ZEISS LSM 780 NLO в режиме «tile scan» при следующих настройках: увеличение объектива 20×, кратность увеличения при сканировании 0.6, расстояние между соседними оптическими срезами по вертикальной оси 2.5 мкм. Усиление сигнала подбиралось динамически. Размер пикселя на оптических срезах итогового изображения составлял 1.38×1.38 мкм.

Такие настройки позволяют получать изображения, на которых видимая толщина клеточной стенки составляет 2–4 пикселя. Протяженные (40–50 мм длиной) области вдоль листа, равноудаленные от центральной жилки и края, были использованы в анализе.

Анализ изображений производили в программе ImageJ (Collins, 2007) при помощи плагина CellCounter (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>), который позволяет отмечать на изображении точки с заданным типом, а затем извлекать их координаты. В рядах, в норме содержащих устьица (см. рис. 1, в), были отмечены элементы клеточного паттерна: устьичные комплексы и обычные клетки эпидермиса. Зона стрессового воздействия была разбита на отрезки длиной по 2 мм, включающие около 20 элементов клеточного паттерна в каждом изучаемом продольном ряду. Для отрезков оценивались частоты нормальных и нарушенных элементов клеточной архитектуры. В качестве контрольной зоны использовали отрезок листа длиной 4 мм, который сформировался до воздействия холодового стресса. На каждом отрезке вычисляли медиану, 0.25 и 0.75 квантили, минимальное и максимальное наблюдаемые значения. Отдельно были оценены соотношения долей нарушений формирования замыкающих и обкладочных клеток устьиц. Всего для двух генотипов в работе изучено около 15000 элементов паттерна. Оценка параметров распределений, построение графиков и 3D реконструкций фрагментов листа производились с помощью стандартных функций в пакете Mathematica 10.

Результаты и обсуждение

После холодового воздействия разной длительности на стадии колошения растения сформировали предфлаговые листья нормального размера (длина 150–250 мм, ширина 8–12 мм). В процессе визуальной инспекции было установлено, что после двухдневного действия холодовых условий нет видимых изменений морфологии листа. После четырехдневного действия в предсказанной зоне (см. рис. 2) на расстоянии одной трети длины от базальной части листовой пластинки наблюдается фрагмент с видимыми нарушениями геометрии жилкования. После шести- и восьмидневного воздействия холодового стресса изучаемая зона становится более протяженной и составляет 10–25 мм. Это подтверждает, что морфогенез этой части листа проходил в стрессовых условиях. Для детального изучения частотной динамики появления нарушений морфогенеза была выбрана длительность в шесть суток. Были отобраны фрагменты листа сорта С29 и ЯП длиной 80 мм, содержащие в центре предполагаемую зону стресс-индуцированного изменения морфогенеза. Паттерн листа, наблюдаемый в эксперименте, соответствовал данным о клеточной архитектуре эпидермиса листа мягкой пшеницы. Клетки ранжированы в продольные ряды, и отдельные ряды детерминированы на образование определенных элементов паттерна – трихом и устьиц (рис. 3). Детерминированность рядов сохранялась по длине фрагмента листа, что позволило в большинстве случаев проследить динамику частот нарушений внутри каждого ряда. Несмотря на то, что наблюдаемый паттерн в условиях стресса сохраняет клеточные ряды, он искривлен

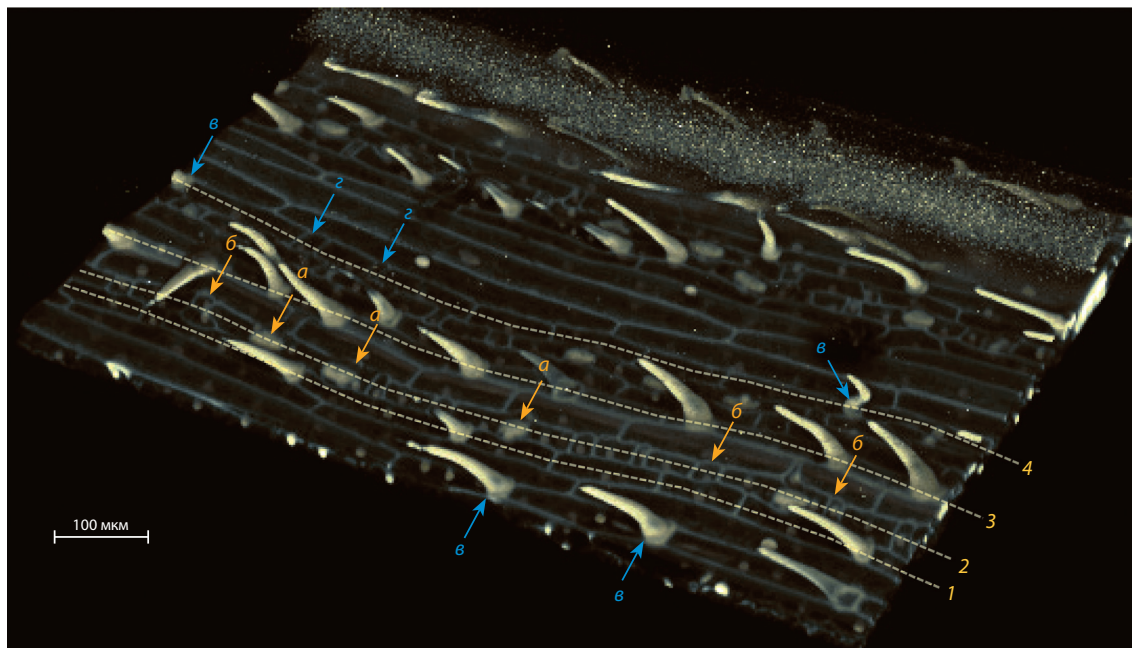


Рис. 3. Фрагмент трехмерной структуры эпидермиса листа мягкой пшеницы сорта Саратовская 29.

Реконструкция выполнена с помощью стандартных функций для визуализации 3D изображений в пакете Mathematica 10 на основе наших экспериментальных данных, полученных с использованием лазерного сканирующего микроскопа. На рисунке отмечены ряды, в норме содержащие трихомы (1, 3, 4) и устьица (2). Видны нормальные (а) и нарушенные (б) устьичные комплексы, нормальные (в) и недоразвитые (z) трихомы.

и имеет множество визуально различимых нарушений, таких как недоразвитие трихом (см. рис. 3, z) и аномалии развития устьиц (см. рис. 3, б). Жилки при этом проходят зону нарушений насквозь, изменения их числа не наблюдалось.

Были отобраны наиболее типичные фрагменты листа обоих генотипов и просканированы с нижней (адаксиальной стороны) вдоль листа +/- 25 мм от центра зоны нарушения морфологии. На расстоянии 50 мм от края зоны локализации нарушений морфогенеза в сторону кончика листа была выделена контрольная область длиной 10 мм.

Характерный паттерн эпидермиса листа пшеницы изучаемых сортов в норме представлен чередованием рядов, содержащих основные клетки, трихомы и устьица. Над жилками расположены клеточные ряды, как правило, несущие крупные трихомы. Между ними наблюдается чередование рядов, содержащих устьичные комплексы, рядов в которых наблюдаются более мелкие трихомы, а также рядов без специализированных клеток (см. рис. 3). Отметим, что эпидермис листа сорта ЯП содержит меньшее количество трихом, уступающих по размеру трихомам С29. В рядах, в норме включающих трихомы (см. рис. 3), в зоне стрессового воздействия встречаются как сформированные (остановились на стадии б4, см. рис. 1), так и несформированные трихомы (остановились на стадии б2, см. рис. 1), которые отличаются от обычных клеток эпидермиса формой и уступают им в размере (примерно в три-пять раз меньше, чем сестринские клетки трихом). При этом чередование основных клеток и трихом в соотношении 1:1 сохраняется. Однако в соседних рядах, детерминированных на формирование трихом, но об-

разовавшихся над проводящими пучками, на этом же расстоянии от основания листа таких нарушений не наблюдается. Это доказывает, что морфогенез трихом в непосредственной близости от проводящего пучка менее чувствителен к действию холодового стресса.

На рис. 4 приведены классификация нарушений морфогенеза устьиц и наблюдаемые примеры. Показана структура нормальных устьичных комплексов (см. рис. 4, а), отличающихся округлой формой и состоящих из пары замыкающих клеток, окруженных двумя обкладочными клетками (см. рис. 1, в4–в5). Они наблюдались как в контрольной области, так и в зоне, сформированной после действия стрессового фактора. В условиях стресса были зафиксированы нарушения отделения одной (см. рис. 4, б) и двух (см. рис. 4, в) обкладочных клеток, а также нарушения образования замыкающих клеток: комплексы без обкладочных клеток (см. рис. 4, z), с одной (см. рис. 4, д) и двумя обкладочными клетками (см. рис. 4, е). Следует отметить, что при нормальном морфогенезе отделение обкладочных клеток происходит раньше, чем формирование замыкающих клеток. Это говорит о том, что при нарушении самых ранних стадий развития устьиц формируется обособленный зачаток (см. рис. 4, z). При остановке на более поздних этапах наблюдается отделение обкладочных клеток (см. рис. 4, д, е). Однако для наблюдения зачатков устьиц (см. рис. 4, б, в), содержащих замыкающие клетки и неполный набор обкладочных, должно произойти разделение материнской клетки без отделения одной или обеих обкладочных клеток. Такие нарушения свидетельствуют в пользу частичной независимости генетического контроля прохождения этих этапов морфогенеза.

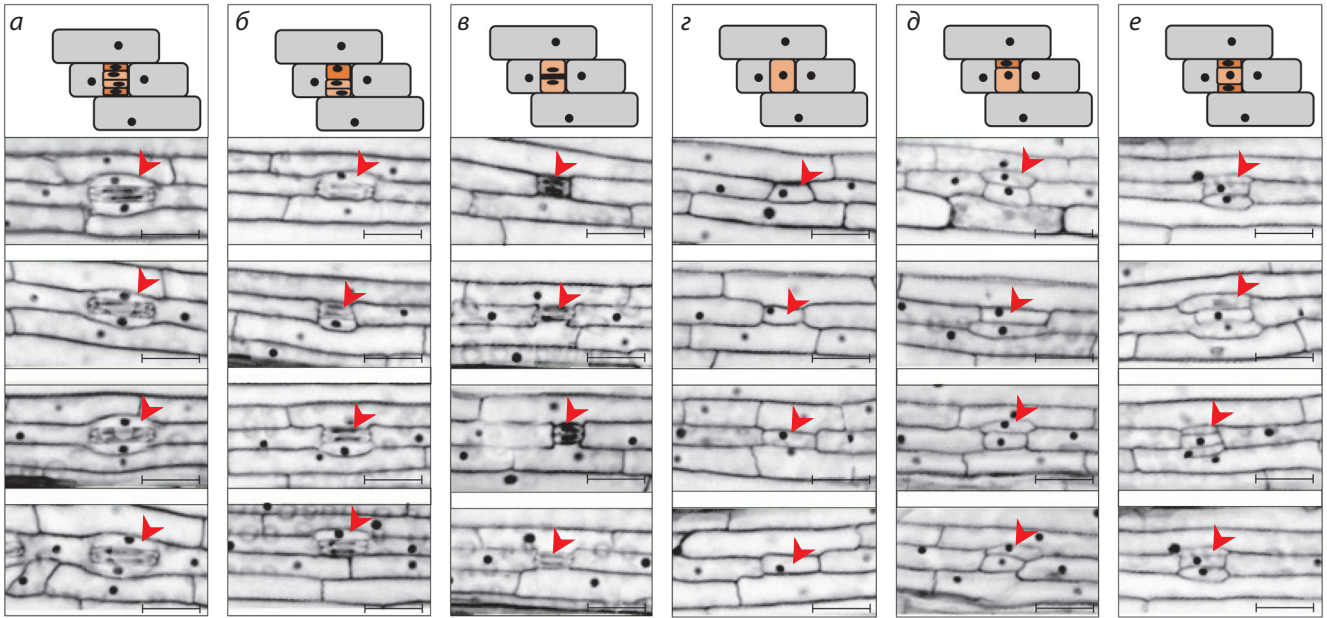


Рис. 4. Структура нормальных (а) и нарушенных (б–е) устьичных комплексов.

Приведены схемы нарушений и фрагменты микроизображения, им соответствующие. Показаны нарушения отделения одной (б) и двух (в) обкладочных клеток, нарушение образования замыкающих клеток: без обкладочных клеток (з), с одной (д) и двумя обкладочными клетками (е). Масштабная полоска – 50 мкм.

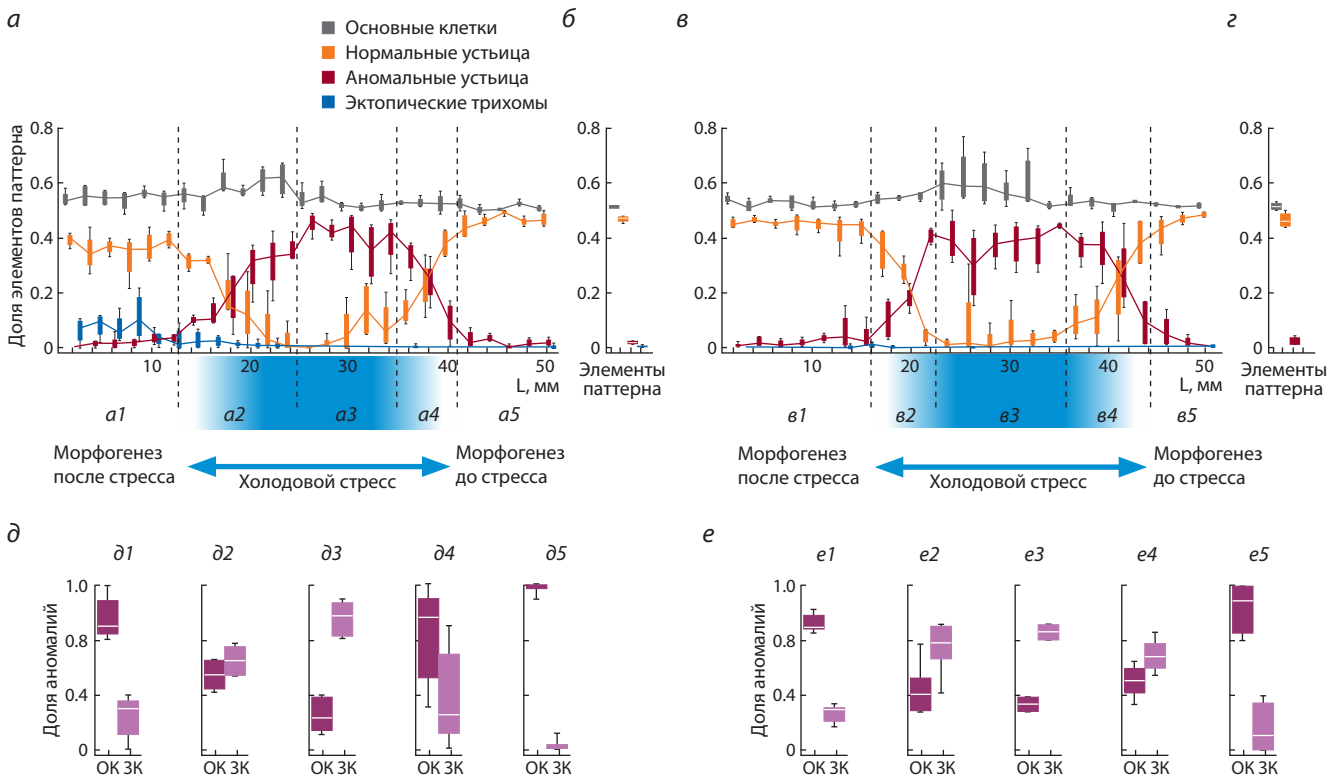


Рис. 5. Динамика изменения частот элементов паттерна эпидермиса листа мягкой пшеницы сортов Саратовская 29 (а, б, д) и Янецкии Пробат (в, г, е) вдоль клеточных рядов, в норме содержащих устьица.

Динамика приведена вдоль фрагментов листьев, подвергнутых стрессу (а, в), и контрольных участков (б, г). Ниже представлены соотношения нарушений формирования замыкающих (ЗК) и обкладочных (ОК) клеток (д, е). Соотношения нарушений для фрагментов листа (а1–а5) показаны на диаграммах (д1–д5), соотношения для фрагментов листа (в1–в5) – на диаграммах (е1–е5) соответственно. Для всех точек приведены диаграммы размаха, на которых горизонтальная линия обозначает медиану, границы прямоугольника – 0.25 и 0.75-квантили, границы интервалов – минимальное и максимальное значения выборки. На диаграммах (а) и (в) точки, соответствующие медианам распределений для одинаковых элементов паттерна на соседних отрезках, соединены линией.

Для количественного анализа была оценена динамика распределения нарушений в рядах, детерминированных на образование устьиц, вдоль оси роста листа для образцов сортов С29 (рис. 5, а) и ЯП (см. рис. 5, в). В рядах, в норме содержащих устьица (см. рис. 1, в), были отмечены следующие элементы паттерна:

- основные клетки (вытянутые клетки без отличительных морфологических особенностей, расположенные между устьицами);
- трихомы;
- нормальные устьичные комплексы;
- устьичные комплексы с нарушением морфогенеза обкладочных клеток:
 - нарушения отделения одной обкладочной клетки;
 - нарушения отделения обеих обкладочных клеток;
 - деформированные устьичные комплексы, содержащие дополнительные обкладочные клетки;
- устьичные комплексы с нарушением морфогенеза замыкающих клеток:
 - без обкладочных клеток (наблюдается как неразделенная материнская клетка);
 - с одной из обкладочных клеток (наблюдается как неразделенная материнская клетка);
 - с двумя обкладочными клетками (наблюдается как неразделенная материнская клетка).

На рис. 5, а–г показаны распределения относительных долей основных клеток эпидермиса, нормальных и аномальных устьичных комплексов, а также эктопических трихом. Данные приведены как вдоль изучаемых фрагментов, содержащих зону действия холодого стресса (см. рис. 5, а, в), так и для контрольных областей (см. рис. 5, б, г).

На контрольных графиках (см. рис. 5, б, г) наблюдается чередование основных клеток и нормальных устьиц в соотношении 1 : 1 (отдельные частоты около 0.5). Для обоих генотипов аномальные устьичные комплексы и эктопические трихомы в норме не выявляются. При рассмотрении динамики изменения этих частот вдоль оси роста листа (см. рис. 5, а, в) было показано, что существует зона листа, в которой доля нормальных устьичных аппаратов ниже доли нарушенных устьичных аппаратов (см. рис. 5, а2–а4). Здесь расположены устьичные комплексы с нарушениями на разных этапах развития (см. рис. 4). Протяженность этой зоны для образцов разных генотипов была схожа – для сорта С29 она была 22 мм (см. рис. 5, а от точки 18 мм до точки 38 мм включительно), а для ЯП – 24 мм (см. рис. 5, в от точки 20 мм до точки 42 мм включительно). Эта зона отражает реакцию на холодого стресс. В качестве маркера стрессового ответа выступает доля аномалий в развитии устьичных аппаратов относительно общего количества элементов паттерна клеточного ряда. При этом начало воздействия стресса характеризуется уменьшением доли нормально сформированных устьичных аппаратов за счет роста количества нарушений. На отрезке, сформировавшемся в условиях холода, практически все образовавшиеся устьица имели аномалии, а после возвращения к нормальной температуре их доля постепенно снизилась к уровню до воздействия стресса.

В правой части графика (в направлении кончика листа) в обоих случаях находится зона, сформировавшаяся до

наступления стрессовых условий (см. рис. 5, а5). Здесь наблюдается уровень частот элементов паттерна эпидермиса, соответствующий контролю. Левее (в сторону базальной части листовой пластинки) расположена зона, которая, предположительно, формировалась после действия стресса (см. рис. 5, а1). Частота элементов паттерна эпидермиса в этой зоне у обоих исследованных генотипов также стремится к контрольному уровню. Однако у сорта С29 отмечены существенные отличия. Так, доля устьиц в этой зоне составляет 0.36 (см. рис. 5, а1), что ниже контрольного уровня (0.47) (см. рис. 5, б). В изучаемых клеточных рядах наблюдаются эктопические трихомы со средней частотой около 0.1. В зонах, сформированных до и во время стресса, их частота близка к нулю (см. рис. 5, а). Таким образом, для сорта С29 после действия холодого стресса в изученных клеточных рядах снизилась доля устьиц, частично за счет эктопических трихом. Следует отметить, что появление эктопических трихом обнаружено нами для сорта С29, но не наблюдается для сорта ЯП. Возможно, это связано с особенностями регуляции формирования трихом у этих двух сортов. ЯП формирует меньшее число трихом и практически исключительно вдоль подлежащих проводящих пучков, а сорт С29 образует трихомы в некоторых рядах между проводящими пучками в норме. Для обоих листьев чередование элементов паттерна внутри продольных рядов устьице/основная клетка сохраняется на протяжении всего фрагмента, поэтому доля основных клеток остается стабильной на уровне 0.5.

Отдельно были проанализированы нарушения формирования замыкающих и обкладочных клеток устьиц по выделенным зонам (см. рис. 5, д, е). Важно отметить, что нарушение морфогенеза обкладочных клеток способно приводить к формированию частично функционального устьица, тогда как при нарушении морфогенеза замыкающих клеток функция полностью утрачивается. Показано, что в зоне максимального проявления стрессового воздействия (см. рис. 5, д, е; средние графики) в обоих случаях достоверно ($p < 0.005$) преобладают нарушения замыкающих клеток, тогда как в зонах, сформированных до и после стрессового воздействия, достоверно преобладают нарушения морфогенеза обкладочных клеток (см. рис. 5, д, е, боковые графики). Таким образом, в паттерне, сформированном в стрессовых условиях, преобладают аномальные устьица, функция большей части из которых утрачена.

Заключение

Клеточный паттерн эпидермиса листа злаков, содержащий специализированные клетки, которые легко наблюдать, широко используется в качестве модельной системы для изучения морфогенетических процессов (Peterson et al., 2010; Yang, Ye, 2013). В настоящей работе показано, что при создании стрессовых условий во время стационарного роста листа мягкой пшеницы наблюдается значительное изменение параметров клеточной архитектуры: нарушаются морфогенез трихом, формирование устьичных комплексов. Расположение зоны влияния холодого стресса, рассмотренного в нашей работе, предсказуемо, визуально дифференцируемо и позволяет получать как качествен-

ные, так и количественные характеристики нарушений морфогенеза специализированных клеток. Преимущество предложенного подхода – в качестве контрольной зоны можно использовать фрагмент этого же листа, удаленный от зоны стрессового воздействия в сторону кончика листа, морфогенез которого на момент стрессового воздействия завершен. Это позволяет нивелировать влияние различий в условиях выращивания отдельных растений и работать с гетерогенными выборками: гибридами, полевыми образцами и т.д. Применение предлагаемого метода дает возможность получать стандартизованные качественные и количественные оценки о стресс-индуцированных нарушениях морфогенеза в эпидермисе листа пшеницы. В дальнейшем эти данные будут важны для верификации компьютерных моделей морфогенеза листа. При подборе соответствующих условий метод может быть использован на других однонаправленных растущих органах растений, прежде всего листьях злаков, и при других видах стрессов.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-44-543384 р_мол_а). Авторы благодарны ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений» СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=142>) за предоставление посевных площадей, ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование (микроскопы ZEISS LSM 780 NLO и ZEISS Axioskop 2 plus), а также ЦКП «Биоинформатика» СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=127>) за возможность использования вычислительных ресурсов и пакета Mathematica 10 (при поддержке бюджетного проекта № 0324-2018-0017). Авторы благодарят Т.А. Пшеничникову и Н.Л. Подкольного за ценные замечания при подготовке статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

Венжик Ю.В., Титов А.Ф., Таланова В.В., Мирославов Е.А., Котеева Н.К. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодной адаптации. Цитология. 2012;54(12):916-924. Доступно на http://www.tsitologiya.cytspb.rssi.ru/54_12/venzhik.pdf. [Venzhik J.V., Titov A.F., Talanova V.V., Miroslovov E.D., Koteeva N.K. Structural and functional reorganization of photosynthetic apparatus in cold adaptation of wheat plants. Tsitologiya = Cytology (St.-Petersburg). 2012;54(12):916-924. Available at http://www.tsitologiya.cytspb.rssi.ru/54_12/venzhik.pdf. (in Russian)]
Дорошков А.В., Пшеничникова Т.А., Афонников Д.А. Анализ особенностей морфологии и наследования опушения листа

пшеницы *Triticum aestivum* L. с помощью компьютерных методов фенотипирования. Генетика. 2011;47(6):836-841. [Doroshkov A.V., Pshenichnikova T.A., Afonnikov D.A. Morphological characterization and inheritance of leaf hairiness in wheat (*Triticum aestivum* L.) as analyzed by computer-aided phenotyping. Russ. J. Genet. 2011;47(6):739-743. DOI 10.1134/S1022795411060093.]
Chater C.C., Caine R.S., Fleming A.J., Gray J.E. Origins and evolution of stomatal development. Plant Physiol. 2017;174(2):624-638. DOI 10.1104/pp.17.00183.
Collins T.J. ImageJ for microscopy. Biotechniques. 2007;43(Suppl. 1): 25-30. DOI 10.2144/000112517.
Dale J.E., Stacciarini Seraphin E., Sattin M. The effects of root cooling on leaf growth. Eds. W.J. Davies, B. Jeffcoat. Importance of Root to Shoot Communication in the Responses to Environmental Stress. Bristol, UK: British Society for Plant Growth Regulation, 1990;21: 149-161. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19920754078>.
Doroshkov A.V., Afonnikov D.A., Dobrovolskaya O.B., Pshenichnikova T.A. Interactions between leaf pubescence genes in bread wheat as assessed by high throughput phenotyping. Euphytica. 2016;207(3):491-500. DOI 10.1007/s10681-015-1520-2.
Gallagher K., Smith L.G. Roles for polarity and nuclear determinants in specifying daughter cell fates after an asymmetric cell division in the maize leaf. Curr. Biol. 2000;10(19):1229-1232. DOI 10.1016/S0960-9822(00)00730-2.
Hepworth C., Caine R.S., Harrison E.L., Sloan J., Gray J.E. Stomatal development: focusing on the grasses. Curr. Opin. Plant Biol. 2018; 41:1-7. DOI 10.1016/j.pbi.2017.07.009.
Limin A.E., Fowler D.B. Inheritance of cell size in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to the vernalization loci. Theor. Appl. Genet. 2001;103(2-3):277-281. DOI 10.1007/s00122-001-0550-4.
Liu T., Ohashi-Ito K., Bergmann D.C. Orthologs of Arabidopsis thaliana stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. Development. 2009;136(13):2265-2276. DOI 10.1242/dev.032938.
Matias-Hernández L., Aguilar-Jaramillo A.E., Cigliano R.A., Sanseverino W., Pelaz S. Flowering and trichome development share hormonal and transcription factor regulation. J. Exp. Bot. 2015;67(5):1209-1219. DOI 10.1093/jxb/erv534.
Peterson K.M., Rychel A.L., Torii K.U. Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. The Plant Cell. 2010;22(2):296-306. DOI 10.1105/tpc.109.072777.
Rudall P.J., Chen E.D., Cullen E. Evolution and development of monocot stomata. Am. J. Bot. 2017;104(8):1122-1141. DOI 10.3732/ajb.1700086.
Skinner R.H., Nelson C.J. Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. Crop Sci. 1995;35(1):4-10. DOI 10.2135/cropsci1995.0011183X003500010002x.
Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell. 2002;14(Suppl. 1):S165-S183. DOI 10.1105/tpc.000596.
Yadav S.K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. Agron. Sustain. Dev. 2010;30(3):515-527. DOI 10.1051/agro/2009050.
Yang C., Ye Z. Trichomes as models for studying plant cell differentiation. Cell. Mol. Life Sci. 2013;70(11):1937-1948. DOI 10.1007/s00018-012-1147-6.

ORCID ID

U.S. Zubairova orcid.org/0000-0002-0730-9145