

Протокол анализа количественных характеристик опушения листа картофеля

А.В. Дорошков , М.А. Генаев, Д.А. Афонников

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Опушение листьев у растений – один из важных признаков, отвечающих за формирование микроклимата у поверхности листа, – участвует в защите от неблагоприятных биотических и абиотических факторов среды. У пасленовых, к которым относится картофель *Solanum tuberosum* L., опушение листа представлено многоклеточными неветвистыми трихомами разного размера и морфологии. Опушение этой культуры способствует сопротивлению растения насекомым-вредителям, в частности колорадскому жуку и тле, которая является переносчиком вирусных заболеваний. В процессе селекционно-генетических экспериментов возникает необходимость оценить интенсивность опушения листьев растений картофеля. Для этого, как правило, используют микро-изображения или микрофотографии листьев листа, сделанные под микроскопом. С их помощью оценивают количество трихом разного типа на поверхности листа и затем нормируют на единицу площади. Такой подход трудоемок, поскольку требует визуального подсчета трихом под микроскопом. Разработанный нами протокол описывает технологию быстрой количественной оценки характеристик опушения у картофеля (числа трихом на поверхности листа и их средней длины) для решения задач генетики и селекции этой культуры. Он состоит из описания технологии приготовления препаратов и получения цифровых изображений сгибов листа с помощью оптического микроскопа в проходящем свете и последующей автоматической обработке этих изображений на компьютере с помощью программы LHDetect2.

Ключевые слова: высокопроизводительное фенотипирование; анализ изображений; *Solanum tuberosum* L.; трихомы.

A protocol for analysis of the quantitative characteristics of leaf pubescence in potato

A.V. Doroshkov , M.A. Genaev, D.A. Afonnikov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Plant leaf pubescence is one of the important features, which is responsible for microclimate formation near the epidermis. It is involved in protection against adverse biotic and abiotic environmental factors. In *Solanaceae*, to which belongs the potato *Solanum tuberosum* L., leaf pubescence appears as multicellular unbranched trichomes of diverse size and morphology. Pubescence of this plants promotes resistance to insect pests, in particular, Colorado potato beetle and aphid, which is a carrier of viral diseases. During the process of breeding and genetic experiments, there is a need to assess the intensity of leaf pubescence of potato plants. For this task, micrographs taken under a microscope are commonly used. They are used to count different types of trichomes on the leaf surface to characterize the intensity of potato leaf pubescence. This approach requires visual counting of trichomes under a microscope and is fairly laborious. This protocol describes a rapid technology for quantitative assessment of the characteristics of potato pubescence (the number of trichomes on the leaf surface and the average length of trichomes) to solve the problems of genetics and breeding of this plant. It consists of a preparation technology, digital imaging of leaf folds with an optical microscope in transmitted light and subsequent automatic processing of images using the LHDetect2 software.

Key words: high-throughput phenotyping; image analysis; *Solanum tuberosum* L.; trichomes.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дорошков А.В., Генаев М.А., Афонников Д.А. Протокол анализа количественных характеристик опушения листа картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):863-868. DOI 10.18699/VJ16.218

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

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 Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):863-868. DOI 10.18699/VJ16.218

METHODS AND PROTOCOLS

Received 25.11.2016

Accepted for publication 23.12.2016

© AUTHORS, 2016

Опушение – это набор поверхностных образований – трихом. Трихомы растений бывают несекретирующие и секретирующие (выделяют секрет во внешнюю среду). Они участвуют в формировании микроклимата у поверхности листа, в защите от неблагоприятных биотических и абиотических факторов среды. Особый интерес представляют железистые трихомы картофеля и его сородичей: они способны обеспечивать защиту растения от насекомых, в частности колорадского жука, картофельной блохи и картофельной цикадки (Gregory et al., 1986; Flanders et al., 1992; Maharijaya, Vosman, 2015). Показана вариация в наборе типов трихом между видами пасленовых (Schillmiller et al., 2008), что определяет разную степень устойчивости к поражению вредителями.

Было выявлено, что опушение дикого картофеля *Solanum berthaultii* Hawkes. значительно более плотное и более эффективно в борьбе с насекомыми, чем *S. tuberosum* (Tingey et al., 1982). Плотность расположения трихом – один из основных факторов, коррелирующих с устойчивостью к насекомым-вредителям (Kennedy, 2003; Simmons, Gurr, 2005). Плотное опушение железистыми трихомами, эффективное в защите от вредителей, – перспективный признак для селекции (Tingey et al., 1982; Фасулати и др., 2011).

Известно, что применение современных методов высокопроизводительного фенотипирования позволяет получить более быстрое точное описание морфологических признаков, чем ранее используемые методы (Афонников и др., 2016). С использованием такого подхода нами было показано, что между сортами картофеля существует большая вариация по признакам плотности и длины опушения (Дорошков и др., 2016). Эти признаки могут быть использованы для предсказания устойчивости генотипов картофеля к насекомым, а также в широкомасштабной селекционной работе.

В процессе анализа опушения картофеля нами проведена оптимизация параметров распознавания изображений с учетом особенностей морфологии трихом картофеля и разработан протокол приготовления препаратов для получения изображений. Полученный метод, описание которого дано в настоящей статье, позволяет производить быструю количественную оценку характеристик опушения листа картофеля для решения задач генетики и селекции этой культуры.

1. Пробоподготовка

1.1. Материалы

Для сбора образцов необходимы ножницы и герметичный контейнер для транспортировки. Для приготовления препаратов потребуются предметные стекла, спирт и салфетка для их протирки, а также липкая лента для фиксации образца. Для микроскопии необходим световой микроскоп, оснащенный цифровой камерой.

1.2. Растения и время сбора образцов

Для сбора образцов используют здоровые растения картофеля, выращенные в поле или теплице. Сбор материала производят в период цветения.

1.3. Сбор и хранение листьев

Сложные листья картофеля собирают в поле или теплице и опускают черешком в воду для поддержания тургора. Оптимальный размер листовой пластинки для анализа 4–6 см в длину. Это соответствует взрослому листу 4–5-го яруса начиная от точки роста побега. Лист должен быть здоровым и не поврежденным болезнями или вредителями. Препараты для анализа необходимо приготавливать на свежем материале. Допускается хранение листьев, опущенных основанием в воду не более шести часов.

1.4. Подготовка микропрепаратов сгиба листа

Для приготовления препаратов сгибов листа вырезаются фрагменты, заключенные между жилок (рис. 1, а). Фрагмент размером около 10×20 мм сгибают пополам так, чтобы анализируемая поверхность листа (абаксиальная или адаксиальная) оказалась снаружи и помещается на предметное стекло (см. рис. 1, б, в). Фрагмент фиксируется липкой лентой так, чтобы сгиб оказался свободен. Отступ края ленты от сгиба не более 2–3 мм. Для надежной оценки опушения растения следует подготовить и проанализировать препараты как минимум трех сгибов листа. Для минимизации ошибки, связанной с условиями формирования листа, рекомендуется использовать для приготовления каждого сгиба новый лист с того же растения.

2. Получение изображений

Изображения получают при помощи светового микроскопа в проходящем свете (рис. 2, а). Для фотографирования используют объектив малого увеличения (3×–10×). Оптимальное значение увеличения объектива подбирается с учетом увеличения адаптера и размера матрицы камеры. Программа LHDetect2 (Genaev et al., 2012) оптимизирована для работы с изображениями, пиксель в которых примерно соответствует размеру 2×2 мкм. Микроскоп должен иметь возможность обеспечить равномерное освещение всего поля зрения объектива. Это достигается использованием специального конденсора для малого увеличения либо выводом из оптической системы фронтальной линзы конденсора (см. рис. 2, б, в).

Такая методика позволяет получать в проходящем свете контрастное изображение трихом на светлом фоне. Во время съемки апертурная диафрагма должна быть закрыта до минимального значения. Это обеспечит четкое изображение трихом, искривленных в пространстве. Полевая диафрагма, напротив, должна быть максимально открыта для предотвращения появления затемнения углов кадра. После настройки микроскопа необходимо найти сгиб и обеспечить позиционирование границы листа в вертикальном направлении так, чтобы область листа (темная) располагалась справа, а область фона – слева (рис. 3).

Настройкой интенсивности света и экспозиции камеры и позиции тубуса (микро- и макровинтом) необходимо добиться контрастного изображения границы сгиба и трихом. При этом фон должен быть белым (иметь максимальные значения интенсивности, т. е. переэкспонирован), а лист черным (иметь минимальные значения интенсивности, т. е. недоэкспонирован) (см. рис. 3).

Изображения должны быть сохранены в формате TIFF, BMP, PNG, GIF или JPG без сжатия. Рекомендуется по

возможности избежать использования формата JPG, так как даже минимальное сжатие ухудшает распознавание границ объектов.

3. Компьютерная обработка изображений

3.1. Описание модифицированного метода LHDetect2 для распознавания маленьких секретирующих трихом

Обработка изображений проводится программой LHDetect2. Эта программа распознает на стандартном изображении (см. рис. 3, б) вершины и основания трихом и измеряет их длину.

Алгоритм, позволяющий анализировать трихомы на изображении сгиба листа, был опробован на пшенице (Генаев et al., 2012) и табаке. Опушение у пшеницы формируется совокупностью несекретирующих одноклеточных трихом. Опушение картофеля формируется трихомами двух типов: несекретирующими, которые по форме сходны с трихомами пшеницы, и маленькими секретирующимися трихомами (см. рис. 3). Ранее нами для распознавания секретирующих головок трихом, характерных для картофеля, табака и томата, были внесены модификации параметров, позволившие их распознавать.

Рассмотрим особенности применения LHDetect2 для картофеля. Размер секретирующих трихом этого растения относительно мал, и вершины трихом имеют кривизну, обусловленную наличием секретирующей головки. Для преодоления проблемы размера был изменен постоянный параметр «минимальная длина трихомы» с 8 до 4 пикселей. Для поиска вершин трихом в объекте алгоритм последовательно один за другим обходит пиксели, принадлежащие его границе. На каждом шаге обхода для текущего пикселя границы определяются еще два, удаленных вдоль границы от него на N соседних пикселей: один по направлению обхода, другой – в противоположном направлении. После этого измеряют величину угла с вершиной в центральном пикселе, образованном двумя соседними пикселями. Если она меньше порогового значения α , средний пиксель считается потенциальной вершиной

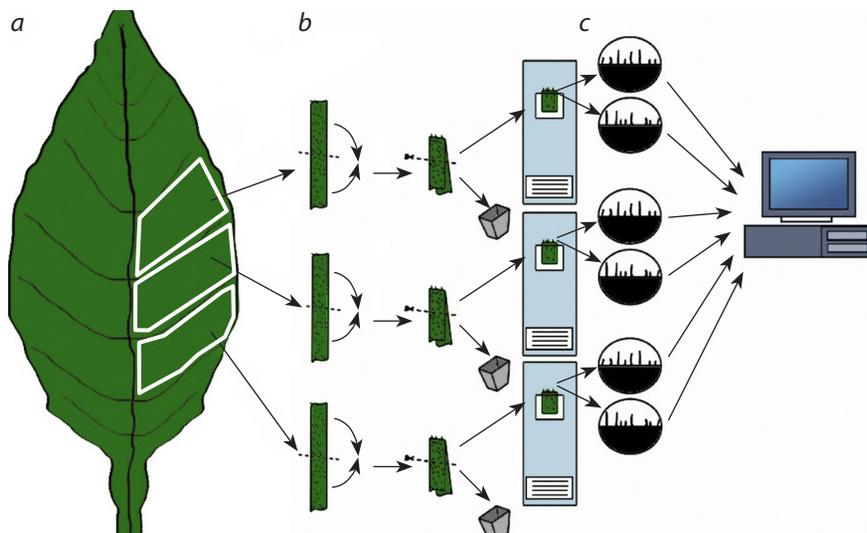


Fig. 1. Step-by-step preparation of potato trichome images for phenotyping: (a) excision of fragments; (b) slide preparation; (c) photography and image processing. From (Doroshkov et al., 2016), with modifications.

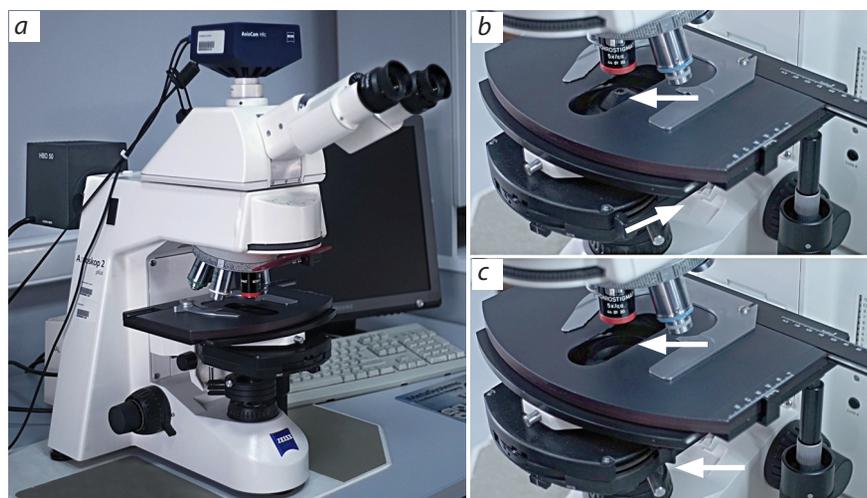


Fig. 2. Equipment for imaging: Zeiss Axioscop 2 plus microscope with an Axiocam HRC camera (2/3 inch CCD sensor) and an adapter with 0.63 magnification. Field lens 5x.

(a) With this magnification, a pixel in an image with the resolution 1300 × 1030 corresponds to the size 2.1 × 2.1 μm. (b, c) Removal of the frontal condenser lens from the optical path.

трихомы. Данный алгоритм, следовательно, относит к потенциальным вершинам пиксели, в которых линия границы объекта имеет большую кривизну. В случае анализа опушения пшеницы параметр N был зафиксирован: $N = 2$. Размеры головок у трихом табака могут сильно различаться, что приводит к тому, что использование значения параметра N (определяющего расстояние между тремя пикселями вдоль границы листа для определения угла ее изгиба), одинакового для всех трихом, не позволяет точно идентифицировать положение их вершин. Поэтому они плохо определялись версией алгоритма, разработанной для пшеницы. Решить эту проблему позволила модификация алгоритма, разработанного первоначально для пшеницы. В результате модификации значения параметра N для каждой трихомы в процессе поиска ее вершины могут меняться в пределах от N_{min} до N_{max} , где N_{min} и N_{max} – целые

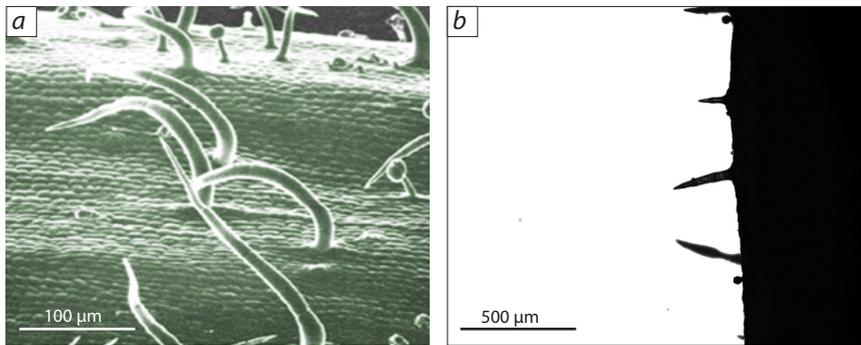


Fig. 3. Morphology of cultivated potato *S. tuberosum* trichomes: (a) in an electron microscopic image from (Tingey et al., 1982) and (b) in an image of a leaf fold in transmitted light, suitable for computerized processing.

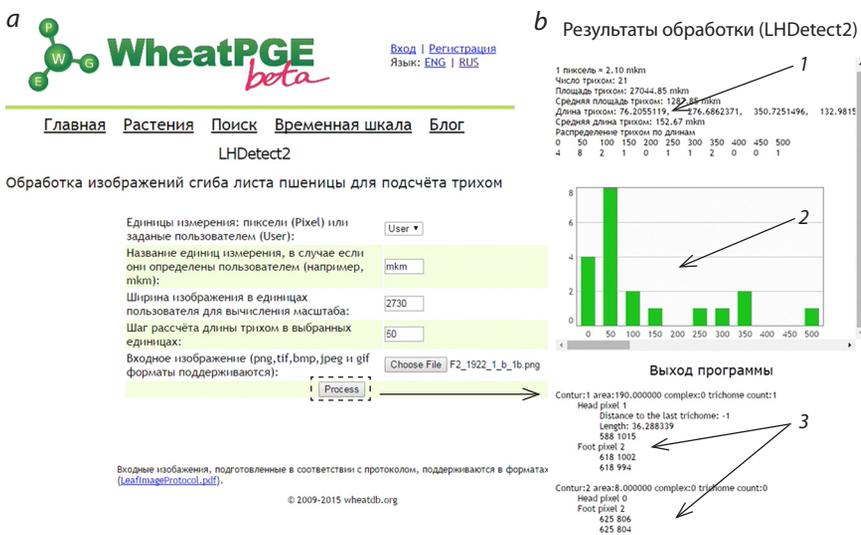


Fig. 4. LHDetect2_potato program: (a) interface; (b) exemplary image processing output.

числа, которые являются параметрами алгоритма. На этапе поиска вершины трихомы, как и в случае с анализом трихом пшеницы, производится поиск пикселей границы трихомы, которые расположены в области максимальной кривизны линии границы. Для текущего пикселя границы определяются пары пикселей, удаленные от анализируемого пикселя на N пикселей (вперед и назад по направлению обхода). При этом значения N последовательно увеличиваются от N_{min} до N_{max} с шагом 1. Для каждой такой пары пикселей измеряется величина угла α_i с вершиной в тестируемом пикселе. Если на определенном шаге α_i меньше порогового значения α , перебор останавливается и тестируемый пиксель считается потенциальной вершиной трихомы.

3.2. Работа с программой LHDetect2

Интерфейс веб-версии программы, открытой и доступной по адресу http://ru.wheatdb.org/LHDetect2_potato, показан на рис. 4, а. Для запуска анализа необходимо выбрать параметры и загрузить изображение, пригодное для анализа (http://wheatdb.org/static/images/lhdetect/F2_1922_1_b_1b.png). В поле 1 программа предлагает выбрать единицы измерения: Pixel или User. В первом случае программа приведет измерения размера трихом в пикселях, во втором пересчитает в величину, заданную пользователем. Для задания собственных единиц измерения нужно ввести их название в поле 2, например мкм, и ширину изображения в этих единицах в поле 3 для вычисления масштаба.

Подразумевается, что оптическая система микроскопа не вносит искажений, длина пикселя изображения соответствует его ширине.

Важно: Во избежание появления ошибок при сравнении данных в пределах одного эксперимента необходимо использовать изображения одинакового масштаба, например, полученные с идентичных систем микроскоп – камера.

После выбора единиц измерения следует в поле 4 задать интервал расчета длины трихом в выбранных единицах. Этот параметр отвечает за предварительную обработку. Данные для каждого изображения будут представлены в виде распределения трихом по интервалам длин, т. е. числового массива, каждым элементом которого является число трихом в соответствующем интервале длин. Интервал выбирают согласно задачам анализа: при малом количестве измерений для описания выборки (1–5 препаратов) следует выбирать шаг в 40–60 мкм, при более детальном анализе (более 20 препаратов) возможно уменьшение шага вплоть до 10 мкм. Шаг меньшего размера использовать нецелесообразно, поскольку большое число интервалов гистограммы, содержащих нулевые значения, приведет к неинформативности анализа. После задания всех параметров следует загрузить файл для обработки кнопкой Choose File и нажать Process.

3.3. Структура результатов программы LHDetect2

Программа LHDetect2 определяет на изображении совокупность объектов, каждый из которых является одной или несколькими трихомами на поверхности листа. Объект содержит несколько трихом, если на изображении они перекрываются. После идентификации объектов программа измеряет длину каждой распознанной в составе объекта трихомы и выводит эти значения в единицах измерения, указанных пользователем. На основании этих данных рассчитывают число трихом и их распределение по интервалам длин. Программа автоматически приводит гистограмму этого распределения. Помимо этого, LHDetect2 измеряет площадь, занятую каждым объектом на изображении.

жении, и общую площадь трихом. Площадь трихомы на изображении пропорциональна ее объему в пространстве, этот параметр позволяет сравнить объемы трихом разных образцов.

Пример получения количественных характеристик опушения из изображения сгиба листа

Используя стандартное изображение сгиба листа, мы выставили следующие параметры (см. рис. 4, а): единицы измерения – User (заданы пользователем), название единиц – мкм (mkm), размер изображения в 2730 мкм. Шаг расчета длины трихом – 50 мкм.

В результате анализа изображения получаем суммарные данные (см. рис. 4, б, 1), гистограмму распределений трихом по длине (см. рис. 4, б, 2), а также данные о каждой трихоме (см. рис. 4, б, 3).

Характеристика полученных данных:

- 1 пиксель = 2.10 мкм – размер пикселя изображения в единицах, заданных пользователем (микрометры);
- число трихом: 21 – число трихом, распознанных на изображении;
- площадь трихом: 27044.85 мкм² – суммарная площадь трихом в единицах, заданных пользователем;
- средняя площадь трихом: 1287.85 мкм² – усредненная площадь трихом в единицах, заданных пользователем;
- длина трихом:

76.205,	276.686,	350.725,	132.981,	68.015,
33.665,	23.1,	149.797,	27.766,	95.068,
87.035,	86.902,	48.795,	336.104,	84.583,
189.426,	61.395,	500.732,	374.189,	50.247

- длины всех распознанных на изображении трихом в единицах, заданных пользователем;
- средняя длина трихом: 152.67 мкм – усредненная длина трихом в единицах, заданных пользователем;
- распределение трихом по длинам:

0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
4	8	2	1	0	1	1	2	0	0	1

В первой строке отмечены значения длины начала интервала, во второй – количество трихом, попавших в этот интервал. На приведенном интервале можно заметить, что четыре трихомы принадлежат интервалу длин (0; 50) мкм, восемь трихом – интервалу (50; 100) мкм, две трихомы имеют длину в интервале (100; 150) мкм.

Далее приведены значения площади (Area), длины (Length), расстояния до соседней трихомы (Distance to the last trichome), координат верхушки (Head), основания (Foot) для каждой трихомы. Значение Complex = 1 означает, что трихома пересекается на изображении с другой трихомой. Пример для двух трихом:

Contour:3 area:923.500 complex:0 trichome count:1
Head pixel 1
Distance to the last trichome: 203.899
Length: 131.755
507 753
Foot pixel 2
625 802
625 792
Contour:4 area:2292.000000 complex:1 trichome count:2
Head pixel 2

Distance to the last trichome: 77.242

Length: 167.011

457 719

Distance to the last trichome: 0.000

Length: 63.324

563 755

Foot pixel 4

625 747

624 729

624 726

624 717

4. Анализ данных

В результате обработки серии изображений получаются серии данных, структурированных, как показано на рис. 4, б. Основные характеристики опушения – длина трихом и их количество – являются удобными для работы признаками, а распределение трихом по длинам позволяет провести подробный анализ морфологии опушения листа. Для надежной оценки опушения листа конкретного растения или листа необходимо сделать серию сгибов (не менее трех) и получить по два изображения каждого сгиба. Это уменьшит ошибку, связанную с вероятностью попадания трихом на сгиб (Genaev et al., 2012).

Рассмотрим пример анализа данных, полученных в ходе обработки образцов 35 сортов картофеля из работы А.В. Дорошкова и коллег (2016). Для работы с данными распределения трихом по длинам необходимо перенести в файл Excel и усреднить значения серии измерений одного и того же генотипа по каждому интервалу. Пример таблицы данных приведен в Доп. материалах¹ (рис. 5). Полученные результаты могут быть использованы для сравнения количества трихом разных интервалов длин между генотипами. На рисунке видно, что у сортов Брянский деликатес и Гусар отсутствуют трихомы менее 42 мкм, тогда как у сортов Великан и Вымпел эти трихомы представлены. Из таких распределений легко получить оценку среднего числа трихом для сорта (сумма всех элементов строки) и средней длины трихом (сумма произведений элементов строки на середину интервала длин). Примеры далее приведены по данным (Дорошков и др., 2016).

Пример расчета средней длины и числа трихом

Среднее число трихом для сорта Великан = G3 + H3 + I3 + J3 + K3 + L3 + ... (см. Доп. материалы (рис. 5)); средняя длина трихом для сорта Великан = G3 × G1 + H3 × H1 + I3 × I1 + J3 × J1 + K3 × K1 + L3 × L1 + ...

Для любой экспериментальной выборки сортов или растений эти данные информативно представлять в виде распределений и диаграммы рассеяния.

Пример построения гистограмм распределения сортов по количеству и средней длине трихом

Пример приведен на рис. 6 (см. Доп. материалы). Для описания распределений и их сравнения между выборками необходимо рассчитывать характеристики каждого из распределений, такие как минимум, максимум, медиана, среднее значение, дисперсия, стандартное отклонение. Взаимодействие двух признаков можно оценить с помо-

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 3 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20/appx6.pdf>

щью корреляционного анализа и диаграммы рассеяния. Диаграмма рассеяния средней длины и числа трихом приведена в Доп. материалах (рис. 7). В выборке данных из примера не наблюдается значимой линейной зависимости между числом трихом и их средней длиной: коэффициент корреляции составил 0.147 ($p < 0.39$).

Анализ сходства сортов по распределениям трихом по длинам можно проводить при помощи метода главных компонент либо кластерного анализа. В Доп. материалах (см. рис. 7, б) приведен пример анализа главных компонент для характеристик опушения у 35 сортов картофеля из коллекции СибНИИРС в многомерном пространстве числа трихом в различных интервалах длин. На две главные компоненты приходится 58 % дисперсии: 43 % на первую и 15 % на вторую.

Коэффициент корреляции Пирсона между весами первой компоненты и числом трихом составил 0.9, а длиной трихом -0.43 . Таким образом, увеличение первой компоненты характеризует увеличение числа трихом при уменьшении их длины. Из рисунка видно, что наибольшее значение первой компоненты наблюдается для наиболее опушенных сортов (Великан, Танай, Кемеровчанин, Танго), которые преимущественно имеют умеренные и малые длины трихом. Что касается второй компоненты, то оказалось, что ее веса отрицательны для числа трихом в интервалах длин 42–200 мкм и положительны для числа трихом в интервалах длин 200–400 мкм. Таким образом, вторая компонента отражает преобладание в опушении трихом умеренной длины. Например, у сорта Танго преобладают короткие трихомы (~100 мкм), а у сорта Великан – умеренной длины (~200 мкм). Сорта Великан, Танай, Кемеровчанин и Танго характеризуются наибольшим разбросом в пространстве главных компонент, т.е. демонстрируют наибольшие отклонения по свойствам опушения листьев по отношению к основной массе исследованных растений. Умеренная доля объясненной дисперсии для первых двух компонент (~60 %) указывает, что изменчивость опушения листьев картофеля является комплексной величиной и не может быть сведена к изменению лишь небольшого числа параметров, таких как число трихом и их средняя длина.

Методы высокопроизводительного фенотипирования заняли важную нишу в генетической и селекционной работе. Они позволяют делать масштабные эксперименты со значительной экономией ресурсов (Афонников и др., 2016). Настоящий подход к анализу количественных характеристик опушения был неоднократно использован нами и показал себя как эффективный метод не только в задачах анализа коллекций (Дорошков и др., 2016), но и в решении эволюционных (Pshenichnikova et al., 2016) и генетических (Genaev et al., 2012; Doroshkov et al., 2016) задач. Представленный протокол делает доступным использование метода анализа количественных характеристик опушения листа картофеля широкой аудитории генетиков и селекционеров, работающих с картофелем.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0006 “Collection of crop genotypes for academic

research in plant genetics and development of genetic technologies for marker-assisted and genomic selection”. The development of the modified algorithm for phenotyping potato trichomes and of LHDetect2_potato software was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-37-00304-mol_a. The authors are grateful to the staff of the Shared Access Center for Microscopy of Biologic Objects, Novosibirsk for access to the equipment.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput phenotyping of plants for large-scale breeding experiments. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2016;52(7):788-803. DOI 10.7868/s001667581607002x. (in Russian)
- Doroshkov A.V., Afonnikov D.A., Dobrovolskaya O.B., Pshenichnikova T.A. Interactions between leaf pubescence genes in bread wheat as assessed by high throughput phenotyping. *Euphytica*. 2016; 207(3):491-500. DOI 10.1007/s10681-015-1520-2.
- Doroshkov A.V., Simonov A.V., Safonova A.D., Afonnikov D.A., Likhenko I.E., Kolchanov N.A. Quantitative assessment of potato pubescence by analysis of digital microimages. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2016;30(10):12-14. (in Russian)
- Fasulati S.R., Limantseva L.A., Ivanova O.V., Rogozina E.V. Extensive drug resistance to Colorado potato beetle, potato ladybird, and yellow potato cyst nematode. *Zashchita i karantin rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2011;10. (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.
- Genaev M.A., Doroshkov A.V., Pshenichnikova T.A., Kolchanov N.A., Afonnikov D.A. Extracting quantitative characteristics of wheat leaf hairiness using image processing technique. *Planta*. 2012;236(6): 1943-1954. DOI 10.1007/s00425-012-1751-6.
- Gregory P., Tingey W.M., Ave D.A., Bouthyette P.Y. Potato glandular trichomes: a physicochemical defense mechanism against insects. In: Maurice B., Green P., Hedin A. (eds) *Natural resistance of plants to pests*. Am. Chemical Society, Washington, 1986;296:160-167.
- Kennedy G.G. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Ann. Rev. Entomol.* 2003;48(1):51-72. DOI 10.1146/annurev.ento.48.091801.112733.
- Maharijaya 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.
- Pshenichnikova T.A., Doroshkov A.V., Simonov A.V., Afonnikov D.A., Börner A. Diversity of leaf pubescence in bread wheat and relative species. *Gen. Resour. Crop Evol.* 2016;1-13. DOI 10.1007/s10722-016-0471-3.
- 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.1365-313x.2008.03432.x.
- Simmons A.T., Gurr G.M. Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agricultur. Forest Entomol.* 2005;7(4):265-276. DOI 10.1111/j.1461-9555.2005.00271.x
- Tingey W.M., Plaisted R.L., Laubengayer J.E., Mehlenbacher S.A. Green peach aphid resistance by glandular trichomes in *Solanum tuberosum* x *S. berthaultii* hybrids. *Am. Potato J.* 1982;59(6):241-251. DOI 10.1007/BF02856560.