



Д.А. Афонников*, А.В. Дорошков*,
М.А. Генаев*, Т.А. Пшеничникова*

Анализ опушения листа пшеницы с помощью методов высокопроизводительного фенотипирования

Опушение листа у пшеницы *Triticum aestivum* L. является важным фенотипическим признаком и состоит из структурно однородных трихом, различающихся по размерам. Оно имеет большое адаптационное и физиологическое значение. Сильно опушенные сорта пшеницы значительно более устойчивы к засухе и поражению вредными насекомыми. Поэтому для целенаправленного получения сортов, приспособленных к определенным климатическим зонам, необходимо вести отбор с учетом характеристик опушения листа.

До недавнего времени описание морфологии опушения было основано на визуальной или тактильной оценке. Такая оценка являлась ненадежной и требовала, чтобы вся работа была выполнена одним специалистом. Для определения морфологических характеристик опушения листьев пшеницы нами была разработана технология высокопроизводительного фенотипирования. Она основана на анализе цифровых изображений сгиба листа, полученных при помощи микроскопа (рис. 1). Разработаны алгоритм и компьютерная программа LHDetect (<http://wheatdb.org/lhdetect>), которая по цифровому изображению позволяет оценить число трихом и их распределение по длине. Время обработки одного образца при помощи нашей технологии занимает около 1 минуты. Это позволяет проводить массовое фенотипирование растений.

Алгоритм оценки степени опушенности может обрабатывать цветные изображения листа. Лист располагается с одной стороны микрофотографии, а его граница проходит приблизительно посередине изображения вертикально (рис. 2). Изображения подаются на вход алгоритма в формате битовых карт. Работа алгоритма состоит из нескольких этапов:

- определение цветных характеристик области фона и листа;
- определение границы листа;
- подсчет числа трихом на различной удаленности от границы листа;
- пошаговое смещение и формирование вектора чисел пересечений с трихомами на разных удалениях от листа;
- пересчет чисел пересечений с трихомами в вектор распределения трихом по длине.

При помощи данного подхода мы провели анализ растений сортов Саратовская 29 (сильноопушенный), Голубка (среднеопушенный) и линии 102/00i сорта Родина с интрогрессией генов контроля опушения от *Aegilops speltoides* Tausch (слабоопушенный). Результаты позволили выявить положительную корреляцию между числом трихом (N) и их средней длиной ($\langle L \rangle$) ($r = 0,93$; $p < 0,001$), т. е. более плотное опушение характеризуется большей средней длиной трихом. Среди растений одного сорта эта же закономерность наблюдается для сорта Голубка и линии 102/00i ($r = 0,77$, $p < 0,001$ и $r = 0,84$, $p < 0,005$ соответственно). Для сорта Саратовская 29 достоверной корреляции между N и $\langle L \rangle$ не выявлено (рис. 2, а). Кроме того, на примере сорта Голубка показано, что параметры линейной зависимости между числом трихом и их средней длиной зависят от условий среды (рис. 2, б). Для растений, выращенных в теплице и в поле, наблюдается линейная зависимость между N и $\langle L \rangle$ ($r = 0,77$, $p < 0,001$ для условий теплицы и $r = 0,63$, $p < 0,05$ для полевых условий). Интересно отметить, что углы наклона линий регрессии для зависимости N и $\langle L \rangle$ схожи (см. рис. 2, б). Статистический тест на однородность коэффициентов регрессии не позволяет отвергнуть гипотезу о параллельности этих линий ($P > 0,2$).

Результаты показали, что простота и низкая трудоемкость метода делают его выигрышным в задачах массового анализа морфологий опушения листьев пшеницы. Мы надеемся, что разработка подобных подходов в будущем позволит эффективно использовать огромный ресурс современных методов массового генотипирования растений в задачах поиска взаимосвязи генотип-фенотип.

Наша работа показала, что для эффективной обработки результатов массового фенотипирования растений необходима правильная организация хранения данных. Для решения этой задачи нами была разработана база данных WheatPGE (Wheat-Phenotype, Genotype and Environment, wheatdb.org). Эта база данных содержит информацию о фенотипах, генотипах и параметрах окружающей среды растений пшеницы.

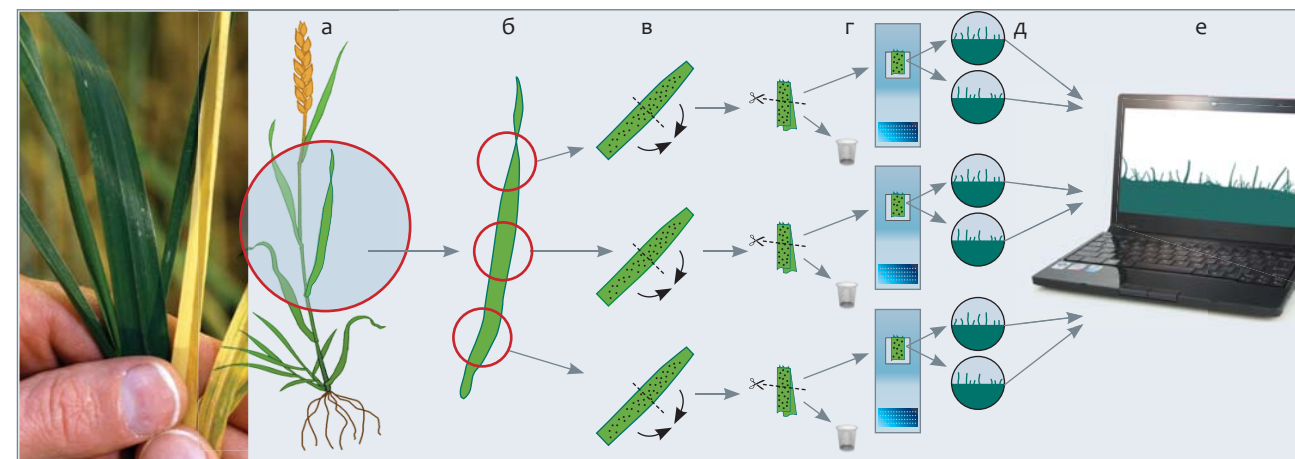


Рис. 1. Технология фенотипирования морфологии опушения листа пшеницы. Отбор предфлаговых листьев (а); выбор точек сгиба на листе (б); приготовление микропрепаратов (в); получение цифровых изображений в микроскопе (г); обработка изображений и анализ данных на компьютере (д); пример изображения трихом листа пшеницы сорта Голубка (е).

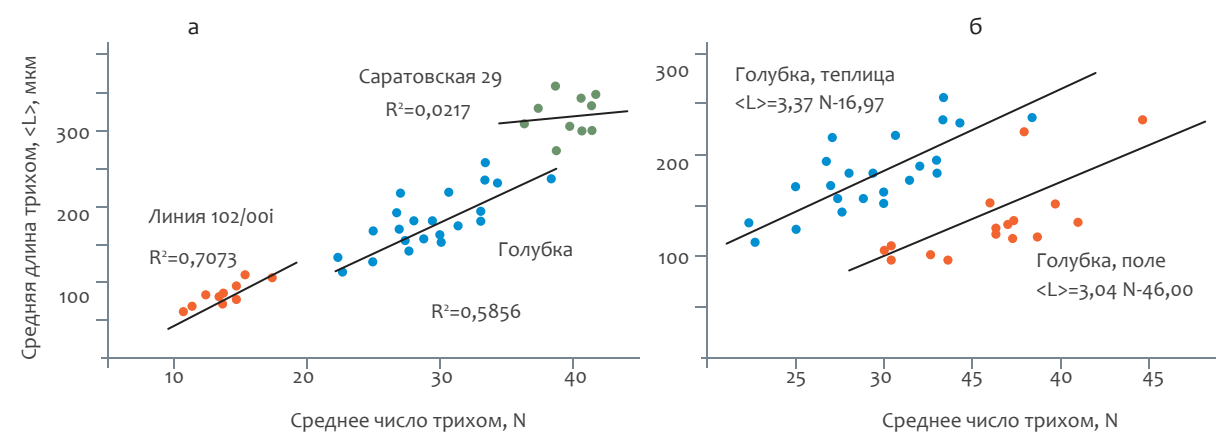


Рис. 2. Зависимость средней длины трихом на листе ($\langle L \rangle$, мкм, ось Y) от среднего числа трихом (N , ось X). Анализировались предфлаговые листья растений нескольких сортов и в разных условиях. а – зависимости для растений, произраставших в теплице: сорт Саратовская 29, сорт Голубка и линия 102/00i. Приведены значения квадратов коэффициентов корреляции. Показаны линии регрессии. б – зависимости для растений сорта Голубка, произраставших в условиях теплицы и полевых условиях. Показаны уравнения регрессии.