

Регуляция биосинтеза стероидных гликоалкалоидов картофеля

К.А. Иванова , С.В. Герасимова, Е.К. Хлесткина

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

Стероидные гликоалкалоиды (СГА) картофеля составляют часть иммунитета растений. Некоторые их модифицированные формы токсичны для человека. В ходе domestikации картофеля происходил отбор растений с пониженным уровнем СГА. В настоящее время с появлением методов, при помощи которых возможно специфично влиять на регуляцию метаболических путей, появляется перспектива преодолеть нежелательную прямую взаимосвязь между устойчивостью картофеля к вредителям и токсичностью его клубней. Однако для таких целенаправленных тонких изменений необходимы глубокие знания о регуляторной сети биосинтеза СГА картофеля. Цель обзора – обобщить сведения об известных генах биосинтеза СГА у растений, суммировать данные об исследовании этих генов у картофеля, а также рассмотреть механизмы защитного токсического действия СГА против патогенов и вредителей. Биосинтез СГА идет по мевалонатному пути, который реализуется в цитозоле и состоит из трех этапов. Первые два этапа относятся к синтезу первичных метаболитов и приводят к циклоартанолу и холестерину соответственно. В биосинтез вовлечены 12 ферментов, половина из которых также участвует в биосинтезе фитостероидов, являющемся ответвлением первого этапа этого метаболического пути. В листьях картофеля при избытке фитостероидов синтез переключается на СГА, повышая их содержание. В клубнях при избытке предшественников СГА происходит вовлечение их в синтез ланостерола, что позволяет поддерживать стабильность уровня СГА в этой части растений. Значимость структурных генов, кодирующих ферменты первых двух этапов биосинтеза, не позволяет рассматривать их в качестве мишеней для нокаута с целью снижения уровня СГА. Однако информация о тканеспецифичных механизмах переключения между путями синтеза СГА и других соединений, имеющих общих с СГА предшественников, может быть использована для манипуляции с тканеспецифичным уровнем стероидных гликоалкалоидов. На третьем этапе (собственно синтез гликоалкалоидов из холестерина) участвуют около 20 ферментов. В геноме картофеля идентифицировано 14 соответствующих им генов, 8 из которых детально изучены при помощи методов обратной генетики. В качестве перспективных мишеней для снижения уровня СГА в клубнях могут рассматриваться гены, кодирующие ферменты PGA (относящиеся к подсемейству CYP72 цитохром-P450-зависимых монооксигеназ, катализирующие превращение гидрохолестерина в тригидрохолестерин) и SGT (СГА-гликозилтрансферазы, осуществляющие превращение соланидина в его токсичные гликозилированные производные – α -соланин и α -хаконин). Описаны *cis*-регуляторные элементы в промоторных областях некоторых генов биосинтеза гликоалкалоидов, включая элементы, ответственные за тканеспецифичную экспрессию. Накопленные сведения служат основой для создания генотипов картофеля с тканеспецифичной регуляцией СГА, в которых при сохранении высокого

The biosynthesis regulation of potato steroidal glycoalkaloids

К.А. Ivanova , S.V. Gerasimova, E.K. Khlestkina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Potato steroidal glycoalkaloids (SGAs) compose a part of plant immunity. Some of their modified variants are toxic to humans. In the course of potato domestication, plants with a lower SGA level were selected. The advent of approaches for manipulation with the regulation of metabolic pathways provides an opportunity to overcome the undesirable direct relationship between the potato resistance to pests and the toxicity of its tubers. However, for such a fine regulation, a deep knowledge of the regulatory network of potato SGA biosynthesis is required. The purpose of this review is to summarize the information on the known SGA biosynthesis genes in plants and the results of the investigation of these genes in potato, as well as to consider the mechanisms of the SGA protective toxic action against pathogens and pests. The SGA biosynthesis is realized via the cytosolic mevalonate pathway and consists of three stages. The first two stages are required for the synthesis of primary metabolites, and lead to cycloartanol and cholesterol, respectively. Twelve enzymes are involved in the biosynthesis, and the half of them are involved in the biosynthesis of phytosterols, which is a branch of the first stage of this metabolic pathway. In the potato leaves with an excess of phytosterols, the synthesis switches to SGAs, increasing the content of the latter. In tubers, with an excess of SGA precursors, they are involved in the synthesis of lanosterol, supporting in this way the stable level of SGA. The importance of structural genes encoding the enzymes of the first two stages of biosynthesis does not allow us to consider them as a target for knockout in order to reduce the level of SGAs. However, information about the tissue-specific mechanisms of switching between the pathways of synthesis of SGA and other compounds having common precursors with SGAs can be used to manipulate the tissue-specific level of steroidal glycoalkaloids. At the third stage (the synthesis of glycoalkaloids from cholesterol), about 20 enzymes participate. In the potato genome, 14 corresponding genes were identified, 8 of which were studied in detail using reverse genetics approaches. As a promising target for reducing SGA levels in tubers, the genes encoding PGA enzymes (belonging to the CYP72 subfamily cytochrome-P450-dependent monooxygenases catalyzing the conversion of hydrocholesterol to trihydrocholesterol) and SGT (SGA glycosyltransferases that catalyze the conversion of solanidine to its toxic glycosylated derivatives α -solanine and α -chaconine) are considered. *Cis*-regulatory elements in the promoter regions of some glycoalkaloid biosynthesis genes, including elements responsible for tissue-specific expression,

уровня СГА в листьях для защиты от патогенов и вредителей будет подавляться синтез токсических веществ в клубнях.

Ключевые слова: *GAME*; *PGA*; *SGT*; *Solanum*; вторичные метаболиты; защита от патогенов и вредителей; нокаут; подавление экспрессии; регуляторные гены; стероидные гликоалкалоиды; структурные гены; тканеспецифичная экспрессия.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Иванова К.А., Герасимова С.В., Хлесткина Е.К. Регуляция биосинтеза стероидных гликоалкалоидов картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):25-34. DOI 10.18699/VJ18.328

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ivanova K.A., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. The biosynthesis regulation of potato steroidal glycoalkaloids. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):25-34. DOI 10.18699/VJ18.328 (in Russian)

Растения продуцируют широкий спектр вторичных метаболитов, биологическая роль многих из которых пока не установлена. Часть этих веществ участвует в формировании иммунитета растений, как индуцированного, при котором синтез и накопление вторичных метаболитов повышаются при контакте с патогенами или вредителями, так и конститутивного, который реализуется за счет постоянного присутствия в растениях определенных соединений. К числу последних относятся стероидные гликоалкалоиды (СГА) – биологически активные вторичные метаболиты, синтезирующиеся по холестеринному пути.

Стероидные гликоалкалоиды характерны для растений семейств Solanaceae и Liliaceae, включая возделываемые культуры (картофель, томат, баклажаны, перец и табак). Основными гликоалкалоидами картофеля являются α -соланин и α -хаконин. Для организма человека эти вещества токсичны, поэтому в ходе доместикации картофеля ключевую роль сыграл отбор мутантных форм с пониженным уровнем гликоалкалоидов. В современных селекционных программах в качестве доноров хозяйственно ценных генов (в частности, генов устойчивости к патогенам и вредителям) нередко привлекают дикие формы картофеля (Gebhardt, 2013). В этом случае важен отбор таких гибридных форм, которые, обладая устойчивостью, унаследованной от диких видов картофеля, характеризуются низким содержанием гликоалкалоидов в клубнях, допустимым для столовых сортов.

Для ускоренного отбора гибридов со сниженным уровнем гликоалкалоидов (с помощью маркер-ориентированной селекции) или нарушения их биосинтеза путем направленного мутагенеза (например, с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas) необходим точный подбор генов-мишеней, мутации в которых нарушали бы синтез модифицированных форм СГА, токсичных для организма человека, не затрагивая при этом весь спектр их предшественников, чтобы не снижать уровень неспецифического иммунитета растений картофеля.

Изучение генов, участвующих в биосинтезе СГА, представляет интерес и с точки зрения отбора/создания растений-продуцентов биологически активных веществ, которые могут использоваться в медицинских целях. Среди свойств СГА, значимых для данного направления: цито-

are described. The accumulated information provides the base for creating potato genotypes with tissue-specific regulation of SGAs, in which high levels of SGAs in leaves will remain to protect against pathogens and pests and, at the same time, the synthesis of toxic substances in tubers will be suppressed.

Key words: *GAME*; knockout; *PGA*; plant protection against pathogens and pests; *SGT*; regulatory genes; secondary metabolites; *Solanum*; steroidal glycoalkaloids; structural genes; suppression of gene expression; tissue-specific expression.

токсическое (Kenny et al., 2013), антигликемическое (Satoh, 1967), антиканцерогенное (Reddivari et al., 2010), противомаларийное (Chen et al., 2010), жаропонижающее и противовоспалительное действие (Choi, Koo, 2005; Delporte et al., 1998).

В настоящем обзоре мы обобщаем сведения об известных генах биосинтеза СГА (включая структурные гены, участвующие в биосинтезе холестерина, стероидных гликоалкалоидов, а также промежуточных продуктов этого пути, и регуляторные гены, которые определяют уровень и тканеспецифичность экспрессии структурных генов), суммируем данные об исследовании этих генов у картофеля (в том числе идентификацию соответствующих нуклеотидных последовательностей в геноме картофеля, проверку функциональной роли данных генов с помощью подходов обратной генетики), а также рассматриваем механизмы защитного токсического действия СГА против патогенов и вредителей.

Структура СГА, выделенных из картофеля

У растений картофеля идентифицировано более 80 различных гликоалкалоидов. СГА состоят из гликозидных остатков и агликона. Неполарное липофильное стероидное ядро (агликон) связано с полярным водорастворимым углеводным компонентом. Структура агликона относится, как правило, к одному из двух классов гетероциклических азотсодержащих структур, соланидану или спиросолану (рис. 1).

Эти структуры агликонов могут быть организованы в пары, каждая из которых отличается насыщенностью углерода-5 (C5, Δ 5). К классу соланиданов, например, относятся соланидин и демиссидин (рис. 2), а к классу спиросоланов – соласодин и томатиденол. Демиссидин – это соланидан, насыщенный в положении C5, а соланидин – ненасыщенный.

Как правило, в культивируемом картофеле углеводный компонент представляет собой триозы. Так, гликозиды соланидина – α -хаконин и α -соланин – отличаются только углеводным компонентом (рис. 3).

α -Хаконин содержит углеводную боковую цепь, разветвленную β -хакотриозу (бис- α -L-рамнопиранозил- β -D-глюкопиранозу), присоединенную к 3-ОН-группе соланидина, тогда как α -соланин содержит разветвленную β -солатриозу (α -L-рамнопиранозил- β -D-глюкопиранозил-

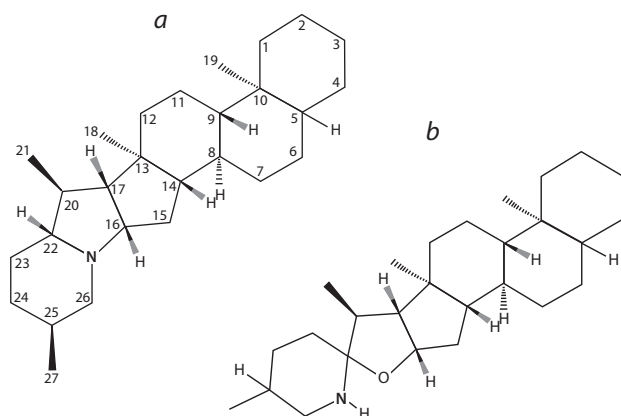


Fig. 1. Structures of two common SGA aglycones: *a*, solanidine; *b*, spirosolane.

Data on structures here and in Figs. 2 and 3 were obtained from the PUBCHEM database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

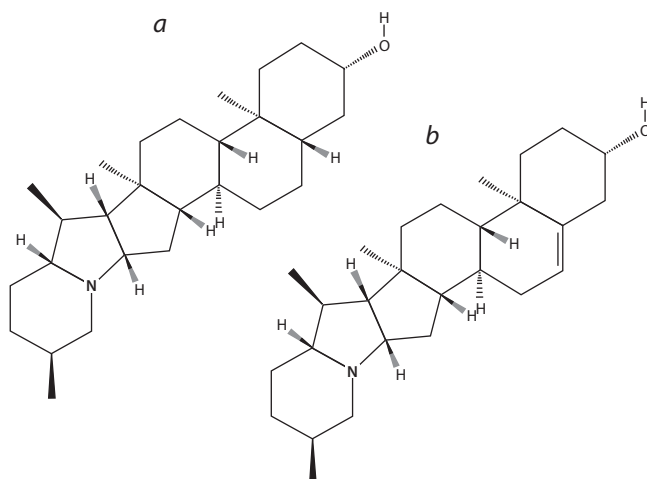


Fig. 2. Structures of solanidane-type SGA aglycones: *a*, solanidine; *b*, demissidine.

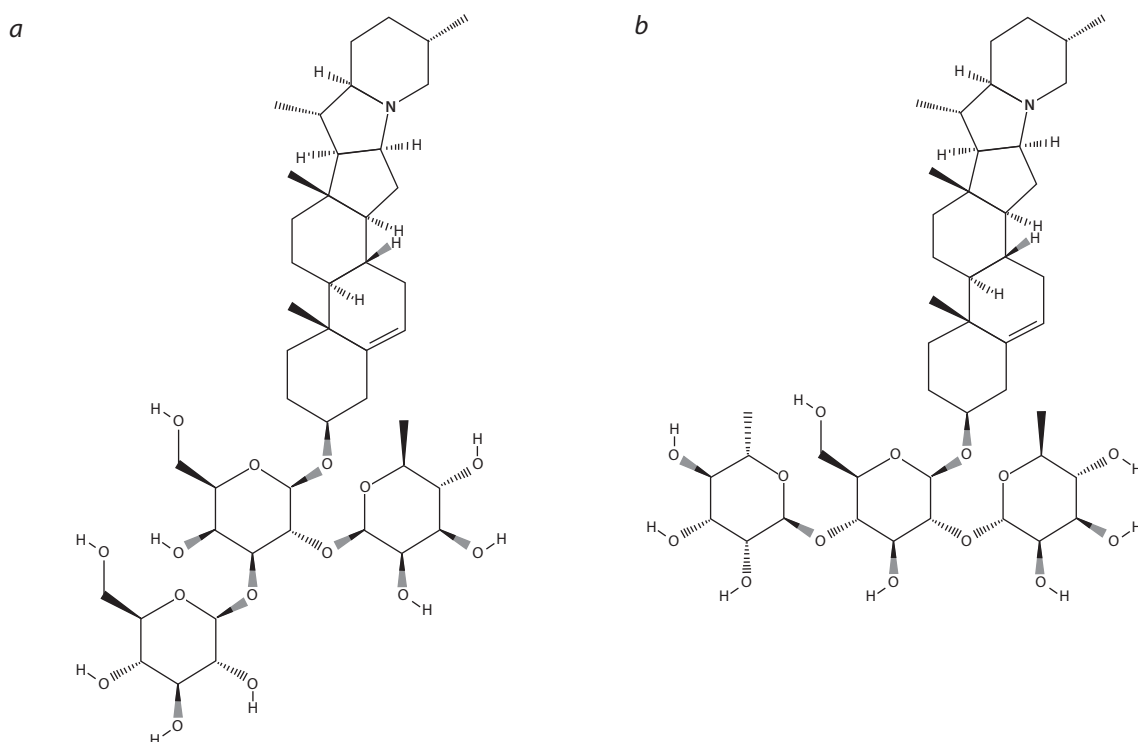


Fig. 3. Structures of glycoalkaloids involving the solanidine aglycone: *a*, α -solanine; *b*, α -chaconine.

β -галактопиранозу), тоже присоединенную к 3-ОН-группе такого же агликаона. При неполном гидролизе α -соланина и α -хаконина возможны β 1-, β 2- и γ -формы соланина и хаконина. Укороченный углеводный компонент представлен в β -формах дисахаридом, а в γ -формах – моносахаридом (табл. 1).

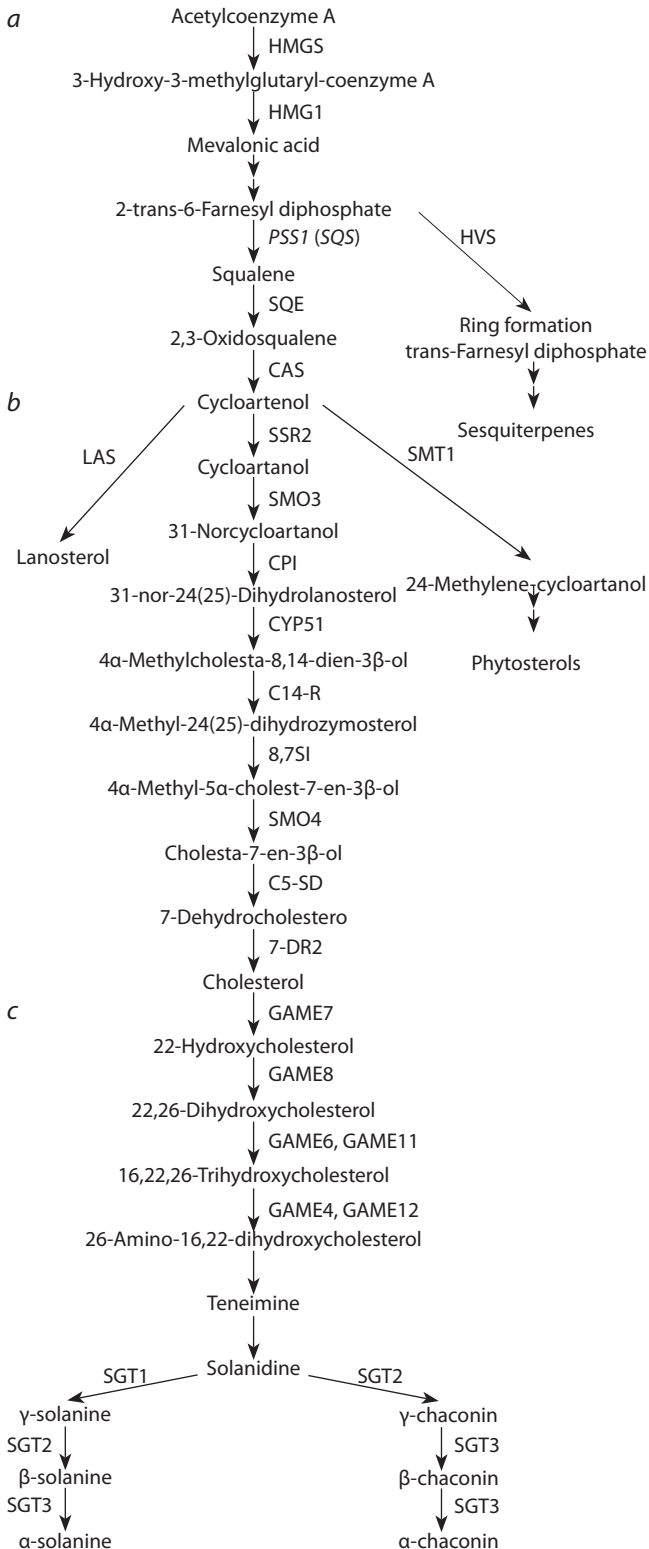
Триозные гликозиды демиссидина включают дигидрохаконин и дигидросоланин, а тетраэогликозиды – демиссин и коммерсонин. Из класса спиросоланов в растениях картофеля преобладают гликозиды соласодина – соламаргин и соласонин, которые являются двумя главными гликоалкалоидами более чем 100 видов *Solanum*. Агликон томатиденол был найден в картофельных проростках,

он может служить предшественником α -соламарина и β -соламарина (Nikolic, Stankovic, 2005; Friedman, 2006; Ginzberg et al., 2009).

К двум группам СГА, близким классу соланидана, относят лептинины (лептинидин, 23-гидрокисоланидин) и лептины (23-ацетиллептинидин), которые отличаются друг от друга модификацией в положении С23 (первые гидроксильрованы, вторые ацетилированы). Они были обнаружены у нескольких аргентинских образцов вида *Solanum chacoense* (Rangarajan et al., 2000; Ginzberg et al., 2009). Стереохимически группа 23-ОН или 23-ОАс расположена в аксиальном положении кольца. Лептинин I и лептинин II представляют собой соответствующие гли-

Table 1. Potato SGA glycosides

| Solanine | Glycone | Chaconine | Glycone |
|----------|----------------------------|-----------|---------------------------|
| α | Rhamnose–galactose–glucose | α | Rhamnose–glucose–rhamnose |
| β1 | Galactose–glucose | β1 | Glucose–rhamnose |
| β2 | Rhamnose–galactose | β2 | Rhamnose–glucose |
| γ | Galactose | γ | Glucose |



козиды хакотриозы и солатриозы лептинидина, тогда как лептин I и лептин II – это гликозиды хакотриозы и солатриозы 23-ацетиллептинидина соответственно (Friedman, 2006; Ginzberg et al., 2009).

Биосинтез СГА и промежуточные продукты биосинтеза

Биосинтез СГА идет по мевалонатному пути, который реализуется в цитозоле и состоит из трех этапов (Ginzberg et al., 2009; Sawai et al., 2014). Первые два этапа относятся к синтезу первичных метаболитов и приводят к циклоартанолу и холестерину соответственно. Для большинства растений, кроме семейств Solanaceae и Liliaceae, холестерин является минорным веществом. Превращения второго этапа были недавно подтверждены для растений томата (Sonawane et al., 2016). Установлено, что в биосинтезе вовлечены 12 ферментов, половина из которых (CAS, 3βHSD, SDR, CPI, CYP51, C14-R, 8,7SI) имеет низкую субстратную специфичность и участвует в метаболизме как холестерина, так и фитостеринов. Остальные ферменты (SSR2, SMO3, SMO4, C5-SD2, 7-DR2) кодируются генами, которые дублировались и дивергировали, став специфичными для каждого из этих двух путей (Sonawane et al., 2016). Третий этап относится к биосинтезу вторичных метаболитов, непосредственно гликоалкалоидов, в течение которого холестерин преобразуется ферментами семейства генов *GAME* (*GLYCOALKALOID METABOLISM*) до индивидуальных СГА.

Первый этап биосинтеза. На первом этапе ацетилКоА превращается в 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А и катализируется семейством ферментов 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктаз до мевалоновой кислоты с последующим образованием 2-транс,6-транс-фарнезилдифосфата (рис. 4, а). Трансфарнезилдифосфат

Fig. 4. Biosynthesis of steroidal glycoalkaloids (according to Itkin et al., 2013; Cárdenas et al., 2015; Sonawane et al., 2016).

(a) Step 1: primary metabolism, the mevalonate pathway of synthesis; (b) step 2: primary metabolism, the synthesis of cholesterol; (c) step 3: secondary metabolism, synthesis of glycoalkaloids.

HMGs, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase; HMG1, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; PSS1, squalene synthase; HVS, henbane vetispiradiene synthase; SQE, squalene epoxidase; CAS, cycloartenol synthase; LAS, lanosterol synthase; SMT1, sterol C24-methyltransferase; SSR2, sterol side chain reductase 2; SMO3, C-4 sterol methyloxidase 3; CPI, cyclopropyl sterol isomerase; CYP51, sterol C-14 demethylase (Cytochrome P450 Family 51); C14-R, sterol C-14 reductase; 8,7SI, sterol 8,7 isomerase; SMO4-C, 4 sterol methyloxidase 4; C5-SD, sterol C-5 (6) desaturase; 7-DR2, 7-dehydrocholesterol reductase 2; GAME7, C22 hydroxylase; GAME8, C26 hydroxylase; GAME6, C16 hydroxylase; GAME11, 2-hydroxyglutarate-dependent dioxygenase; GAME4, cytochrome P450 88D; GAME12, transaminase; SGT1, galactosyltransferase; SGT2, glucosyltransferase; SGT3, rhamnosyltransferase.

является субстратом для фермента скваленсинтазы, которая конденсирует две его молекулы в сквален. Выявлена корреляция между высоким содержанием СГА и высоким уровнем транскриптов генов этих двух ферментов (Krits et al., 2007). Фермент скваленэпоксидаза превращает сквален в 2,3-оксидосквален (Heftmann, 1983; Cárdenas et al., 2015). Циклоартенолсинтаза преобразует 2,3-оксидосквален в наиболее элементарный стерол – циклоартенол. 2,3-Оксидосквален также является субстратом для ланостеролсинтазы, которая превращает его в ланостерол, обнаруженный в листьях и побегах картофеля (Ginzberg et al., 2009).

Промежуточный продукт первого этапа – трансфарнезилдифосфат – является точкой ответвления метаболического пути, ведущего к синтезу сесквитерпенов картофеля, в том числе фитоалексинов любимицина и ришитина (Ginzberg et al., 2009).

Второй этап биосинтеза. На втором этапе редуктаза боковой цепи стерола 2 редуцирует циклоартенол до циклоартанола (см. рис. 4, б). Циклоартанол в ходе последующих реакций преобразуется в холестерин. Стеролметилоксидазы SMO3 и SMO4 этого пути работают в мультиферментативном комплексе совместно с 3 β -гидроксистероиддегидрогеназой и оксидоредуктазой (Sawai et al., 2014; Sonawane et al., 2016).

Для ферментов SMT1 и SSR2 у картофеля выявлены гены *SMT1* (Ginzberg et al., 2009) и *SSR2* (Sawai et al., 2014).

Промежуточный продукт второго этапа синтеза СГА, циклоартенол является точкой ветвления синтеза стероидов и ведет также к синтезу фитостеринов, в том числе ситостерола и кампистерола (предшественников брассиностероидов) (Sonawane et al., 2016).

Третий этап биосинтеза. Гликоалкалоиды образуются из общего предшественника холестерина (Sawai et al., 2014). Этот процесс изучен для преобладающих в растениях картофеля СГА – α -соланина и α -хаконина. Холестерин превращается в агликон – соланидин, который последовательно декорируется гликозидными цепочками с помощью гликозилтрансфераз (см. рис. 4, в). Биосинтез соланидина предполагает три последовательных окислительных превращения по С22, С26 и С16 углеродным атомам молекулы холестерина, в этих процессах участвуют гены подсемейства CYP72 цитохром-Р450-зависимых монооксигеназ, кодирующие С-22-гидроксилазу *GAME7* (цитохром Р450 72A186), С-26-гидроксилазу *GAME8* (цитохром Р450 72A208) и С-16-гидроксилазу *GAME6* (цитохром Р450 72A188); а также 2-оксоглутаратзависимая диоксигеназа *GAME11*. *GAME4* (цитохром Р450 88D) окисляет 16,22,26-тригидроксихолестерин. В добавлении атома азота участвует трансминаза *GAME12*. Два последних шага являются точкой ветвления путей синтеза СГА и безазотистых сапонинов картофеля. Последующие нуклеофильные замены посредством промежуточного соединения тенеимина могут объяснить образование соланидина (Cárdenas et al., 2015). В гликозилировании соланидина участвуют три фермента: SGT1 (гомолог *GAME1*), SGT2 и SGT3 (*GAME2*). При последовательном присоединении D-глюкозы и двух L-рамноз образуется α -хаконин; при присоединении D-галактозы, D-глюкозы и L-рамнозы – α -соланин (McCue et al., 2006, 2007; McCue, 2009).

Примечательно, что гены *GAME* организованы в кластеры и коэкспрессируются. Гены *GAME1* (*SGT1*), *GAME2* (*SGT3*), *GAME6*, *GAME7*, *GAME11* находятся в хромосоме 7, гены *GAME4* и *GAME12* – в хромосоме 12 (Itkin et al., 2013), *GAME8a* и *GAME8b* – в хромосоме 6 (Mariot et al., 2016). Обнаружено, что районы коэкспрессирующихся генов в хромосомах 7 и 12 фланкированы похожим образом аннотированными генами, идентично расположенными в геноме. Но эти гены обладают низким уровнем коэкспрессии с генами *GAME* и, вероятно, не связаны с метаболизмом СГА (Itkin et al., 2013).

Для вышеупомянутых генов *GAME* показана прямая корреляция между уровнем их экспрессии и уровнем накопления СГА, за исключением гена *GAME7*. Уровень транскриптов этого гена не изменялся при изменении количества СГА (Mariot et al., 2016).

В работе (Mariot et al., 2016) был получен транскрипционный профиль генов *GAME* и предсказано число кодируемых ими изоформ. *GAME4* кодирует одну изоформу, длина кодирующей части, состоящей из 8 экзонов, – 1614 п. о., общая длина гена – 7804 п. о. *GAME6* (4741 п. о.) представлен четырьмя изоформами, первая из которых кодируется транскриптом с одним экзоном, две – транскриптами с тремя экзонами, состав которых различен, и четвертая – транскриптом с пятью экзонами. *GAME7*, самый протяженный из всех генов *GAME* (11078 п. о.), представлен шестью изоформами, две из которых кодируются транскриптами с пятью экзонами различного состава и четыре изоформы кодируются транскриптами с одним, двумя, тремя и четырьмя экзонами соответственно. Гены *GAME8a* и *GAME8b* являются копиями на одной хромосоме и кодируют по одной изоформе. Они состоят из пяти экзонов каждый и отличаются по длине (4495 и 4545 п. о. соответственно). *GAME11* (4019 п. о.) – самый короткий из генов *GAME*, состоит из пяти экзонов и кодирует две изоформы. *GAME12* длиной 6626 п. о. состоит из 11 экзонов и кодирует одну изоформу. Гены *GAME1* (*SGT1*) и *GAME2* (*SGT3*) длиной 4095 и 4125 п. о. соответственно состоят из одного экзона и кодируют по одной изоформе.

Список генов, участвующих во всех этапах синтеза СГА, идентифицированных для картофеля, представлен в табл. 2.

Регуляция биосинтеза СГА

Содержание СГА варьирует как у различных видов, так и внутри видов рода *Solanum*. Регуляция синтеза гликоалкалоидов зависит не только от генотипа, но и от действия внешних факторов (Sinden et al., 1984). Прохладный и влажный климат, различный стресс, поранения, а также экспозиция клубней на свету повышают уровень гликоалкалоидов в растениях (Smith et al., 1996). Это подтверждается результатами исследований регуляции уровня стеролов у растений, в которой наряду с другими факторами участвует сигнальный путь жасмоновой кислоты, один из основных путей передачи сигналов при защите растений от биотического и абиотического стресса.

В промоторных районах генов *GAME* предсказаны различные цис-регуляторные элементы, связанные с биотическим и абиотическим стрессом и светозависимой активацией (Mariot et al., 2016). Кроме того, в геноме *Sola-*

Table 2. Genes for potato glycoalkaloid biosynthesis

| Gene designation | Accession no.* | Reference |
|---------------------|--|--|
| <i>HMG1</i> | Sotub02g025630 | Cárdenas et al., 2016 |
| <i>PSS1 (SQS)</i> | Sotub01g047720 | » |
| <i>SQE</i> | PGSC0003DMG400004923 | Manrique-Carpintero et al., 2013 |
| <i>CAS</i> | Sotub04g023080 KU313680 | Cárdenas et al., 2016 Kumar et al., 2017 |
| <i>LAS</i> | PGSC0003DMB000000328:43281700..43271000 | Kumar et al., 2017 |
| <i>SMT1</i> | Sotub01g025880 | Cárdenas et al., 2016 |
| <i>SSR2</i> | Sotub02g015720 PGSC0003DMG400021142 AB839750 | Cárdenas et al., 2016 Sawai et al., 2014 » |
| <i>GAME7</i> | PGSC0003DMG402012386 | Mariot et al., 2016 |
| <i>GAME8 (PGA1)</i> | PGSC0003DMG400026586 | Umamoto et al., 2016 |
| <i>GAME8a</i> | PGSC0003DMG400026594 | Mariot et al., 2016 |
| <i>GAME8b</i> | PGSC0003DMG400026586 | » |
| <i>GAME6 (PGA2)</i> | PGSC0003DMG400026594 Sotub07g016580 PGSC0003DMG400011750 | Umamoto et al., 2016 Cárdenas et al., 2016 Mariot et al., 2016 |
| <i>GAME11</i> | PGSC0003DMG400011751 Sotub07g016570 | Mariot et al., 2016 Cárdenas et al., 2016 |
| <i>GAME4</i> | PGSC0003DMG400024274 Sotub12g011090 | Mariot et al., 2016 Cárdenas et al., 2016 |
| <i>GAME12</i> | PGSC0003DMG400024281 Sotub12g011080 | Mariot et al., 2016 Cárdenas et al., 2016 |
| <i>GAME1 (SGT1)</i> | Sotub07g016600 PGSC0003DMG400011749 STU82367 | Cárdenas et al., 2016 Mariot et al., 2016 McCue et al., 2017 |
| <i>SGT2</i> | DQ218276 PGSC0003DMG400017508 | McCue et al., 2017 Manrique-Carpintero et al., 2013 |
| <i>GAME2 (SGT3)</i> | Sotub07g016550 PGSC0003DMG400011740 | Cárdenas et al., 2016 Mariot et al., 2016 |
| <i>GAME9</i> | Sotub01g029510 PGSC0003DMG400025989 | Cárdenas et al., 2016 » |
| <i>StLAS-like</i> | KU313679 | Kumar et al., 2017 |

* Accession numbers follow the databases GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Spud DB (Hirsch et al., 2014), and POTATO GENOMICS RESOURCE (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu>).

num tuberosum был идентифицирован транскрипционный фактор *GAME9*, член семейства AP2/ERF (APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTORS), регулирующий биосинтез СГА, а также активность нескольких генов биосинтеза предшественников СГА – мевалоната и холестерина. В растениях картофеля ген *GAME9* коэкспрессируется с *GAME2*, *GAME11*, *GAME6*, *GAME1*, *GAME12* и *GAME4*, а также с геном *SSR2*. В районе локализации гена *GAME9* в хромосоме 1 картофеля был выявлен QTL (quantitative trait locus – локус количественного признака), связанный с высоким уровнем СГА в клубнях (Cárdenas et al., 2016). На растениях *Solanum lycopersicum* показано, что *GAME9* – это первичный транскрипционный фактор в сигнальном пути жасмоновой кислоты через рецепторный комплекс, одним из компонентов которого является белок CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) (Abdelkareem et al., 2017).

После этапа биосинтеза с участием *CAS* и образованием циклоартенола наступает важная точка регуляции пути, в которой контролируется расхождение синтеза первичных метаболитов фитостеринов (доминирующий путь) и вторичных метаболитов СГА. Циклоартенол – основной предшественник фитостеринов и СГА. Избыток конститутивных фитостеринов в листьях растений картофеля компенсируется превращением предшественника (циклоартенола) в СГА, без подавления экспрессии генов, участвующих в синтезе циклоартенола (Kumar et al., 2017). В отличие от регуляции в листьях, в мякоти клубней при участии специфического для них фермента *StLAS-like* избыточные промежуточные продукты превращаются в ланостерол, из которого, в свою очередь, могут образовываться лишь следовые количества СГА (Sawai et al., 2006; Kumar et al., 2017). Такой механизм переключения

синтеза с циклоартенола на ланостерол позволяет поддерживать низкий уровень гликоалкалоидов в клубнях. В промоторной области гена *StLAS-like* были найдены цис-элементы, которые обеспечивают непосредственно тканеспецифичную экспрессию. Показано существенное различие в уровнях транскрипции этого гена в разных тканях, причем наиболее высокий уровень транскрипции отмечен в мякоти клубней. Также в его промоторе были обнаружены элементы, свойственные промоторам структурных генов синтеза СГА и связанные с их активацией с помощью фактора транскрипции GAME9. Кроме того, промотор *StLAS-like* содержит элементы, связанные с активацией в ответ на стресс, воздействие гормонами и светом. Предполагается, таким образом, что путь биосинтеза ланостерола у растений ведет к синтезу вторичных метаболитов, задействованных в защите растений от действия стрессовых факторов (Kumar et al., 2017).

Манипуляции с генами СГА

Большинство работ, в которых проводились манипуляции с генами, вовлеченными в синтез СГА, были посвящены выявлению/уточнению функций этих генов. Снижение функции или, наоборот, сверхэкспрессия гена *GAME9*, кодирующего AP2/ERF транскрипционный фактор, влияли на накопление СГА и фитостероидов, соответственно понижая или повышая синтез этих веществ и подтверждая регуляторную роль гена (Cárdenas et al., 2016).

Сверхэкспрессия гена *SMT1* сои (кодирующего ключевой фермент, переключающий синтез стероидов в сторону фитостероидов) в растениях картофеля приводила к понижению уровня СГА, а также свободного холестерина. Уровень СГА был ниже на 41 и 63 % в листьях и клубнях соответственно, уровень холестерина – на 50 %. При этом повышалось содержание фитостероидов (Arnqvist et al., 2003).

Подавление экспрессии гена *SSR2* при помощи РНК-интерференции или нарушение его функций с помощью геномного редактирования (с использованием системы TALEN) приводило у растений картофеля к снижению уровня холестерина, а также СГА примерно на 10 %, без какого-либо влияния на рост растений (Sawai et al., 2014). Небольшое снижение уровня СГА, несмотря на ключевую роль *SSR2* в их синтезе (см. рис. 4), позволяет предположить наличие дублирующих генов.

Подавление функции *GAME8 (PGA1)* и *GAME6 (PGA2)* картофеля при помощи РНК-интерференции приводило к снижению содержания СГА более чем в 10 раз и повышению содержания субстратов этих ферментов (Umehoto et al., 2016). При этом растения характеризовались нормальным вегетативным ростом и клубнеобразованием, но отличались стерильностью по мужскому типу. Показано также, что клубни трансгенных растений не прорастали при хранении на воздухе или в воде, но прорастали при хранении в почве, а также в питательной среде.

Понижение функции гена *GAME4* картофеля при помощи РНК-интерференции приводило к изменению профиля метаболитов этих растений со сдвигом в сторону накопления стероидных сапонинов и фитоэджидстероидов и уменьшения накопления СГА в несколько раз, что сопровождалось снижением резистентности к патогену *Verticillium dahliae* (Paudel et al., 2017).

Серия работ (McCue et al., 2006, 2007, 2017; McCue, 2009) посвящена элиминированию гликозилирования, последнего шага формирования СГА, путем независимого встраивания в геном растений картофеля антисмысловых конструкций для генов гликозилаз (*SGT1*, *SGT2* и *SGT3*). В линиях со встроенными антисмысловыми конструкциями для *SGT1* и *SGT2* наблюдалось изменение соотношения α -соланина и α -хаконина: уменьшение α -соланина с компенсаторным увеличением α -хаконина в линии с антисмысловой конструкцией для *SGT1* и противоположное изменение в линии *SGT2*. Однако трансгенные линии с двойными антисмысловыми конструкциями для обоих генов *SGT1* и *SGT2* не приводили к уменьшению общего уровня СГА, и наблюдалось подавление экспрессии либо *SGT1*, либо *SGT2*. В линии, трансформированной антисмысловой ДНК *SGT3* с клубнеспецифичным промотором, наблюдалось уменьшение α -соланина и α -хаконина с увеличением минорных β - и γ -форм этих гликоалкалоидов в клубнях растений. При подавлении экспрессии генов *SGT* не выявлено побочных эффектов на рост и развитие растений (McCue et al., 2017) или изменения метаболизма за исключением целенаправленных изменений, описанных выше, что подтверждено также в работе (Shepherd et al., 2015).

Метаболизм СГА и распределение в растительных тканях

Ферменты, участвующие в синтезе холестерина, а также фитостероидов, были найдены у растений арабидопсиса и томата в мембране ЭПР (эндоплазматического ретикулума), а также в плазмолемме и липидоподобных частях клетки (Sonawane et al., 2016). СГА локализованы непосредственно в цитоплазме – главным образом в вакуолях, а также в апопласте растений томата и картофеля (Cárdenas et al., 2015). Они найдены во всех органах и тканях растений картофеля, кроме сердцевин клубня. Наибольшая концентрация СГА в клубнях была обнаружена в полуторамиллиметровом слое феллодермы (Mariot et al., 2016). Концентрация гликоалкалоидов в феллодерме может быть в 3–10 раз выше, чем в мякоти клубня (Cantwell, 1996). Информация о наличии транспорта СГА в растениях картофеля отсутствует (Smith et al., 1996; Friedman, 2006; Alyokhin et al., 2012). В связи с этим высказано предположение, что основной биосинтез СГА в клубнях также происходит в феллодерме (Sinden et al., 1984; Alyokhin et al., 2012). Высокий уровень СГА в феллодерме коррелировал с высоким уровнем транскрипции ключевых ферментов биосинтеза СГА, в то время как в других частях растения наблюдали низкий уровень СГА, и транскриптов генов биосинтеза СГА (Krits et al., 2007). Вероятно, накопление гликоалкалоидов в феллодерме является одним из механизмов защиты клубней картофеля от вредителей.

Стероидные гликоалкалоиды синтезируются в растениях картофеля на всех стадиях развития. Эксперименты по длительному хранению показывают, что содержание СГА в клубнях в начальный период хранения возрастает, а далее снижается (Fitzpatrick et al., 1977). При этом если клубни подвергаются воздействию освещения, в том числе искусственного, а также положительных температур (10 °C), то уровень СГА в клубнях возрастает (Haase,

2010). В клубнях картофеля обнаружено присутствие фермента рамнозидазы, которая катализирует превращение α -хаконина в β -хаконин (Filadelfi, Zitnak, 1982). Этот же фермент может превращать и α -соланин в β -соланин, но имеет большее сродство к α -хаконину (Bushway et al., 1990). В работе (Nikolic, Stankovic, 2005) из ботвы растений картофеля были выделены ферменты, которые гидролизуют α -соланин и α -хаконин, экстрагированные из растений картофеля, до агликона соланидина при воздействии температурой от 30 до 40 °С. Возможно, эти ферменты вовлечены в процесс деградации СГА в растениях во избежание аутоксичности, но их активность крайне мала в интактных клубнях (Ginzberg et al., 2009).

Токсические свойства СГА

Стероидные гликоалкалоиды – это биологически активные вторичные метаболиты, которые появились в ходе эволюции *Solanum* как компонент защитного механизма от патогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. При высокой концентрации гликоалкалоиды картофеля отпугивают, вызывают гибель и подавляют размножение личинок картофельной тли, *Macrosiphum euphorbiae*, переносчика PVA, PVM, PVY (potato virus A, M, Y) и других вирусов картофеля (Guntner et al., 2000). В работе (Flanders et al., 1992) показана устойчивость картофеля, связанная с различными СГА, к таким вредителям, как картофельная блошка, зеленая персиковая тля, картофельная тля, картофельная цикадка. Гликоалкалоиды ингибируют рост грибного патогена *Alternaria brassicicola* (Smith et al., 1996). В ряде исследований подтверждена связь устойчивости растений картофеля к личинкам и взрослым формам колорадского жука с содержанием в них различных гликоалкалоидов (Tingey, 1984; Flanders et al., 1992; Lorenzen et al., 2001).

Существует два механизма формирования устойчивости к колорадскому жуку, связанных с гликоалкалоидами: отпугивание насекомых (антиксеноз) и токсичность (антибиоз) (Pelletier, Tai, 2001). Детеррентный эффект основан на неспецифическом взаимодействии СГА со вкусовыми рецепторами (хемосенсиллами) жука, влияющем на пищевое поведение насекомого (Mitchell, Harrison, 1985).

Устойчивость растений картофеля к насекомым зависит как от количества, так и от состава индивидуальных СГА. Так, демисин, соланин, хаконин, соламарин и соласонин не влияют на устойчивость, а томатин, лептин, коммерсонин и дегидрокоммерсонин, напротив, проявляют высокую эффективность в борьбе с насекомыми (Sinden et al., 1980; Mitchell, Harrison, 1985; Flanders et al., 1992; Lorenzen et al., 2001; Friedman, 2006). СГА с разной эффективностью образуют комплексы с холестерином клеточных мембран, приводя к перестановкам в бислое и разрушению мембран. Молекула СГА образует комплекс с холестерином своей агликоновой частью, а эффективность этого процесса зависит от конкретной гликозидной цепи (Friedman, 2006). Есть подтверждение синергетическому разрушительному действию двух различных СГА на синтетические клеточные мембраны *in vitro* (Smith et al., 1996). Гликоалкалоиды транспортируются в клетку через ионные натриевые и кальциевые каналы и ингибируют транспорт ионов (Friedman, 2006). Кроме того, СГА ин-

гибируют ацетилхолинэстеразу и бутирилхолинэстеразу, ферменты, гидролизующие нейротрансмиттер ацетилхолин, в то время как их агликоны имеют низкий ингибиторный эффект или не имеют его совсем (Friedman, 2006).

На человека и животных СГА оказывают общее токсическое, нейротоксическое, эмбриотоксическое, гепатотоксическое и тератогенное действие (Friedman, 2006; Kozukue et al., 2008). При этом α -хаконин гораздо более токсичен, чем α -соланин. Хотя оба вещества блокируют ацетилхолинэстеразу, но α -соланин имеет менее выраженный литический эффект или не имеет его вовсе. Промежуточные продукты гидролиза α -хаконина и α -соланина проявляют все меньшую общую токсичность по мере того, как они теряют углеводные группы. Агликон соланидин наименее токсичен во всех проявлениях. Также соланин и хаконин оказываются более токсичными, чем их соответствующие спиросоланы: соламаргин, соласонин и соласодин. Орально потребляемый томатин, по-видимому, нетоксичен (Kozukue et al., 2008). Пероральные дозы суммарных СГА 1–5 мг/кг массы тела приводят к отравлению от незначительного до тяжелого, тогда как дозы 3–6 мг/кг массы тела могут быть летальными (Smith et al., 1996). Установленный максимальный уровень содержания СГА в клубнях для безопасного использования в пищу не должен превышать 20 мг на 100 г свежего веса (Ginzberg et al., 2009). При употреблении картофеля в пищу важны условия хранения клубней. Известно, что при хранении клубней на свету в них повышается содержание гликоалкалоидов с независимым увеличением количества хлорофилла, приводящим к «позеленению» клубня (Smith et al., 1996).

Заключение

Растения обладают огромным химическим разнообразием вторичных метаболитов, и понимание того, как формируется это разнообразие в многоступенчатом эволюционном пути, – фундаментальный вопрос. Многочисленные современные сорта картофеля возникли благодаря одомашниванию диких видов и их последующему улучшению с помощью селекции. Доместикация картофеля сопровождалась уменьшением содержания стероидных гликоалкалоидов, токсичных для человека. Дальнейшее изучение регуляции накопления СГА и особенностей этого процесса в различных условиях с целью уменьшения содержания стероидных гликоалкалоидов в картофеле позволит эффективнее привлекать к селекции дикие виды картофеля. Такое моделирование процессов доместикации представляет собой еще одну фундаментальную задачу. Известные эффекты гликоалкалоидов, кроме токсического, такие как антиканцерогенная или противомаларийная активность, также делают биосинтез СГА актуальным объектом для изучения. Перспективным направлением является разработка новых сортов картофеля с тканеспецифичной регуляцией СГА, в которых будет сохраняться высокий уровень СГА в листьях для защиты от патогенов и вредителей и одновременно подавляться накопление этих веществ в клубнях.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-29-08006.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdelkareem A., Thagun C., Nakayasu M., Mizutani M., Hashimoto T., Shoji T. Jasmonate-induced biosynthesis of steroidal glycoalkaloids depends on COII proteins in tomato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017;489(2):206-210. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.05.132.
- Alyokhin A., Vincent C., Giordanengo P. (Eds.). *Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management*. Academic Press, 2012.
- Arnqvist L., Dutta P.C., Jonsson L., Sitbon F. Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type I sterol methyltransferase cDNA. *Plant Physiol.* 2003; 131(4):1792-1799. DOI 10.1104/pp.102.018788.
- Bushway A.A., Bushway R.J., Kim C.H. Isolation, partial purification and characterization of a potato peel α -solanine cleaving glycosidase. *Am. Potato J.* 1990;67(4):233-238. DOI 10.1007/BF02987264.
- Cantwell M. A review of important facts about potato glycoalkaloids. *Perishables Handling Newslett.* 1996;87:26-27.
- Cárdenas P.D., Sonawane P.D., Heinig U., Bocobza S.E., Burdman S., Aharoni A. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in *Solanaceae* steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry.* 2015;113:24-32. DOI 10.1016/j.phytochem.2014.12.010.
- Cárdenas P.D., Sonawane P.D., Pollier J., Bossche R.V., Dewangan V., Weithorn E., Tal L., Meir S., Rogachev I., Malitsky S., Giri A.P., Goossens A., Burdman S., Aharoni A. GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. *Nat. Commun.* 2016;7:10654. DOI 10.1038/ncomms10654.
- Chen Y., Li S., Sun F., Han H., Zhang X., Fan Y., Tay G., Zhou Y. *In vivo* antimalarial activities of glycoalkaloids isolated from *Solanaceae* plants. *Pharm. Biol.* 2010;48(9):1018-1024. DOI 10.3109/13880200903440211.
- Choi E., Koo S. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanolic extract of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Agric. Immunol.* 2005;16(1):29-39. DOI 10.1080/09540100500064320.
- Delporte C., Backhouse N., Negrete R., Salinas P., Rivas P., Casels B.K., Feliciano A.S. Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytother. Res.* 1998;12(2):118-122. DOI 10.1002/(SICI)1099-1573(199803)12:2<118::AID-PTR207>3.0.CO;2-U.
- Filadelfi M.A., Zitnak A. Preparation of chaconines by enzymic hydrolysis of potato berry alkaloids. *Phytochemistry.* 1982;21(1):250-251. DOI 10.1016/0031-9422(82)80067-8.
- Fitzpatrick T.J., Herb S.F., Osman S.F., McDermott J.A. Potato glycoalkaloids: increases and variations of ratios in aged slices over prolonged storage. *Am. Potato J.* 1977;54(11):539-544. DOI 10.1007/BF02852221.
- 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.
- Friedman M. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(23):8655-8681. DOI 10.1021/jf061471t.
- Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. *Trends Genet.* 2013;29(4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.
- Ginzberg I., Tokuhisa J.G., Veilleux R.E. Potato steroidal glycoalkaloids: biosynthesis and genetic manipulation. *Potato Res.* 2009; 52(1):1-15. DOI 10.1007/s11540-008-9103-4.
- Guntner C., Vazquez A., Gonzalez G., Usbillaga A., Ferreira F., Moyna P. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*: Part II. *J. Chem. Ecol.* 2000;26(5):1113-1122. DOI 10.1023/A:1005471624833.
- Haase N.U. Glycoalkaloid concentration in potato tubers related to storage and consumer offering. *Potato Res.* 2010;53(4):297-307. DOI 10.1007/s11540-010-9162-1.
- Heftmann E. Biogenesis of steroids in *Solanaceae*. *Phytochemistry.* 1983;22(9):1843-1860. DOI 10.1016/0031-9422(83)80001-6.
- Hirsch C.D., Hamilton J.P., Childs K.L., Cepela J., Crisovan E., Vailancourt B., Hirsch C.N., Habermann M., Neal B., Buell C.R. Spud DB: A resource for mining sequences, genotypes, and phenotypes to accelerate potato breeding. *Plant Genome.* 2014;7(1). DOI 10.3835/plantgenome2013.12.0042.
- Itkin M., Heinig U., Tzfadia O., Bhide A.J., Shinde B., Cárdenas P.D., Bocobza S.E., Unger T., Malitsky S., Finkers R., Tikunov Y., Bovy A., Chikate Y., Singh P., Rogachev I., Beekwilder J., Giri A.P., Aharoni A. Biosynthesis of antinutritional alkaloids in *Solanaceae* crops is mediated by clustered genes. *Science.* 2013;341(6142):175-179. DOI 10.1126/science.1240230.
- Kenny O.M., Brunton N.P., Rai D.K., Collins S.G., Jones P.W., McGuire A.R., O'Brien N.M. Cytotoxic and apoptotic potential of potato glycoalkaloids in a number of cancer cell lines. *J. Agr. Sci. Appl.* 2013;2(4):184-192. DOI 10.14511/jasa.2013.020401.
- Kozukue N., Yoon K.S., Byun G.I., Misoo S., Levin C.E., Friedman M. Distribution of glycoalkaloids in potato tubers of 59 accessions of two wild and five cultivated *Solanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56(24):11920-11928. DOI 10.1021/jf802631t.
- Krits P., Fogelman E., Ginzberg I. Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes. *Planta.* 2007; 227(1):143-150. DOI 10.1007/s00425-007-0602-3.
- Kumar A., Fogelman E., Weissberg M., Tanami Z., Veilleux R.E., Ginzberg I. Lanosterol synthase-like is involved with differential accumulation of steroidal glycoalkaloids in potato. *Planta.* 2017;246(6): 1189-1202. DOI 10.1007/s00425-017-2763-z.
- Lorenzen J.H., Balbyshev N.F., Lafta A.M., Casper H., Tian X., Sagredo B. Resistant potato selections contain leptine and inhibit development of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 2001;94(5):1260-1267. DOI 10.1603/0022-0493-94.5.1260.
- Manrique-Carpintero N.C., Tokuhisa J.G., Ginzberg I., Holliday J.A., Veilleux R.E. Sequence diversity in coding regions of candidate genes in the glycoalkaloid biosynthetic pathway of wild potato species. *G3 Genes Genom. Genet.* 2013;3(9):1467-1479. DOI 10.1534/g3.113.007146.
- Mariot R.F., De Oliveira L.A., Voorhuijzen M.M., Staats M., Hutten R.C., van Dijk J.P., Kok E.J., Frazzon J. Characterization and transcriptional profile of genes involved in glycoalkaloid biosynthesis in new varieties of *Solanum tuberosum* L. *J. Agric. Food Chem.* 2016;64(4):988-996. DOI 10.1021/acs.jafc.5b05519.
- McCue K.F. Potato glycoalkaloids, past present and future. *Fruit Veget. Cereal Sci. Biotechn.* 2009;3(7):65-71.
- McCue K.F., Allen P.V., Shepherd L.V., Blake A., Whitworth J., MacCree M.M., Rockhold D.R., Stewart D., Davies H.V., Belknap W.R. The primary *in vivo* steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato. *Phytochemistry.* 2006;67(15):1590-1597. DOI 10.1016/j.phytochem.2005.09.037.
- McCue K.F., Allen P.V., Shepherd L.V., Blake A., MacCree M.M., Rockhold D.R., Novy R.G., Stewart D., Davies H.V., Belknap W.R. Potato glycoesterol rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis. *Phytochemistry.* 2007;68(3):327-334. DOI 10.1016/j.phytochem.2006.10.025.
- McCue K.F., Breksa A., Vilches A., Belknap W.R. Modification of potato steroidal glycoalkaloids with silencing RNA constructs. *Am. J. Potato Res.* Online 2017;1-6. DOI 10.1007/s12230-017-9609-x.
- Mitchell B.K., Harrison G.D. Effects of *Solanum* glycoalkaloids on chemosensilla in the Colorado potato beetle. *J. Chem. Ecol.* 1985; 11(1):73-83. DOI 10.1007/BF00987607.
- Nikolic N.C., Stankovic M.Z. Hydrolysis of glycoalkaloids from *Solanum tuberosum* L. haulm by enzymes present in plant material and by enzyme preparation. *Potato Res.* 2005;48(1):25-33. DOI 10.1007/BF02733679.

- Paudel J.R., Davidson C., Song J., Maxim I., Aharoni A., Tai H.H. Pathogen and pest responses are altered due to RNAi-mediated knockdown of *GLYCOALKALOID METABOLISM 4* in *Solanum tuberosum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2017;30(11):876-885. DOI 10.1094/MPMI-02-17-0033-R.
- Pelletier Y., Tai G.C.C. Genotypic variability and mode of action of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) resistance in seven *Solanum* species. *J. Econ. Entomol.* 2001;94(2):572-578. DOI 10.1603/0022-0493-94.2.572.
- Rangarajan A., Miller A.R., Veilleux R.E. Leptine glycoalkaloids reduce feeding by Colorado potato beetle in diploid *Solanum* sp. hybrids. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2000;125(6):689-693.
- Reddivari L., Vanamala J., Safe S.H., Miller (Jr.) J.C. The bioactive compounds α -chaconine and gallic acid in potato extracts decrease survival and induce apoptosis in LNCaP and PC3 prostate cancer cells. *Nutr. Cancer.* 2010;62(5):601-610. DOI 10.1080/01635580903532358.
- Satoh T. Glycemic effects of solanine in rats. *Jap. J. Pharmacol.* 1967;17(4):652-658.
- Sawai S., Akashi T., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Ayabe S.I., Aoki T. Plant lanosterol synthase: divergence of the sterol and triterpene biosynthetic pathways in eukaryotes. *Plant Cell Physiol.* 2006;47(5):673-677. DOI 10.1093/pcp/pcj032.
- Sawai S., Ohshima K., Yasumoto S., Seki H., Sakuma T., Yamamoto T., Takebayashi Y., Kojima M., Sakakibara H., Aoki T., Muranaka T., Saito K., Umemoto N. Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *Plant Cell.* 2014;26(9):3763-3774. DOI 10.1105/tpc.114.130096.
- Shepherd L.V.T., Hackett C.A., Alexander C.J., McNicol J.W., Sungurtas J.A., Stewart D., McCue K.F., Belknap W.R., Davies H.V. Modifying glycoalkaloid content in transgenic potato – Metabolome impacts. *Food Chem.* 2015;187:437-443. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.04.111.
- Sinden S.L., Sanford L.L., Osman S.F. Glycoalkaloids and resistance to the Colorado potato beetle in *Solanum chacoense* Bitter. *Am. J. Potato Res.* 1980;57(7):331-343. DOI 10.1007/BF02854028.
- Sinden S.L., Sanford L.L., Webb R.E. Genetic and environmental control of potato glycoalkaloids. *Am. J. Potato Res.* 1984;61(3):141-156. DOI 10.1007/BF02854035.
- Smith D.B., Roddick J.G., Jones J.L. Potato glycoalkaloids: some unanswered questions. *Trends Food Sci. Technol.* 1996;7(4):126-131. DOI 10.1016/0924-2244(96)10013-3.
- Sonawane P.D., Pollier J., Panda S., Szymanski J., Massalha H., Yona M., Unger T., Malitsky S., Arendt P., Pauwels L., Almekias-Siegl E., Rogachev I., Meir S., Cárdenas P.D., Masri A., Petrikov M., Schaller H., Schaffer A.A., Kamble A., Giri A.P., Goossens A., Aharoni A. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nat. Plants.* 2016;3:16205. DOI 10.1038/nplants.2016.205.
- Tingey W.M. Glycoalkaloids as pest resistance factors. *Am. Potato J.* 1984;61(3):157-167. DOI 10.1007/BF02854036.
- Umemoto N., Nakayasu M., Ohshima K., Yotsu-Yamashita M., Mizutani M., Seki H., Saito K., Muranaka T. Two cytochrome p450 monooxygenases catalyze early hydroxylation steps in the potato steroidal glycoalkaloid biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 2016;171(4):2458-2467. DOI 10.1104/pp.16.00137.