

Опушение листа у картофеля *Solanum tuberosum*: морфология, функциональная роль и методы исследования

А.В. Дорoshков^{1, 2}, Д.А. Афонников^{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

Опушение – один из важных биотических факторов защиты растений от повреждающих факторов среды. Интерес к изучению опушения картофеля связан преимущественно с тем, что оно играет заметную роль в защите растений от насекомых-вредителей. Обзор посвящен функциональной роли и генетическому контролю опушения листьев у картофеля. Рассматриваются морфологические особенности опушения картофеля, которое состоит из несекретирующих и секретирующих трихом нескольких типов. Соотношение трихом разных типов у разных видов картофеля отличается большим разнообразием, характерным в первую очередь для дикорастущих видов. Опушение может служить классифицирующим признаком. Описана роль трихом как «фабрик» вторичных метаболитов картофеля, среди которых сложные эфиры сахарозы и терпеновые производные, служащие репеллентами насекомых. Трихомы также синтезируют полифенолоксидазу, которая за счет окисления фенолов приводит к синтезу метаболитов, вредных для насекомых. Представлена информация об известных в настоящее время генах, ответственных за контроль опушения. Это гены, участвующие в формировании комплекса MYB-bHLH-WD40, который контролирует процессы дифференцировки и развития трихом у растений. У картофеля белки этого комплекса изучаются прежде всего в связи с регуляцией биосинтеза антоцианов. Фундаментальной основой для идентификации генов, контролирующих опушение картофеля, в настоящее время являются данные о последовательности полного генома картофеля. Это позволяет на основе анализа гомологии с генами модельных организмов идентифицировать гены-кандидаты, контролирующие важные признаки у картофеля. Работы в этом направлении уже ведутся, однако они находятся на начальном этапе. В заключительном разделе обзора описаны методы фенотипирования трихом, основанные на визуальном анализе микроскопических изображений (полученных с помощью как оптических, так и электронных микроскопов). Показана актуальность разработки новых высокопроизводительных подходов к изучению морфологии этого признака у картофеля.

Ключевые слова: картофель; опушение листа; трихомы; защита от вредителей; фенотипирование.


КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дорoshков А.В., Афонников Д.А. Опушение листа у картофеля *Solanum tuberosum*: морфология, функциональная роль и методы исследования. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):46-53. DOI 10.18699/VJ18.327

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Doroshkov A.V., Afonnikov D.A. Leaf hairiness in potato *Solanum tuberosum*: morphology, function and methods of analysis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):46-53. DOI 10.18699/VJ18.327 (in Russian)

Leaf hairiness in potato *Solanum tuberosum*: morphology, function and methods of analysis

A.V. Doroshkov^{1, 2}, D.A. Afonnikov^{1, 2} 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Pubescence is one of the important biotic factors in plants related to protection from stressful environmental factors. In potato, the interest in the study of pubescence is associated primarily with the fact that it plays a significant role in the protection of plants from insect pests. The review focuses on the functional role and genetic control of leaf pubescence in potato. The review describes morphological features of pubescence of potatoes, which consists of simple and glandular trichomes of several types. The ratio of trichomes of different types in potato species potato is diverse, especially for wild species. Therefore, the pubescence may serve as a classifying trait. The role of trichomes as "factories" of secondary metabolites of potatoes, among which are the esters of sucrose and terpene derivatives that serve as insect repellents. Trichomes also synthesize polyphenol oxidases, which lead to the biosynthesis of compounds which are harmful to the insects. The review presents information about the currently known genes responsible for pubescence. These are genes involved in the formation of a complex of MYB-bHLH-WD40, which controls the differentiation and development of trichomes in plants. The proteins of this complex in potatoes are primarily studied in connection with the regulation of the biosynthesis of anthocyanins. The fundamental basis for identification of genes controlling pubescence in potato is currently sequence data from complete genome sequencing. By analysis of homology with the genes of model organisms, it allows candidate genes that control important traits in potato to be identified. Work in this direction is already underway, but at the initial stage. In the final section, the review describes the methods of phenotyping trichomes, based on the visual analysis of microscopic images (obtained both with optical and electron microscopes). The urgency of developing new high-performance approaches to the study of the morphology of the trait in potatoes has been demonstrated.

Key words: potato; leaf hairiness; trichomes; protection from pests; phenotyping.

Опущение листовой пластинки растений формируется за счет поверхностных образований – трихом. Это один из адаптивных признаков растений, отвечающий за взаимодействие со внешней средой. Он складывается из нескольких характеристик – морфологии трихом, их размеров, плотности (число трихом на единицу поверхности листа). Трихомы бывают несекретирующие и секретирующие (депонирующие и/или выделяющие секрет). Первые участвуют в формировании микроклимата у поверхности листа, в защите от неблагоприятных биотических и абиотических факторов среды. В частности, опушение рассеивает избыточную солнечную энергию и увеличивает эффективность фотосинтеза (Morales et al., 2002; Liakopoulos et al., 2006). В холодный период опушение регулирует температуру листа, приближая ее к оптимальной (Ehleringer, Mooney, 1978). Также трихомы могут физически препятствовать движениям растительных членистоногих и поеданию тканей растения (Cardoso, 2008; Pott et al., 2012).

Особый интерес представляют секретирующие (или железистые) трихомы, найденные на поверхности листовой пластинки многих видов растений (примерно у 30 % всех сосудистых растений). Такие трихомы способны синтезировать, хранить и выделять большое количество специализированных метаболитов, многие из которых важны для приготовления лекарственных средств, ароматизаторов, пищевых добавок и природных пестицидов (Wagner, 1991; Duke et al., 2000; Wagner et al., 2004). Железистые трихомы развивались главным образом как оружие для защиты от патогенных насекомых и микроорганизмов (Glas et al., 2012).

У пасленовых (Solanaceae), к которым относится картофель *Solanum tuberosum* L., опушение листа представлено широким спектром многоклеточных, обычно не ветвистых трихом разного размера (Luckwill, 1943; Tingey et al., 1982).

В середине прошлого века было опубликовано подробное морфологическое описание разных типов трихом для томата (*Solanum lycopersicon*, соврем. син.: *Lycopersicon esculentum*) (Luckwill, 1943), растения которого даже на фоне остальных представителей сем. Пасленовые характеризуются очень большим разнообразием типов трихом. Трихомы томата различаются по размеру, морфологии и химическому составу секретируемых веществ, что свидетельствует о разной их функциональной нагруженности:

- тип I – секретирующие трихомы с многоклеточным основанием, длинной (~2 мм) многоклеточной ножкой и небольшим железистым кончиком;
- тип II – короткие (0.2–1.0 мм) несекретирующие трихомы, характеризующиеся многоклеточным основанием;
- тип III – короткие (0.2–1.0 мм) несекретирующие трихомы, характеризующиеся одноклеточным основанием;
- тип IV – более короткие (~0.3 мм) трихомы, которые имеют одноклеточное основание, многоклеточный стебелек, короче, чем у типа I, и небольшой железистый кончик;
- тип V – короткие (0.1–0.3 мм) несекретирующие трихомы с одноклеточным основанием;
- тип VI – трихомы, характеризующиеся четырехклеточной железистой головкой на короткой (~0.1 мм) многоклеточной ножке;

– тип VII – короткие трихомы (<0.05 мм), состоящие из одноклеточной ножки и железы неправильной формы, включающей от 4 до 8 секретирующих клеток (Luckwill, 1943).

Основные классы вторичных метаболитов, которые способны производить железистые трихомы, – это терпеноиды (Gershenzon, Dudareva, 2007), фенилпропены (Gang et al., 2001), флавоноиды (Treutter, 2006), метилкетоны (Fridman et al., 2005), ацильные сахара (Kroumova, Wagner, 2003).

С использованием методов электронной микроскопии были описаны детальные различия в форме и поверхности трихом разных видов рода *Solanum* (Edmonds, 1982). Авторами отмечено большое разнообразие изученных видов по этому признаку, различия в соотношении трихом разных типов и отсутствие секретирующих трихом у некоторых видов. Кроме того, выявлено меж- и внутривидовое разнообразие не только по соотношению трихом разного типа, но и по химическому составу их содержимого (Schilmiller et al., 2008). Например, для дикого вида томата *S. pennellii* характерно присутствие ацетилированных форм сахаров в железистых трихомах типа IV, тогда как в трихомах культурных форм томата подобные соединения отсутствуют (Luckwill, 1943; Antonius, 2001).

Помимо вторичных метаболитов, трихомы многих видов пасленовых способны производить разнообразные белки с защитными функциями, такие как ингибиторы протеаз (Liu et al., 2006), полифенолоксидазы (Yu et al., 1992) и филлопанины (Shepherd et al., 2005). Ингибиторы протеаз, вероятно, снижают эффективность пищеварения вредителей, питающихся листьями, замедляя их развитие (Glas et al., 2012). Синтез ингибиторов протеаз и других защитных веществ может быть как постоянным, так и индуцироваться в ответ на поранение (Tian et al., 2012). Полифенолоксидазы представляют собой класс ферментов, которые экспрессируются в ответ на различные повреждающие факторы растений (Jukanti, 2017). В частности, они обеспечивают окисление моно- и О-дифенолов до О-дигидрооксихинонов, которые могут связываться с аминокислотами в кишечнике насекомых, тем самым снижая их питательную ценность. В норме разные представители этого ферментативного класса хранятся в лейкопластах трихом I, IV и VI типа у томата, тогда как фенольные субстраты присутствуют в вакуолях соответствующих клеток трихом. При повреждении трихом компартменты разрушаются и соответствующие фенольные производные ферментативно окисляются до хинонов. Эти хиноны обладают высокой реакционной способностью и связываются с -NH₂ и -SH группами биологических молекул (Thiyyarong et al., 1997). Наличие такой системы повышает устойчивость не только к насекомым, но также к поражению бактериальными (например, *Pseudomonas syringae* (Li, Steffens, 2002)) и грибными патогенами (например, *Peronospora tabacina*) за счет ингибирования развития спор у последних (Shepherd et al., 2005).

Было показано, что мутация томата hairless (hl), вызывающая образование дефектных (искривленных или увеличенных) трихом, уменьшает содержание полифенольных и терпеновых соединений в них (Kang et al., 2010).

Эти соединения играют важную роль в защите от насекомых-паразитов (например, *Manduca sexta* на стадии гусеницы и бабочки).

Морфология опушения листа картофеля

Трихомы, формирующие опушение листа у картофеля, по своей морфологии сходны с трихомами, описанными у других видов пасленовых, однако конкретные характеристики опушения у разных видов могут существенно различаться. М.А. Сизова (1965) провела систематический анализ особенностей опушения у картофеля 102 видов. Автор характеризует опушение четырьмя типами трихом. Первый тип – это простые волоски, различающиеся по длине и толщине. На их стенках имеется отложение кутикулы, которое определяет жесткость трихомы. Остальные три типа трихом представлены секреторирующими волосками. Первый тип секреторирующих трихом похож на простые трихомы; различие заключается в том, что они содержат на вершине одноклеточную железку. Такой тип трихом встречается очень редко, лишь у одного из изученных видов – *S. berthaultii*. Второй тип секреторирующих трихом характеризуется железкой округлой формы, состоящей из четырех секреторирующих клеток. Нижележащая клетка является ножкой трихомы. У некоторых видов такой тип трихом преобладает. Третий тип секреторирующих трихом включает головку из шести клеток, расположенных в три ряда. Ножка такой трихомы сформирована одной клеткой, которая почти всегда изогнута. Автор отмечает, что различным видам свойственно опушение с определенным типом трихом, так что эта характеристика может служить систематическим признаком. Степень опушения сильно варьирует в зависимости от условий произрастания, но соотношение типов волосков можно считать постоянным признаком.

В этой же работе (Сизова, 1965) для двух видов *S. tarijense* и *S. pinnatisectum* исследовалась изменчивость опушения в процессе развития листьев. В результате наблюдений оказалось, что проростки *S. tarijense* в период появления семядолей имеют опушение, не свойственное взрослому растению. Отличия касаются преимущественно соотношения трихом разного типа, а сходство с опушением у взрослого растения наступает лишь на 10-й день после всходов. Таким образом, разные типы трихом формируются в разное время. Например, железистые трихомы, содержащие головку из четырех клеток, появляются только в момент формирования устьиц листа, тогда как трихомы других типов формируются на более ранних стадиях развития листа. Анализ расположения трихом на начальной стадии формирования листа показал, что волоски иницируются в основном вблизи проводящих тканей, ближе к формирующейся главной жилке.

В работе (McCauley, Evert, 1988) у сорта Russet Burbank было отмечено наличие секреторирующих трихом с секреторирующей головкой из четырех клеток, а также более крупных несекреторирующих многоклеточных трихом.

При изучении ультраструктуры трихом сорта картофеля Bintje установлено наличие двух типов секреторирующих трихом, различающихся по структуре (Lyshede, 1980). Первый тип имеет восьмиклеточную шаровидную головку на одноклеточной ножке. Железистые клетки, составляю-

щие головку, содержат множество вакуолей, крупное ядро, многочисленные рибосомы и митохондрии, несколько телец Гольджи и потемневшие хлоропласты. Пластиды в основном расположены вблизи осевой стенки клетки, граничащей с центральным межклеточным пространством, заполненным секретом. Предполагается, что пластиды участвуют в формировании секрета. Наружная стенка покрыта тонкой кутикулой (Lyshede, 1980). Второй тип имеет булавовидные многоклеточные головки, также на одноклеточной ножке. Клеточные особенности подобны описанным для трихом предыдущего типа, за исключением того, что железистые клетки несут одну большую центральную вакуоль и пластиды, распределенные по всей клетке. Объемное межклеточное пространство заполнено секретом (Lyshede, 1980).

Установлено, что трихомы этих двух типов различаются по составу содержащихся в них соединений (Lyshede, 1980). Короткие железистые трихомы с круглой головкой (в англоязычной литературе их часто называют «тип А» (Gibson, 1971)) содержат фенольные соединения (Avé, Tingey, 1986). Более длинные железистые трихомы с булавовидной головкой (тип В) содержат сложные эфиры сахарозы (Neal et al., 1990). Следует отметить, что для большинства культурных форм картофеля, в отличие от диких видов, характерны трихомы типа А и крупные трихомы без булавовидной головки и не содержащие характерного для трихом типа В секрета (см. рисунок) (Tingey, Laubengayer, 1981; Tingey et al., 1982; McCauley, Evert, 1988; Kowalski et al., 1992).

Защитная роль опушения листовой пластинки у культурных форм картофеля и их диких сородичей

У возделываемых форм картофеля опушение – один из важных факторов сопротивления растения насекомым (Gregory et al., 1986; Flanders et al., 1992), в частности картофельной блохе, картофельной цикадке, колорадскому жуку (Maharijaya, Vosman, 2015), а также тлям (Радченко, 2017). Известно, что генетическое разнообразие возделываемых культур с течением времени снижается и может быть повышено за счет использования диких сородичей как источника селекционно значимых аллелей.

В исследовании (Tingey et al., 1982) выявлено, что опушение дикого картофеля *Solanum berthaultii* Hawkes., устойчивого к поражению насекомыми и распространенного в Южной Америке, отличается от опушения сортов *S. tuberosum* не только по количественным характеристикам, но и по морфологии трихом (см. рисунок). Можно заметить, что количество трихом дикого сородича в разы больше, чем у культурного сорта. Как известно, плотность расположения трихом является одним из основных факторов, коррелирующих с устойчивостью к насекомым-вредителям (Kennedy, 2003; Simmons, Gurt, 2005). Одновременно с этим у дикого вида картофеля наблюдается два разных типа (А и В) головчатых (секреторирующих) трихом (см. рисунок, б), тогда как у культурной формы обнаружен тип А секреторирующих трихом и многоклеточные трихомы без головки (см. рисунок, а). Установлено, что секреторирующие трихомы обоих типов (А и В) совместно обеспечивают более эффективную защиту от тли *Myzus*

persicae (Sulzer), чем один только тип А (Tingey, Laubengayer, 1981), а также противодействуют широкому спектру насекомых-вредителей, таких как картофельный мотылек *Phthorimaea operculella* Zell., бобовая цикадка *Empoasca fabae* Harris., жук-листоед *Epitrix cucumeris* Harris. и др. (Neal et al., 1991).

Секрет трихом типа А способен обездвиживать мелких членистоногих, способствуя их гибели (Gibson, Turner, 1977). Это происходит вследствие быстрой полимеризации секрета трихомы, содержащего полифенолоксидазу, после повреждения в результате контакта с насекомыми (Kowalski et al., 1992). Было показано, что содержимое трихом *S. tuberosum* не проявляет полифенолоксидазной активности (Kowalski et al., 1992).

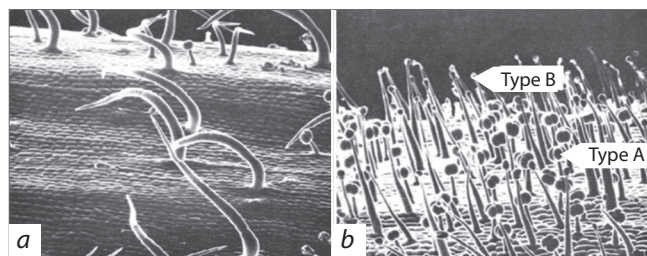
Более длинные железистые трихомы типа В выделяют сложные эфиры сахарозы и терпеновые производные, которые являются репеллентами и способствуют гибели насекомых, в частности тлей и гусениц, оказывающихся на поверхности листа (Neal et al., 1990; Kang et al., 2010). Интересно, что содержащийся в этих трихомах (Е)- β -фарнезин противодействует тле *M. persicae* не только напрямую, но и опосредованно, привлекая тлевых наездников *Diaeretiella rapae* (Gibson, Pickett, 1983; Weale et al., 2006). Кроме того, наличие густого железистого опушения типа В противодействует поражению растений колорадским жуком (Фасулати и др., 2011).

Методами масс-спектрометрии проведен сравнительный анализ состава секрета диких видов картофеля, устойчивых к колорадскому жуку и восприимчивых к поражению им (*S. tarijense*, *S. oplocense*, *S. piurae*, *S. acroglossum*, *S. chomatophilum*, *S. paucissectum*), а также культурных форм (Tai et al., 2014). Авторы определили наборы метаболитов, отличающие эти группы устойчивости к колорадскому жуку, и показали ключевое влияние глюкоалкалоидов, гидроксикумарина и фенилпропаноидов, содержащихся в трихомах большинства диких видов и отсутствующих у *S. tuberosum*.

Генетико-селекционные исследования признака «опушение листовой пластинки» картофеля

Плотное опушение железистыми трихомами (см. рисунок), эффективное в защите от вредителей, распространено среди диких видов картофеля и рассматривается как перспективный признак для интрогрессии в культурные формы (Фасулати и др., 2011). Особенности опушения могут быть успешно перенесены между видами *S. tuberosum* и *S. berthaultii* и впоследствии использованы при создании сортов картофеля, устойчивых к насекомым-вредителям (Tingey et al., 1982).

Для комплексной устойчивости картофеля к насекомым-вредителям были выявлены локусы количественных признаков (QTL) при использовании картирующей популяции *S. tuberosum* \times *S. berthaultii* (с двумя беккроссами), генотипированной при помощи RFLP-маркеров (restriction fragments length polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) (Bonierbale et al., 1994). При этом авторы идентифицировали локусы комплексной устойчивости к насекомым-вредителям, ассоциированные с плотностью трихом и их защитными характеристиками: активностью полифенолоксидазы и синтезом слож-



Scanning electron micrographs of leaf hairiness in (a) Hudson cultivar and (b) the wild potato species *S. berthaultii* (Tingey et al., 1982).

ного эфира сахарозы в трихомах типа А и В, а также реакцией ферментативного потемнения.

Однако при переносе в сорта картофеля генетического материала диких сороридичей вместе с полезными признаками (в том числе защитным опушением листовой пластинки) происходит коселекция нежелательных признаков, от которых необходимо избавляться путем дальнейших скрещиваний и уменьшения доли чужеродного хроматина в геноме культурных форм картофеля. Для того чтобы не проходить этот путь каждый раз, создаются интрогрессивные линии, несущие только желаемые признаки, унаследованные от диких сороридичей, которые могут широко применяться в селекции сортов. Одной из первых удачных линий, унаследовавших опушение от «дикаря» *S. berthaultii*, была линия NYL 235-4 (Plaisted et al., 1992).

В результате секвенирования генома картофеля (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011) были расшифрованы последовательности ДНК его хромосом. Это позволило идентифицировать гены-кандидаты, контролирующие важные селекционные признаки, на основе сходства их последовательностей с уже известными генами модельных организмов, таких как *Arabidopsis thaliana*. Для *A. thaliana* гены, контролирующие инициацию и рост трихом, изучены достаточно подробно. Они формируют генную сеть, включающую как пути передачи сигналов от фитогормонов (An et al., 2011), так и регуляторные гены (Hauser, 2014). Известно, что положительная регуляция роста трихом у *A. thaliana* обеспечивается регуляторным комплексом MYB-bHLH-WD40, включающим белок WD40 (TTG1), три транскрипционных фактора (ТФ) MYB, принадлежащих к классу R2R3 (GL1, MYB23, MYB5) и четыре ТФ, относящихся к классу bHLH (GL3, EGL3, TT8, MYC-1) (Hauser, 2014). Комплекс MYB-bHLH-WD40 связывается с регуляторным районом белка GLABRA2 (GL2, ТФ класса «гомеодомен»), который активирует процессы эндоредупликации, ветвления и созревания клеточной стенки, необходимые для формирования трихом. К числу негативных регуляторов роста трихом относятся ТФ класса MYB типа R3 *A. thaliana* – CPC, TRY, ETC1, ETC2, ETC3 и TCL1, TCL2. Несмотря на наличие полногеномных данных, семейства указанных транскрипционных факторов у картофеля охарактеризованы недостаточно полно. Классификация по типу ДНК-связывающих доменов для последовательностей ТФ картофеля существует в базе данных транскрипционных факторов растений PlantTFDB

(Jin et al., 2017), однако для более точного определения функциональной роли этих генов необходим детальный анализ и сопоставление с гомологами из других таксонов. Такой анализ проведен в работе (Wang et al., 2018) для транскрипционных факторов картофеля класса bHLH, к которым относятся положительные регуляторы GL3 (идентификатор базы данных TAIR AT5G41315), EGL3 (AT1G63650), TT8 (AT4G09820), MYC-1 (AT4G00480). Филогенетический анализ последовательностей белков bHLH, представленных у *A. thaliana* и *S. tuberosum*, показал, что все указанные выше транскрипционные факторы bHLH *A. thaliana* попадают в группу L, а их ближайшими гомологами у картофеля являются белки StbHLH97 и StbHLH93 (Wang et al., 2018).

Необходимо отметить, что комплекс MYB-bHLH-WD40 у растений участвует не только в регуляции формирования и роста трихом, но также в экспрессии генов биосинтеза антоцианов (Li, 2014). Это одна из причин активного исследования транскрипционных факторов, вовлеченных в формирование данного комплекса у картофеля (Стрыгина, Хлесткина, 2017). В работе (Рауавула et al., 2013) для гомолога белка TTG1 у картофеля, StWD40, было обнаружено, что уровень его экспрессии значимо положительно коррелирует с содержанием фенолпропаноидов в клубнях картофеля. На основе филогенетического анализа последовательностей были определены гомологи для транскрипционных факторов *A. thaliana* GL3 и EGL3 – StbHLH2 и TT8 – StbHLH1, а также продемонстрирована их экспрессия в клубнях картофеля (Рауавула et al., 2013).

В исследовании (Liu et al., 2016) анализировались функциональные различия активаторов биосинтеза антоцианов картофеля AN1, MYBA1 и MYB113. Авторы приводят филогенетические деревья для последовательностей семейства TF bHLH, связанных с биосинтезом антоцианов у картофеля и других видов, на которых в кластер, содержащий последовательность белка *A. thaliana* TT8, попадает последовательность картофеля StbHLH1, а в кластер, который содержит последовательность TF *A. thaliana* GL3, попадает StJAF13. Дифференциальная экспрессия генов в клубнях трех сортов с разной окраской мякоти (красной, темно-пурпурной и белой) исследовалась в работе (Cho et al., 2016) при помощи широкомасштабного РНК-секвенирования. Среди генов, демонстрирующих дифференциальную экспрессию, в этих образцах оказались гены, кодирующие белки StbHLH1 и StWD40. Анализ генов, ассоциированных с биосинтезом антоцианов у картофеля, демонстрирует функциональную роль белков комплекса MYB-bHLH-WD40, связь их экспрессии с изменением окраски как клубней, так и листьев картофеля. Однако при реконструкции системы генов, контролирующей опушение, к этим данным необходимо относиться с осторожностью. Только широкомасштабный анализ полного набора белковых последовательностей картофеля и идентификация ортологов могут быть надежной основой для поиска генов-кандидатов, вовлеченных в контроль опушения листа. Такой анализ актуален и для остальных элементов регуляторной сети контроля опушения у картофеля, которые в настоящее время остаются слабо изученными.

Применение современных геномных технологий позволило изучить генетический контроль биосинтеза со-

единений, накапливающихся внутри трихом (Tissier, 2012). Это дало возможность вносить изменения в состав секрета трихом методами селекции и геномной инженерии (Glas et al., 2012). В связи с тем, что трихомы частично изолированы от всего организма растения и имеют специфическую структуру регуляторных областей генов, контролирующую их развитие (Wang et al., 2002), они становятся перспективной основой для создания систем, производящих разный набор вторичных метаболитов, в том числе токсичных для самого растения. На модельных организмах достигнуты успехи в повышении защитных свойств путем изменения уровня экспрессии генов (Wang et al., 2001; Glas et al., 2012). Подобные технологии в перспективе могут служить для создания устойчивых к большинству вредителей сортов картофеля, что позволит свести на нет необходимость применения инсектицидов для сохранения урожая.

Методы оценки характеристик трихом картофеля

Опушение листовой пластинки картофеля обладает двумя составляющими, значимыми для направленной селекции: морфологической (типы трихом, их количество) и биохимической (содержащиеся в трихомах вещества).

Для оценки содержания тех или иных веществ применяют химический анализ или масс-спектрометрию (Tai et al., 2014). Это трудоемкие процедуры, позволяющие достаточно точно оценить состав секретирующих трихом. Однако множество данных свидетельствует в пользу того, что состав секрета трихом во многом определяется их морфологией (Tingey et al., 1982; Antonius, 2001; Kang et al., 2010), поэтому для целей высокопроизводительного фенотипирования в широкомасштабных проектах возможно применять критерии, основанные на оценке морфологического типа трихом.

Для описания морфологии трихом широко используется сканирующая электронная микроскопия (Edmonds, 1982; Tingey et al., 1982; McCauley, Evert, 1988). Этот метод позволяет детально описать каждую трихому, оценить форму и взаимное расположение клеток основания и головки, особенности поверхности (Edmonds, 1982). Вместе с тем у метода есть ограничения, связанные со скоростью обработки образцов, и он требует весьма дорогостоящего оборудования, поэтому не подходит для массового анализа.

Традиционным является применение световой микроскопии (Luckwill, 1943; Channarayana et al., 1992). Этот метод прост и позволяет отличать основные типы трихом друг от друга, а также оценивать их количество и расположение.

При широкомасштабной селекционной работе возникает дополнительная задача, связанная с ускорением и оптимизацией всех процессов анализа генотипа и фенотипа. При этом для трихом картофеля разработаны системы комплексного фенотипирования с помощью спектрометрических подходов (Cobb et al., 2013). Однако они не учитывают признаки трихом достаточно подробно. Наоборот, морфология трихом может вносить шум в ряд измеряемых характеристик (Araus, Cairns, 2014).

Была предложена технология быстрой количественной оценки характеристик опушения у картофеля для задач

генетики и селекции этой культуры, основанная на получении и компьютерной обработке контрастных изображений сгиба листа. Предложенная технология описания опушения поверхности листа картофеля с помощью программы LHDetect2 (Genaev et al., 2012) позволяет провести оценку числа трихом и их длины (Дорошков и др., 2016а). В этой технологии на данный момент отсутствует распознавание типа трихомы, однако в связи с тем, что размеры трихом разных типов у картофеля значительно различаются, есть возможность оценить их косвенно по размеру.

Предложенный метод оценки количественных характеристик опушения листовой пластинки картофеля показал высокую производительность. С его помощью получены количественные характеристики опушения листьев для 35 сортов картофеля, выделены сорта, имеющие наиболее интенсивное опушение (Великан, Танай, Кемеровчанин, Танго) (Дорошков и др., 2016б).

Заключение

Трихомы картофеля являются передовой линией обороны против растительноядных насекомых и возбудителей болезней. На настоящем этапе развития селекции этой культуры в рамках классических селекционных программ, а также методов геномной инженерии возможно более широкое вовлечение данного признака с целью создания наиболее подходящих характеристик опушения для усиления защиты растений от вредителей. Применение современных геномных методов породило большой массив данных о генетических основах развития трихом и биосинтеза различных соединений, содержащихся в их секрете. В связи с тем что существует ассоциация между морфологией трихом и их защитной ролью, должна проводиться широкомасштабная селекционная работа с использованием методов высокопроизводительного фенотипирования морфологии трихом.

Acknowledgments

This work was supported by the state program on bioresource collections at the ICG, Novosibirsk (State Budgeted Project 0324-2017-0001 «Inventory and development of the GenAgro collection»).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

An L., Zhou Zh., Yan A., Gan Y. Progress on trichome development regulated by phytohormone signaling. *Plant Signaling Behav.* 2011; 6(12):1959-1962. DOI 10.4161/psb.6.12.18120.

Antonious G.F. Production and quantification of methyl ketones in wild tomato accessions. *J. Environ. Sci. Health. Pt. B.* 2001;36(6):835-848. DOI 10.1081/PFC-100107416.

Araus J.L., Cairns J.E. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends Plant Sci.* 2014;19(1):52-61. DOI 10.1016/j.tplants.2013.09.008.

Avé D.A., Tingey W.M. Phenolic constituents of glandular trichomes on *Solanum berthaultii* and *S. polyadenium*. *Am. Potato J.* 1986; 63(9):473-480. DOI 10.1007/BF02852942.

Beale M.H., Birkett M.A., Bruce T.J., Chamberlain K., Field L.M., Huttly A.K., Martin J.L., Parker R., Phillips A.L., Pickett J.A., Prosser I.M., Shewry P.R., Smart L.E., Wadhams L.J., Woodcock C.M., Zhang Y. Aphid alarm pheromone produced by transgen-

ic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(27):10509-10513. DOI 10.1073/pnas.0603998103.

Bonierbale M.W., Plaisted R.L., Pineda O., Tanksley S.D. QTL analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1994;87(8):973-987. DOI 10.1007/BF00225792.

Cardoso M.Z. Herbivore handling of a Plant's trichome: the case of *Heliconius charithonia* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Passiflora lobata* (Killip) Hutch. (Passifloraceae). *Neotrop. Entomol.* 2008;37(3):247-252. DOI 10.1590/S1519-566X2008000300002.

Channarayappa C., Shivashankar G., Muniyappa V., Frist R.H. Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. *Can. J. Bot.* 1992;70(11):2184-2192. DOI 10.1139/b92-270.

Cho K., Cho K.S., Sohn H.B., Ha I.J., Hong S.Y., Lee H., Kim Y.M., Nam M.H. Network analysis of the metabolome and transcriptome reveals novel regulation of potato pigmentation. *J. Exp. Bot.* 2016; 67(5):1519-1533. DOI 10.1093/jxb/erv549.

Cobb J.N., De Clerck G., Greenberg A., Clark R., McCouch S. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(4):867-887. DOI 10.1007/s00122-013-2066-0.

Doroshkov A.V., Genaev M.A., Afonnikov D.A. A protocol for analysis of the quantitative characteristics of leaf pubescence in potato. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016a;20(6):863-868. DOI 10.18699/VJ16.218. (in Russian)

Doroshkov A.V., Simonov A.V., Safonova A.D., Afonnikov D.A., Lihenko N.E., Kolchanov N.A. Estimation of quantitative characteristics of potato leaf hairiness using microscopic image analysis. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2016b;30(3):12-14. (in Russian)

Duke S.O., Canel C., Rimando A.M., Telle M.R., Duke M.V., Paul R.N. Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. *Adv. Bot. Res.* 2000;31:121-151. DOI 10.1016/S0065-2296(00)31008-4.

Edmonds J.M. Epidermal hair morphology in *Solanum* L. section *Solanum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 1982;85(3):153-167. DOI 10.1111/j.1095-8339.1982.tb02583.x.

Ehleringer J., Mooney H.A. Leaf hairs: Effects on physiological activity and adaptive value to a desert shrub. *Oecologia.* 1978;37(2):183-200. DOI 10.1007/BF00344990.

Fasulati S.R., Ivanova O.V., Rogozina E.V. Complex resistance to Colorado potato beetle, 28-spotted potato ladybird, and potato golden cyst nematode in potato. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine.* 2011;10(1):14-17. (in Russian)

Flanders K.L., Hawkes J.G., Radcliffe E.B., Lauer F.I. Insect resistance in potatoes: sources, evolutionary relationships, morphological and chemical defenses, and ecogeographical associations. *Euphytica.* 1992;61(2):83-111. DOI 10.1007/BF00026800.

Fridman E., Wang J., Iijima Y., Froehlich J.E., Gang D.R., Ohlrogge J., Pichersky E. Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell.* 2005;17(4):1252-1267. DOI 10.1105/tpc.104.029736.

Gang D.R., Wang J., Dudareva N., Nam K.H., Simon J.E., Lewinsohn E., Pichersky E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* 2001;125(2):539-555. DOI 10.1105/tpc.104.029736.

Genaev M.A., Doroshkov A.V., Pshenichnikova T.A., Kolchanov N.A., Afonnikov D.A. Extraction of quantitative characteristics describing wheat leaf pubescence with a novel image-processing technique. *Planta.* 2012;236(6):1943-1954. DOI 10.1007/s00425-012-1751-6.

Gershenzon J., Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 2007;3(7):408-414. DOI 10.1038/nchembio.2007.5.

- Gibson R.W. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. *Ann. Appl. Biol.* 1971;68(2):113-119. DOI 10.1111/j.1744-7348.1971.tb06448.x.
- Gibson R.W., Pickett J.A. Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. *Nature.* 1983;302(5909):608-609. DOI 10.1038/302608a0.
- Gibson R.W., Turner R.H. Insect-trapping hairs on potato plants. *PANS.* 1977;23(3):272-277.
- Glas J.J., Schimmel B.C., Alba J.M., Escobar-Bravo R., Schuurink R.C., Kant M.R. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(12):17077-17103. DOI 10.3390/ijms131217077.
- Gregory P., Tingey W.M., Ave D.A., Bouthyette P.Y. Potato glandular trichomes: a physicochemical defense mechanism against insects. In: Green M.B., Hedin P.A. (Eds.). *Natural Resistance of Plants to Rests.* Vol. 296. Washington City: Am. Chem. Soc., 1986;160-167. DOI 10.1021/bk-1986-0296.ch013.
- Hauser M.T. Molecular basis of natural variation and environmental control of trichome patterning. *Front. Plant Sci.* 2014;5:320. DOI 10.3389/fpls.2014.00320.
- Jin J.P., Tian F., Yang D.C., Meng Y.Q., Kong L., Luo J.C., Gao G. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D1040-D1045. DOI 10.1093/nar/gkw982.
- Jukanti A. *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants.* Singapore: Springer, 2017. DOI 10.1007/978-981-10-5747-2.
- Kang J.H., Shi F., Jones A.D., Marks M.D., Howe G.A. Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *J. Exp. Bot.* 2010;61(4):1053-1064. DOI 10.1093/jxb/erp370.
- Kennedy G.G. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annu. Rev. Entomol.* 2003;48(1):51-72. DOI 10.1146/annurev.ento.48.091801.112733.
- Kowalski S.P., Eannetta N.T., Hirzel A.T., Steffens J.C. Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiol.* 1992;100(2):677-684. DOI 10.1104/pp.100.2.677.
- Kroumova A.B., Wagner G.J. Different elongation pathways in the biosynthesis of acyl groups of trichome exudate sugar esters from various solanaceous plants. *Planta.* 2003;216(6):1013-1021. DOI 10.1007/s00425-002-0954-7.
- Li L., Steffens J.C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta.* 2002;215(2):239-247. DOI 10.1007/s00425-002-0750-4.
- Li S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis. *Plant Signal. Behav.* 2014;9(1):275-282. DOI 10.4161/psb.27522.
- Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Klouvatou A., Vekkos K.-A., Manetas Y., Karabourniotis G. The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Ann. Bot.* 2006;98(1):257-265. DOI 10.1093/aob/mcl097.
- Liu J., Xia K.-F., Zhu J.-C., Deng Y.-G., Huang X.-L., Hu B.-L., Xu X., Xu Z.-F. The nightshade proteinase inhibitor IIb gene is constitutively expressed in glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.* 2006;47(9):1274-1284. DOI 10.1093/pcp/pcj097.
- Luckwill L. *The Genus Lycopersicon: Historical, Biological, and Taxonomic Survey of the Wild and Cultivated Tomatoes.* Aberdeen, Scotland: Aberdeen Univ. Press, 1943.
- Lyshede O.B. The ultrastructure of the glandular trichomes of *Solanum tuberosum*. *Ann. Bot.* 1980;46(5):519-526. DOI 10.1093/oxfordjournals.aob.a085949.
- Maharajaya A., Vosman B. Managing the Colorado potato beetle; the need for resistance breeding. *Euphytica.* 2015;204 (3):487-501. DOI 10.1007/s10681-015-1467-3.
- McCauley M.M., Evert R.F. Morphology and vasculature of the leaf of potato (*Solanum tuberosum*). *Am. J. Bot.* 1988;75(3):377-390.
- Morales F., Abadia A., Abadia J., Montserrat G., Gil-Pelegrin E. Trichomes and photosynthetic pigment composition changes: responses of *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. and *Quercus coccifera* L. to Mediterranean stress conditions. *Trees.* 2002;16(7):504-510. DOI 10.1007/s00468-002-0195-1.
- Neal J.J., Plaisted R.L., Tingey W.M. Feeding behavior and survival of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), larvae on *Solanum berthaultii* Hawkes and an F₆ *S. tuberosum* L. × *S. berthaultii* hybrid. *Am. Potato J.* 1991;68(10):649-658. DOI 10.1007/BF02853740.
- Neal J.J., Tingey W.M., Steffens J.C. Sucrose esters of carboxylic acids in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* deter settling and probing by green peach aphid. *J. Chem. Ecol.* 1990;16(2):487-497. DOI 10.1007/BF01021780.
- Plaisted R.L., Tingey W.M., Steffens J.C. The germplasm release of NYL 235-4, a clone with resistance to the Colorado potato beetle. *Am. Potato J.* 1992;69(12):843-846. DOI 10.1007/BF02854192.
- Pott C., McLoughlin S., Wu S., Friis E.M. Trichomes on the leaves of *Anomozamites villosus* sp. nov. (Bennettitales) from the Daohugou beds (Middle Jurassic), Inner Mongolia, China: Mechanical defence against herbivorous arthropods. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 2012;169:48-60. DOI 10.1016/j.revpalbo.2011.10.005.
- Payyavula R.S., Singh R.K., Navarre D.A. Transcription factors, sucrose, and sucrose metabolic genes interact to regulate potato phenylpropanoid metabolism. *J. Exp. Bot.* 2013;64(16):5115-5131. DOI 10.1093/jxb/ert303.
- Radchenko E.E. Aphid resistance in potato. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektitsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(1):74-82. DOI 10.18699/VJ17.225. (in Russian)
- Schillmiller A.L., Last R.L., Pichersky E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J.* 2008;54(4):702-711. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2008.03432.x.
- Shepherd R.W., Bass W.T., Houtz R.L., Wagner G.J. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. *Plant Cell.* 2005;17(6):1851-1861. DOI 10.1105/tpc.105.031559.
- Simmons A.T., Gurr G.M. Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agric. For. Entomol.* 2005;7(4):265-276. DOI 10.1111/j.1461-9555.2005.00271.x.
- Sizova M.A. Potato leaf pubescence as a taxonomic character. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektitsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding.* 1965;37(3):109-128. (in Russian)
- Strygina K.V., Khlestkina E.K. Anthocyanin synthesis in potato (*Solanum tuberosum* L.): genetic markers for smart breeding. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2017;52(1):37-49. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.37rus. (in Russian)
- Tai H.H., Worrall K., Pelletier Y., De Koeber D., Calhoun L.A. Comparative metabolite profiling of *Solanum tuberosum* against six wild *Solanum* species with Colorado potato beetle resistance. *J. Agric. Food Chem.* 2014;62(36):9043-9055. DOI 10.1021/jf502508y.
- The Potato Genome Sequencing Consortium. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature.* 2011;475(7355):189. DOI 10.1038/nature10158.
- Thipyapong P., Joel D.M., Steffens J.C. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiol.* 1997;113(3):707-718. DOI 10.1104/pp.113.3.707.
- Tian D., Tooker J., Peiffer M., Chung S.H., Felton G.W. Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta.* 2012;236(4):1053-1066. DOI 10.1007/s00425-012-1651-9.
- Tingey W.M., Laubengayer J.E. Defense against the green peach aphid and potato leafhopper by glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *J. Econ. Entomol.* 1981;74(6):721-725. DOI 10.1093/jee/74.6.721.
- Tingey W.M., Plaisted R.L., Laubengayer J.E., Mehlenbacher S.A. Green peach aphid resistance by glandular trichomes in *Solanum tuberosum* × *S. berthaultii* hybrids. *Am. Potato J.* 1982;59(6):241-251. DOI 10.1007/BF02856560.
- Tissier A. Trichome specific expression: promoters and their applications. In: Çiftçi Y.O. (Ed.). *Transgenic Plants – Advances and Limitations.* InTech, 2012;353-378.

- Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 2006;4(3):147-157. DOI 10.1007/s10311-006-0068-8.
- Wagner G.J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.* 1991;96(3):675-679. DOI 10.1104/pp.96.3.675.
- Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann. Bot.* 2004;3(11):3-11. DOI 10.1093/aob/mch011.
- Wang E., Gan S., Wagner G.J. Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. *J. Exp. Bot.* 2002;53(376):1891-1897. DOI 10.1093/jxb/erf054.
- Wang E., Wang R., DeParasis J., Loughrin J.H., Gan S., Wagner G.J. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat. Biotechnol.* 2001;19(4):371-374. DOI 10.1038/86770.
- Wang R., Zhao P., Kong N., Lu R., Pei Y., Huang C., Ma H., Chen Q. Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes.* 2018;9(1):54. DOI 10.3390/genes9010054.
- Yu H., Kowalski S.P., Steffens J.C. Comparison of polyphenol oxidase expression in glandular trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* species. *Plant Physiol.* 1992;100(4):1885-1890. DOI 10.1104/pp.100.4.1885.