

*На правах рукописи*

Усков Александр Ириархович

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОВЫШЕНИЯ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОСПРОИЗВОДСТВА ИСХОДНОГО  
МАТЕРИАЛА В ОРИГИНАЛЬНОМ СЕМЕНОВОДСТВЕ КАРТОФЕЛЯ**

специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство  
сельскохозяйственных растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
доктора сельскохозяйственных наук

Москва – 2013 г.

Работа выполнена в отделе биотехнологии и иммунодиагностики ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г.Лорха Российской академии сельскохозяйственных наук в 1984-2012 гг.

- Официальные оппоненты:**
- Поляков Алексей Васильевич,**  
доктор биологических наук, профессор,  
ГНУ ВНИИО Россельхозакадемии,  
заведующий отделом биотехнологии
  - Березкин Анатолий Николаевич,**  
доктор сельскохозяйственных наук,  
профессор, РГАУ-МСХА им.К.А.Тимирязева
  - Киру Степан Димитрович,**  
доктор биологических наук, ГНУ ВИР  
Россельхозакадемии им.Н.И.Вавилова,  
заведующий отделом генетических ресурсов  
картофеля
- Ведущая организация:** Московский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Немчиновка»

Защита состоится «24» октября 2013 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.022.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте овощеводства по адресу: 140153, Московская область, Раменский район, д.Верея, строение 500, ВНИИО.

Факс (496) 462-43-64

E-mail: [vniioh@yandex.ru](mailto:vniioh@yandex.ru), Сайт: [www.vniioh.ru](http://www.vniioh.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института овощеводства.

Автореферат разослан «\_\_» сентября 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Девочкина Наталия Леонидовна

## **Общая характеристика работы**

**Актуальность темы.** Основой для регламентированной системы семеноводства картофеля служит производство оздоровленного исходного материала. Ввиду преимущественно вегетативного способа размножения культуры картофеля производство оздоровленного исходного материала одновременно выполняет функцию его воспроизводства.

Для успешного воспроизводства семенного картофеля необходимо определить стратегию мероприятий, соответствующую исходным требованиям и задачам и учитывающую биологические особенности культуры. Оздоровленный исходный материал должен быть свободным от патогенов и обладать физиологическим статусом, обеспечивающим максимальную энергию роста и продуктивность растений.

Во многих программах по воспроизводству основное внимание уделяется освобождению материала от патогенов без учета его физиологического состояния, что значительно снижает эффективность воспроизводства исходного материала.

Для ускорения использования в производстве новых перспективных сортов актуальны исследования по совершенствованию схемы получения исходных микрорастений, позволяющей сократить продолжительность культивирования в условиях *in vitro*.

Наряду с семеноводческими и агротехническими мероприятиями, обеспечивающими воспроизводство оздоровленного исходного материала картофеля, большой интерес вызывает применение специальных приемов, замедляющих процессы физиологического вырождения культуры путем целенаправленного воздействия на механизмы регуляции внутриклеточного обмена веществ. К таким приемам относится использование биологически активных веществ направленного действия.

Важное место в системе воспроизводства занимает использование современных лабораторных методов диагностики в целях идентификации и контроля латентных форм патогенов. При этом наряду с разработкой новых высокочувствительных методов существенное значение имеет методическое совершенствование схемы и норм лабораторного тестирования в процессе производства оздоровленного исходного материала.

**Цель и задачи исследований.** Основной целью исследований является разработка и совершенствование биотехнологических методов воспроизводства исходных растений и диагностики фитопатогенов, обеспечивающих производство высококачественного исходного материала в процессе оригинального семеноводства картофеля.

В задачи исследований входило:

- построить аналитическую модель изменения физиологического возраста генотипов в процессе репродуцирования для обоснования стратегии мероприятий по воспроизводству оздоровленного исходного материала для оригинального семеноводства картофеля;

- усовершенствовать технологический процесс воспроизводства оздоровленного исходного материала картофеля на основе сочетания полевых и лабораторных методов освобождения от патогенов;
- разработать порядок формирования и поддержания коллекции оздоровленных сортообразцов;
- разработать схему получения исходных микрорастений, позволяющую сократить продолжительность культивирования в условиях *in vitro* и ускорить использование оздоровленного материала в программах по размножению новых перспективных сортов картофеля;
- изучить влияние направленного применения биологически активных веществ нового поколения на рост, развитие и продуктивность оздоровленных растений в процессе оригинального семеноводства картофеля;
- отработать элементы технологии размножения оздоровленного исходного материала с использованием биотехнических средств;
- изучить влияние и способы применения новых нанопродуктов с геропротекторными свойствами (ионов Скулачева) в оригинальном семеноводстве картофеля;
- провести обоснование новой схемы контроля фитопатогенов, предусматривающей значительное увеличение норм лабораторного тестирования в процессе размножения оздоровленного материала;
- разработать методы лабораторной идентификации фитопатогенов для проведения рутинного и экспресс- тестирования семенного материала на основе иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунохроматографии на тест-полосках (ИХА).

***Научная новизна исследований.*** Впервые предложена аналитическая модель изменения физиологического возраста генотипов в процессе репродукции, позволяющая обосновать стратегию мероприятий по воспроизводству оздоровленного исходного материала для оригинального семеноводства картофеля.

Показана эффективность комплексного использования полевых и лабораторных методов для воспроизводства и размножения высококачественного исходного семенного материала. Проведено экспериментальное обоснование технологического процесса воспроизводства и размножения исходного материала на основе сочетания полевых и лабораторных методов освобождения от патогенов.

Сформулированы принципы и предложена модель формирования и поддержания коллекции оздоровленных сортообразцов, обеспечивающая сохранение сортовых характеристик, статуса здоровья и высокой продуктивности поддерживаемых в коллекции перспективных сортов и гибридов картофеля.

Выявлено преимущество в росте, развитии и продуктивности исходного материала, полученного с использованием оптимизированной

одногодичной схемы воспроизводства по сравнению с двухлетней базовой схемой.

Изучена эффективность направленного использования регуляторов роста нового поколения при размножении оздоровленного исходного материала в различных почвенно-климатических условиях Российской Федерации.

Отработаны элементы технологии размножения оздоровленного исходного материала с использованием современных биотехнических средств на гидропонной и ионитопонной культуре.

Впервые изучено влияние новых нанопродуктов с геропротекторными свойствами (ионов Скулачева) на приживаемость эксплантов, процессы морфо- и ризогенеза ростковых черенков, рост и развитие микрорастений в культуре *in vitro*. Проведены испытания препаратов на основе ионов Скулачева при выращивании оздоровленного исходного материала в условиях защищенного грунта и в полевой культуре в различных почвенно-климатических условиях Российской Федерации.

Проведена сравнительная оценка накопления вирусной инфекции при размножении исходного материала, полученного с использованием тотального (100%) и выборочного по ГОСТ 29267 (1%) лабораторного тестирования. Экспериментально обоснована необходимость увеличения норм лабораторного тестирования в целях контроля качества и сертификации оригинального семенного картофеля.

Впервые разработаны отечественные тест-системы для рутинной (ИФА) и экспресс- (ИХГА) лабораторной идентификации вирусов картофеля в процессе воспроизводства и размножения семенного материала. Отработана методика тестирования листовых и клубневых проб и проведен мониторинг качества семенного картофеля, выращиваемого в различных регионах Российской Федерации.

**Практическая значимость результатов исследований и их реализация.** Проведено обоснование стратегии мероприятий по воспроизводству оздоровленного исходного материала для оригинального семеноводства картофеля на основе разработанной аналитической модели изменения физиологического возраста генотипов в процессе репродукции. Показана необходимость осуществления мероприятий по воспроизводству на ранних стадиях селекционного процесса.

Усовершенствован технологический процесс воспроизводства и размножения высококачественного исходного семенного материала на основе использования комплекса полевых и лабораторных методов. По материалам исследований в 2000 г. Минсельхозом России изданы рекомендации "Новые технологии производства оздоровленного исходного материала в элитном семеноводстве картофеля" (рассмотрены и одобрены Научно-техническим советом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации – протокол № 18 от 14 июля 2000 г.).

Проведена практическая работа по формированию и поддержанию двухуровневой коллекции оздоровленных сортообразцов, используемых в производственных программах по размножению новых перспективных сортов и гибридов картофеля (1996-2000). Проведено ежегодное обновление генобанка за счет выбраковки линий с признаками вырождения и введения в культуру *in vitro* новых здоровых линий и клонов.

Разработана одногодичная схема получения исходных микрорастений, позволяющая сократить продолжительность культивирования в условиях *in vitro* до 3-4 пассажей и обеспечивающая повышение урожайности и количественного выхода стандартной семенной фракции клубней в оригинальном семеноводстве картофеля. Данная схема позволяет ускорить использование оздоровленного материала в программах по размножению новых перспективных сортов картофеля.

Предложена схема комплексного использования регуляторов роста нового поколения, обеспечивающая производство высококачественного исходного материала в различных почвенно-климатических условиях Российской Федерации. Схема предусматривает применение фумара (0,1 мг/л) для стимулирования развития корневой системы на заключительной стадии клонального микроразмножения (фаза адаптации), этамона (10 мг/л) и эпина (0,25 мг/л) для преодоления стрессов при трансплантации *ex vitro* и фумара (1 мг/л) и эпина (0,25 мг/л) для синхронизации клубнеобразования и антистрессовой устойчивости при полевом размножении исходного материала.

В рамках Совместной Российско-Белорусской подпрограммы «Повышение эффективности производства картофеля и картофелепродуктов на 1998-2000 гг.» проведены испытания и даны рекомендации по использованию гидропонной установки «Минивит-2» (ДОКА – генные технологии, г.Зеленоград, Россия) и ионитопонной установки БТК-1 (ИЭБ РАН, г.Минск, Беларусь) при размножении оздоровленных микрорастений путем нестерильного черенкования.

Определена оптимальная концентрация препарата SkQ1 (ионов Скулачева), стимулирующая процессы морфогенеза эксплантов и ростковых черенков картофеля и сокращающая время регенерации исходных микрорастений в культуре *in vitro*. Выявлены оптимальные нормы и способы применения препаратов на основе ионов Скулачева при размножении исходного материала в защищенном грунте и в полевой культуре.

Экспериментально обоснована новая схема вирусологического контроля для сертификации различных классов и поколений семенного картофеля, предусматривающая значительное увеличение норм лабораторного тестирования исходного материала. Предложены нормы, методы и схема лабораторного тестирования различных категорий и классов семенного картофеля для нового национального стандарта Российской Федерации «Картофель семенной. Приемка и методы анализа» (2013 г.).

Освоено коммерческое производство иммуноферментных диагностических наборов 12 наименований, обеспечивающее в настоящее время проведение ежегодно порядка 300-500 тыс. определений в системе контроля качества и сертификации семенного картофеля. Создана и получила аккредитацию в Системе добровольной сертификации «Россельхозцентр» испытательная лаборатория, проводящая ежегодно оценку 20-25 тысяч образцов семенного картофеля из различных регионов Российской Федерации.

Проведены производственные испытания разработанных в рамках совместного проекта с МГУ, ИФХБ им. А.Н.Белозерского и ЗАО НВО «Иммунотех» (2008-2010 гг.) отечественных иммунохроматографических тест-систем для экспресс-диагностики X-, M- и Y-вирусов картофеля. Чувствительность определения патогенов составила 2-8 нг/мл, а время детекции не превышало 10-20 минут.

***Основные научные положения, выносимые на защиту:***

1. Стратегия мероприятий по воспроизводству оздоровленного исходного материала для оригинального семеноводства картофеля.
2. Технологический процесс воспроизводства оздоровленных исходных растений новых перспективных сортов и гибридов картофеля.
3. Биотехнологические приемы размножения оздоровленных исходных растений с использованием современных биотехнических гидропонных и ионитопонных комплексов и биологически активных веществ нового поколения.
4. Применение новых нанопродуктов с геропротекторными свойствами (ионов Скулачева) в оригинальном семеноводстве картофеля.
5. Новая схема лабораторного контроля для оценки качества и сертификации семенного картофеля.
6. Новые высокоэффективные методы лабораторной диагностики фитопатогенов для рутинного и экспресс-тестирования семенного картофеля.
7. Мониторинг качества семенного картофеля, выращиваемого в различных регионах Российской Федерации.

***Апробация работы.*** Результаты исследований представлены, доложены и обсуждены на международных симпозиумах и всероссийских научно-практических конференциях (С.-Петербург, 1995; Коренево, 1999; Минск, 2000; Москва, 2000; Саранск, 2001; Москва, 2001; Москва, 2002; Пенза, 2003; Минск, 2003; Уфа, 2003; Кострома, 2005; Минск, 2005; С.-Петербург, 2005; Москва, 2007; Брашов, 2008; Кисловодск, 2008; Нальчик, 2009; Москва, 2009; Чебоксары, 2009; Москва, 2011; Чебоксары, 2012; Саранск, 2012), а также ежегодно на заседаниях Ученого Совета ВНИИКХ (1984-2012 гг.).

***Личный вклад соискателя.*** Исследования выполнены в отделе биотехнологии и иммунодиагностики Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства имени А.Г.Лорха в

рамках планов НИОКР ВНИИКХ в период 1984-2012 гг., по решению отраслевых научно-технических программ по картофелю: 0.51.17 «Разработать и внедрить технологические процессы производства картофеля в свежем и переработанном виде на основе применения новых сортов, комплексов машин, оборудования и сооружений на 1986-1990 гг.» *задание 02*. Разработать и усовершенствовать методы получения свободного от вирусов исходного материала» на 1986-1990 гг. (№ гос.регистрации 0186.0195787); «Разработать и освоить в производстве экологически безопасные технологии возделывания, уборки, хранения и переработки картофеля на основе создания новых высокопродуктивных сортов и оздоровленного семенного материала, средств механизации, системы защиты картофеля от вредителей и болезней, совершенствования форм организации труда на 1992-1995 гг.» *задание 02*. Усовершенствовать систему иммунодиагностики вирусов и бактерий картофеля для использования в селекционно-семеноводческой работе (№ гос.регистрации 01.9.30005938); «Разработать экологически безопасные средне- и низкочатратные энергосберегающие зональные технологии возделывания, послеуборочной обработки, хранения и переработки картофеля на основе использования новых высокопродуктивных сортов, оздоровленного посадочного материала, эффективных средств механизации и прогрессивных форм организации труда на 1996-2000 гг.» *задание 02*. Разработать систему безвирусного семеноводства картофеля на основе высокоэффективных технологий оздоровления и современных методов диагностики патогенов, получения устойчивых к вирусам форм методами биотехнологии (№ гос.регистрации 01.990.0 05200); Программ фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации на 2001-2005 гг. *задание 17.02*. Установить механизм управления продуктивностью и качеством семенного картофеля в системе оригинального семеноводства на основе использования новых высокоэффективных технологий оздоровления, методов диагностики, сертификации и технологий выращивания исходного и элитного материала (№ гос.регистрации 01.200109657), и на 2006-2010 гг. *задание 04.15.02*. Совершенствование семеноводства картофеля на основе современных технологий оздоровления сортов, эффективных методов сортового и семенного контроля, фитосанитарного мониторинга и комплексного применения агроприемов, ограничивающих распространение фитопатогенов в процессе производства оригинального, элитного и репродукционного семенного картофеля (№ гос.регистрации 01.200601990); Плана фундаментальных и приоритетных прикладных исследований Россельхозакадемии по научному обеспечению развития АПК Российской Федерации на 2010-2015 годы *задание 04.15.02*. Усовершенствовать систему семеноводства высококачественного семенного картофеля на основе исходного материала, освобожденного от вирусных, виридных и бактериальных фитопатогенов на основе методов биотехнологии и

улучшающих клоновых отборов с применением современных высокоточных тест-систем иммунодиагностики и ПЦР-технологии (№ гос.регистрации 01.201153998), а также совместной Российско-Белорусской подпрограммы «Повышение эффективности производства картофеля и картофелепродуктов на 1998-2000 гг.» (№ гос.регистрации 01.980.0 09029).

Автором лично проведено обобщение литературы по разделам диссертации, планирование научных исследований, разработка программ и методик, схем полевых и лабораторных опытов и участие в их выполнении; выполнена статистическая обработка полученных данных и анализ результатов исследований, подготовлены научные отчеты, доклады, статьи.

**Публикации по результатам исследований.** Основные положения диссертации опубликованы в 114 научных работах, в том числе 22 работы – в научных журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ и 4 авторских свидетельства на сорта.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, предложений для производства, списка использованной литературы, приложений.

Работа изложена на 313 страницах компьютерного текста, включает 88 таблиц, 43 рисунка, 7 приложений, 7 копий документов. Список использованной литературы включает 329 наименований, в том числе 166 иностранных авторов.

За помощь при оформлении диссертационной работы автор выражает искреннюю благодарность доктору сельскохозяйственных наук, профессору, заслуженному деятелю науки РФ И.М.Яшиной, доктору сельскохозяйственных наук Е.А.Симакову, а также кандидатам биологических наук Б.В.Анисимову, Ю.А.Варицеву, доктору химических наук Ю.Ф.Дрыгину, кандидатам химических наук А.Н.Блинцову, А.П.Осипову, В.Г.Григоренко, И.Н.Андреевой, кандидатам сельскохозяйственных наук В.В.Бойко, Д.В.Кравченко, Е.В.Овес, Ю.В.Горяникову, П.А.Галушка, старшему научному сотруднику Г.П.Варицевой, аспирантам А.Б.Боброву, О.Ю.Теслюк, Д.В.Толоконцеву О.А.Нестеровой и всем сотрудникам отдела биотехнологии и иммунодиагностики за совместный творческий процесс в ходе выполнения НИР.

## **Глава 1. Материал, методика и условия проведения исследований**

Исследования по совершенствованию комплекса методических и технологических аспектов воспроизводства исходного материала для семеноводства картофеля проведены в 1984-2012 гг. во Всероссийском НИИ картофельного хозяйства им. А.Г.Лорха.

Изучение способов получения оздоровленных исходных растений (basic plants), минимизирующих риски проявления признаков вырождения, проводили в 1996-2000 гг. в рамках ежегодных программ по оздоровлению

сортов и перспективных гибридов картофеля селекции ВНИИКХ и путем постановки специальных опытов.

За период исследований работа проводилась по линиям и клонам 65 сортов и гибридов: Жуковский ранний, Удача, Лукьяновский, Никулинский, Ильинский, Резерв, Ресурс, Десница, Аспия, Вестник, Пранса, Эффект, Белоснежка, Голубизна, Осень, Россиянка, Загадка, Москворецкий, Успех, Соболевский, Юбилей Жукова, Самарский, Мастер, Акроссия, Симбирянин, Скороплодный, Невский, Луговской, Санте, Романо, Ласунак, Адретта, Пушкинец, Елизавета, Петербургский, Весна, Калинка, Талисман, Родник, Лорх, Бронницкий, Выток, Корона, Букет, Олимп, Победа, Красная роза, Накра, Белоусовский, Брянская новинка, Розара, Красноярский, Рождественский, Волжанин, Сотка, Темп, Заворовский, Детскосельский, Колобок, Раменский, Гибрид 8137-71, Гибрид 2-812, Гибрид 4-9, Гибрид 946-2.

Опыты по обоснованию схемы воспроизводства с ежегодным получением оздоровленных исходных растений и сокращением времени культивирования микрорастений до 3-4 черенкований закладывали в 2005-2010 гг. с использованием сортов картофеля с различной длиной вегетационного периода: Жуковский ранний – 70-80 дней (супер-ранний), Крепыш -80-90 дней (ранний), Невский – 100-115 дней (среднеранний), Голубизна – 115-125 дней (среднеспелый), Никулинский – 125-140 дней (среднепоздний).

Отбор базовых клонов проводили в 2006-2009 гг. в питомниках оригинального семеноводства ООО «Агрофирма «КРиММ» Упоровского района Тюменской области (с. Жуковский ранний) и СПК «Агрофирма «Элитный картофель» Раменского района Московской области (с. Крепыш, Невский, Голубизна, Никулинский).

Работы, связанные с культурой тканей, проводили по методике, изложенной в рекомендациях «Новые технологии производства оздоровленного исходного материала в элитном семеноводстве картофеля» (2000).

Отработку элементов технологии размножения оздоровленного исходного материала с использованием биотехнических средств проводили на гидропонной установке "Минивит-2" («ДОКА – генные технологии», г. Зеленоград), и установке БТК-1 (ИЭБ РАН РБ, г. Минск) с ионнообменным субстратом (БИОНА).

В рамках совершенствования технологии размножения оздоровленного исходного материала изучали применение специфических биологически активных веществ (БАВ), обладающих направленным воздействием на процессы обмена веществ, рост и развитие растений.

Эпин (эпибрассинолид) – препарат антистрессового действия, разработан Институтом биоорганической химии совместно с Институтом картофелеводства НАН Беларуси (г. Минск), разрешен для применения на картофеле: для обработки клубней 20 мл/т, с расходом рабочего раствора 5 л/т., для опрыскивания растений в период вегетации 80 мл/га с расходом

300 л/га; для добавления в искусственную питательную среду МС в концентрации 0,25 мг/л.

Фумар (диметиловый эфир аминифумаровой кислоты) - разработан Институтом химической физики РАН (г. Москва), известен как индуктор синтеза эндогенных растительных гормонов (Просьяник и др., 1995). Для обработки клубней и опрыскивания растений использовали раствор фумара в концентрации 1 мг/л (рекомендация разработчиков) ("Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации" 2001-2004 гг., 1992 г.).

Этамон (диметилфосфорнокислый диметилдигидроксиэтиламмоний), синтезированный во ВНИИХЗР препарат – известен как интенсификатор внутриклеточного питания (Жирмунская и др., 1991; Шаповалов, Зубкова, 2003). Для опрыскивания растений использовали раствор препарата в концентрации 10 мг/л.

Синтезированные в НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского (МГУ) препараты SkQ представляют собой соединения катионов трифенилдецилфосфония и аналогов пластохинона хлоропластов. Они различаются по проникающей способности и соотношению анти- и прооксидантной активности (Скулачев, 2005). В наших исследованиях наибольшее воздействие на культуру картофеля *in vitro* выявлено при использовании препарата SkQ1 (10- (6' - пластохинонил) децилтрифенилфосфониум).

Полевые опыты по изучению влияния специфических БАВ на рост, развитие и продуктивность растений картофеля закладывали в семеноводческих питомниках ВНИИКХ (Московская область), Костромской СХА (п.Каравеево Костромской области) и КЧ НИИСХ (Зеленчукский район Карачаево-Черкесской республики). Опытные участки в предгорной зоне Северного Кавказа располагались на высоте 800 (СПК «Сторожевая») и 1100 (СПК «Маруха») метров над уровнем моря.

Полевые исследования и математическую обработку результатов опытов проводили в соответствии с методиками исследований по культуре картофеля (Андрюшина и др., 1967; Воловик и др., 1995) и с использованием дисперсионного анализа по Б.А.Доспехову (1985).

Для лабораторного тестирования (ИФА) семенного материала при отработке новой схемы лабораторного контроля фитопатогенов в оригинальном семеноводстве картофеля использовали образцы, выращенные как в условиях защищенного грунта (теплицы), так и на открытых изолированных вегетационных площадках в рамках производственных программ по размножению сортов и перспективных гибридов селекции ВНИИКХ и программ других селекционных учреждений.

Разработку отечественной тест-системы «сэндвич-варианта» иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли в 1982-84 гг. в рамках комплексной целевой программы «Биотехнология» на основе совместных

исследований Биологического факультета МГУ, Института биоорганической химии РАН и ВНИИКХ.

Технологические аспекты использования ИФА в практической селекционно-семеноводческой работе отрабатывали путем постановки специальных опытов и в процессе проведения рутинных анализов на базе Испытательной лаборатории ВНИИКХ в Системе сертификации семян (1996-2012 гг.).

Отечественные иммунохроматографические тест-системы для визуальной экспресс-диагностики вирусных инфекций картофеля на поликомпонентных мембранных тест-полосках разрабатывали в 2008-2010 гг. в рамках совместного проекта кафедры вирусологии биологического факультета МГУ, ИФХБ им.А.Н.Белозерского, ЗАО НВО "Иммунотех" и ВНИИКХ.

Для экономической оценки результатов исследований использовали «Методические рекомендации по определению общего экономического эффекта от использования результатов НИОКР в агропромышленном комплексе (Полунин, Гарист, Князева, 2007).

## **Результаты исследований**

### **Глава 2. Совершенствование технологического процесса воспроизводства оздоровленных исходных растений**

**Обоснование стратегии мероприятий по воспроизводству оздоровленного исходного материала.** Для культуры картофеля, характеризующейся вегетативным способом размножения, физиологический статус семенных клубней, обеспечивающий энергию роста почек и продуктивные возможности растений, определяется их возрастом (Van der Zaag, Van Loon, 1987). Физиологический возраст клубней развивается поступательно с увеличением хронологического возраста (Kawakami, 1952), но зависит также от условий выращивания и хранения (Caldiz, et al., 2001; Afek, Kays, 2004; Struik, 2007).

В масштабных исследованиях по изучению физиологического возраста клубней картофеля, проведенных на рубеже 70-80 годов XX века Голландской рабочей группой в рамках комплексной программы «Growth vigour of seed potatoes», было установлено, что энергия роста клубней в течение одного вегетативного поколения, выражаемая как объективными, так и интегральными показателями, после окончания периода покоя имеет тенденцию к росту и после достижения максимальных значений через определенное время начинает снижаться до первоначального уровня.

В конечном итоге урожайность культуры в полевых условиях была достоверно выше при использовании на посадку клубней с максимально высокой энергией роста (Van Loon, 1987). В этом случае целесообразно говорить о «горизонтальном» векторе возрастных изменений.

Рассматривая возрастные изменения физиологического состояния клубней в течение ряда вегетационных сезонов («вертикальный» вектор),

следует отметить, что, как правило, сорта картофеля постепенно теряют свою первоначальную продуктивность и сходят с арены, вырождаются.

Академик С.М.Букасов писал: «Лишь единичные сорта существуют более ста лет, немногие сорта существуют десятилетиями, большинство же сортов имеет мимолетное существование и, достигнув в несколько лет апогея своей славы, также быстро исчезают со сцены» (Букасов, 1937).

Для обоснования стратегии воспроизводства исходного материала для семеноводства картофеля важно учитывать «вертикальный» вектор возрастных изменений физиологического статуса генотипов.

Исходя из этого, нами была предложена аналитическая модель изменения потенциальной энергии роста генотипов в процессе репродукции.

На представленном графике значение  $VE_0$  соответствует уровню энергии прорастания семян, образовавшихся в результате направленного скрещивания родительских форм.

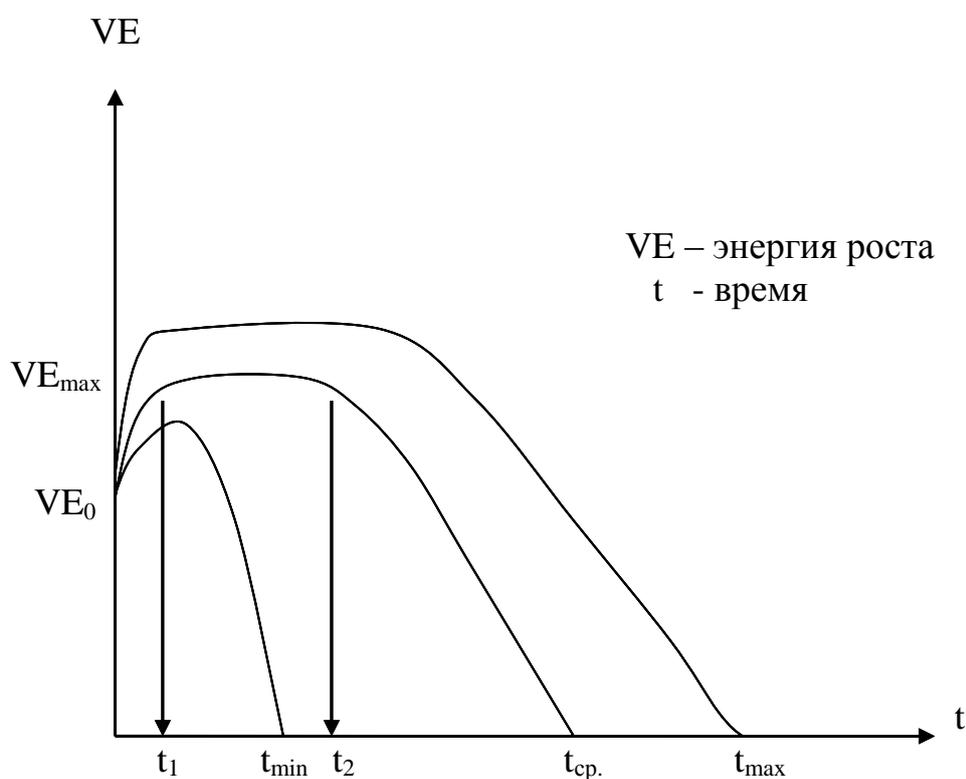


Рисунок 1 - График изменения потенциальной энергии роста генотипов в процессе репродукции

В начальный период вегетативного размножения у гибридного потомства реализуется программа адаптации к условиям произрастания, в результате чего потенциальная энергия роста ( $VE$ ) растений данного генотипа увеличивается, достигая за время  $t_1$  к концу периода адаптации плато максимального уровня ( $VE_{max}$ ), соответствующего наиболее продуктивному состоянию.

Продолжительность данного временного отрезка ( $t_1-t_2$ ) обусловлена рядом факторов:

- генетическими особенностями сорта,
- условиями выращивания, а также
- условиями хранения в период физиологического покоя.

Обеспечение условий возделывания в соответствии с биологическими требованиями культуры картофеля, а также безусловное соблюдение технологии хранения способствуют увеличению продолжительности периода интенсивного роста и максимальной продуктивности растений данного генотипа. И, напротив, стрессовые воздействия в период вегетации и физиологического покоя, нарушение технологий выращивания и хранения сокращают продолжительность периода  $t_1 - t_2$ .

После завершения стадии активного роста ( $t_2$ ) в совокупности вегетативных клонов генотипа начинают преобладать процессы фенотоза – запрограммированного старения и отмирания (Skulachev, 1999), в результате чего энергия роста растений и их продуктивность постепенно снижаются, достигая в конечном счете через время  $t_{cp}$  нулевой отметки.

Вследствие фенотипической неоднородности продолжительность онтогенеза вегетативных клонов, составляющих генотип, значительно варьирует: от  $t_{min}$  до  $t_{max}$ . В результате в одно и то же время в составе сорта присутствуют клоны, обладающие разным физиологическим статусом, с различной энергией роста и продуктивностью. Следует отметить, что величина данных различий прямо пропорциональна возрасту генотипа и может достигать кардинальных значений уже к середине периода активного роста большей части совокупности клонов.

Исходя из предложенной модели наиболее приемлемым временем для мероприятий по воспроизводству исходного материала является период активного роста и максимальной продуктивности растений в течение отрезка  $t_1 - t_2$ . При этом эффективность процесса будет тем выше, чем раньше будет начата работа, поскольку семеноводческие мероприятия по воспроизводству исходного материала способствуют лишь замедлению возрастных изменений физиологического статуса совокупности клонов, но не останавливают эти изменения полностью.

Строго говоря, мероприятия по воспроизводству исходного материала можно проводить и после окончания периода активного роста ( $t_2$ ). Однако, в этом случае требуется гораздо больше усилий для поиска стабильных продуктивных исходных клонов, а достигнутый оздоровительный эффект существенно ограничен по времени. Выражаясь образно, работа по воспроизводству исходного материала в этот период подобна труду Сизифа, пытающемуся катить тяжелый камень в гору.

Таким образом, для повышения эффективности процесса размножения новых перспективных сортов и гибридов картофеля мероприятия по воспроизводству исходного материала целесообразно максимально

приблизить к схеме селекционного процесса, начиная работы по воспроизводству с конкурсного испытания гибридов.

**Формирование и поддержание коллекции оздоровленных сортообразцов.** В целях повышения эффективности работы по воспроизводству перспективных гибридов и сортов картофеля нами была предложена схема формирования и поддержания двухуровневой коллекции оздоровленных исходных растений с периодической ротацией между полевым и *in vitro* уровнями (Усков, 2000; Усков и др., 2000).

В рамках данной схемы коллекционные сортообразцы, сохраняемые в культуре *in vitro*, ежегодно оценивали в полевых условиях по биологическим и хозяйственно-ценным признакам, на сортовую типичность и наличие патогенов в скрытой форме (Усков, Бойко Ю., Бойко В., 2000; Усков, Симаков, 2001).

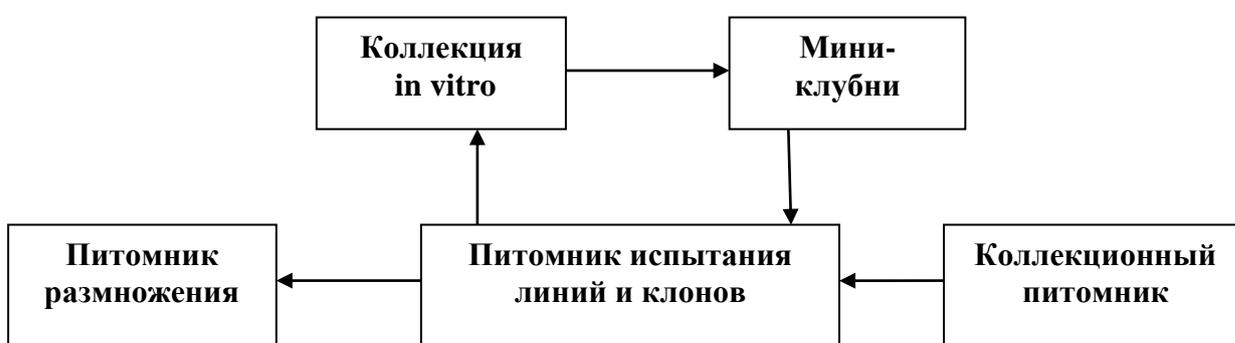


Рисунок 2 - Схема формирования и поддержания двухуровневой коллекции оздоровленных сортообразцов

Для пополнения коллекции новыми сортами, не оздоровленными через культуру тканей, и дополнительными линиями коллекционных сортообразцов закладывали полевой коллекционный питомник, в котором проводили предварительную оценку и отбор наиболее типичных и продуктивных клонов для последующей оценки в питомнике испытания клонов и введения затем в культуру *in vitro*.

В 1996-2002 гг. в рамках практической работы по формированию и поддержанию двухуровневой коллекции оздоровленных сортообразцов ВНИИКХ было оценено 16180 базовых полевых клонов по 65 сортам и гибридам отечественных и зарубежных селекционных учреждений. Производственная составляющая коллекции, используемая в ежегодных коммерческих программах по размножению оздоровленного исходного материала, в 2001-2002 годах насчитывала 56-58 сортообразцов по 15-16 наиболее востребованным и перспективным сортам (Отчет ВНИИКХ, 2000; 2002).

Таблица 1- Результаты работы по размножению оздоровленного исходного материала в системе ВНИИКХ за период 1996-2000 гг., тыс.шт.

Материал	Годы					Всего
	1996	1997	1998	1999	2000	
Микрорастения	26,9	27,8	61,2	72,9	90,4	279,2
Мини-клубни	38,2	43,9	107,5	150,0	250,2	589,2

В целом при выполнении производственных программ ВНИИКХ с использованием сформированной коллекции оздоровленных сортообразцов в период 1996-2000 гг. было произведено 279,2 тыс. оздоровленных микрорастений и 589,2 тыс. мини-клубней (таблица 1).

**Оптимизация схемы получения исходных микрорастений для ускоренного размножения новых перспективных сортов и гибридов картофеля.** В целях сокращения времени освоения производства новых перспективных сортов и гибридов нами была разработана одногодичная схема воспроизводства исходных микрорастений, которая включает следующие этапы:

- полевая оценка и покустный отбор базовых клонов с одновременной лабораторной оценкой на патогены;
- хранение клубней в течение 3 месяцев при 2-3<sup>0</sup>С;
- форсированное проращивание и введение базовых клонов в культуру *in vitro* с использованием специальных регуляторов роста.

Полученные с использованием одногодичной схемы воспроизводства микрорастения при пересадке в грунт как минимум не уступали по интенсивности роста, развитию и продуктивности материалу, произведенному в соответствие со стандартным протоколом.

Таблица 2 – Биометрическая оценка высоты микрорастений в зависимости от схемы воспроизводства

Схема воспроизводства	Высота растений, мм			
	2008 г.	2009 г.	2010 г.	среднее
с.Жуковский ранний				
Стандартный протокол	335	419	467	407
Одногодичная схема	387	474	428	429
НСР <sub>095</sub>	12,4	7,6	8,5	-
с.Крепыш				
Стандартный протокол	340	488	300	376
Одногодичная схема	417	507	333	419
НСР <sub>095</sub>	15,3	7,0	12,0	-

В среднем за три года исследований микрорастения сортов Жуковский ранний и Крепыш, полученные с использованием одногодичной схемы воспроизводства (СС) превышали по высоте микрорастения, произведенные в соответствии со стандартным протоколом, соответственно на 22 и 43 мм (таблица 2), а по величине урожая – на 23 и 19% (таблица 3).

Таблица 3 –Продуктивность микрорастений в зависимости от схемы воспроизводства

Схема воспроизводства	Продуктивность, г/растение				
	2008 г.	2009 г.	2010 г.	среднее	прибавка, %
с.Жуковский ранний					
Стандартный протокол	88	110	175	124	-
Одногодичная схема	110	147	201	153	23
НСР <sub>095</sub>	17,1	12,5	25,4	-	-
с.Крепыш					
Стандартный протокол	209	156	77	147	-
Одногодичная схема	251	182	92	175	19
НСР <sub>095</sub>	31,7	21,3	18,0	-	-

В среднем за 2008-2010 годы общее количество мини-клубней в урожае микрорастений, полученных по одногодичной схеме, возрастало на 0,5-0,6 шт./куст по сравнению с урожаем микрорастений, полученных в соответствии со стандартным протоколом (таблица 4).

Таблица 4 –Структура урожая микрорастений в зависимости от схемы воспроизводства, среднее за 2008-2010 гг.

Схема воспроизводства	Количество мини-клубней, шт.		
	9-45 мм	более 45 мм	всего
с.Жуковский ранний			
Стандартный протокол	4,3	0,3	4,6
Одногодичная схема	4,8	0,4	5,2
с.Крепыш			
Стандартный протокол	2,6	0,6	3,2
Одногодичная схема	3,1	0,6	3,7

Следует отметить, что отмеченные прибавки урожая были достигнуты, главным образом, за счёт увеличения доли стандартной фракции мини-клубней размером 9-45 мм.

### Глава 3. Разработка биотехнологических приемов размножения оздоровленного исходного материала

**Использование регуляторов роста нового поколения при клональном микроразмножении и трансплантации микрорастений.** После получения оздоровленных исходных растений следующим важным этапом воспроизводства является их дальнейшее размножение. При этом задача состоит в быстром увеличении объемов исходного материала при одновременном сохранении высокой потенциальной энергии роста и продуктивности, а также статуса отсутствия патогенов.

Стратегии по оптимизации производства должны быть направлены на получение хорошо облиственных микрорастений, поскольку листья являются местом детерминации физиологических процессов, происходящих в растениях, включая фотосинтез и транспирацию. Не менее важно сбалансированное развитие корневой системы микрорастений (Struik, 2007).

Для усиления ризогенеза микрорастений использовали диметилловый эфир аминофумаровой кислоты (фумар), обладающий свойствами эндогенной индукции и синхронизации гормональной активности (Просьяник и др., 1993; Станко, Костяновский, 1995).

В наших исследованиях добавление фумара в искусственную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) в концентрации 0,1 мг/л перед последним черенкованием способствовало увеличению длины корней у микрорастений сортов Жуковский ранний, Удача, Ильинский и Лукьяновский – в 1,7-1,9 раза, по сравнению с контролем. Одновременно, наблюдали увеличение высоты и облиственности микрорастений (Усков и др., 2005).

Таблица 5 – Приживаемость микрорастений на стадии пересадки *ex vitro* при использовании этамона

Вариант обработок	Приживаемость рассады, %	Продолжительность подращивания, дни
Жуковский ранний		
Контроль	86	21
Этамон, 10 г/л	98	11
Удача		
Контроль	88	26
Этамон, 10 г/л	98	19
Елизавета		
Контроль	85	25
Этамон, 10 г/л	97	17

В целях стимулирования развития листовой поверхности и корневой системы на стадии пересадки микрорастений в защищенный грунт

использовали синтезированный во ВНИИХЗР диметилфосфорнокислый диметилдигидроксиэтиламмоний (этамон) - интенсификатор внутриклеточного питания (Жирмунская и др., 1991; Шаповалов, Зубкова, 2003).

Было установлено, что опрыскивание микрорастений после пересадки в грунт раствором этамона в концентрации 10 мг/л приводило к увеличению приживаемости распикированной рассады в зависимости от сорта на 10-12%, интенсификации развития и сокращению времени подращивания на 7-10 дней (таблица 5).

**Нестерильное размножение исходных микрорастений с использованием гидропонных и ионитопонных биотехнических комплексов.** В практике оригинального семеноводства картофеля на стадии *ex vitro* нередко используется технология нестерильного размножения и адаптации микрорастений на искусственных субстратах с использованием специальных модульных установок - биотехнических комплексов.

Проведенная нами сравнительная оценка выявила преимущество по продуктивности микрорастений, размноженных с использованием ионитопонной культуры на модуле БТК-1 (ИЭБ РАН РБ, г.Минск) по сравнению с гидропонной установкой «Минивит-2» (ДОКА – генные технологии, г.Зеленоград).

Таблица 6 - Влияние способов нестерильного размножения *ex vitro* на продуктивность микрорастений, 1999 г.

№ /№	Сорт	Среднее количество мини-клубней, шт./растение			
		микро-растения	рассада из БТК-1	рассада из "Минивит-2"	НСР <sub>095</sub>
1.	Удача	8,2	7,5	6,3	0,8
2.	Жуковский ранний	9,3	13,0	8,5	0,9
3.	Невский	11,1	9,8	8,4	1,2
4.	Луговской	10,9	10,8	-	0,5

Наиболее контрастными различия по выходу мини-клубней были при выращивании сорта Жуковский ранний, в этом случае разница составляла 4,5 шт. на растение. По сортам Удача и Невский различия были менее выражены, хотя и достоверны, и составляли соответственно 1,2 и 1,4 шт. на растение (таблица 6).

В рамках отработки технологии нестерильного размножения микрорастений нами была изучена продуктивность рассады в зависимости от количества черенкования маточных растений (количества съемов рассады).

Сравнительная оценка показала, что при последовательных съемах черенков от исходных (маточных) растений выход мини-клубней увеличивался по сравнению с контролем при первом съеме рассады с 9,3 до

13,0 шт., а затем снижался до 6,4 шт. при втором съеме и до 5,4 шт./растение при третьем съеме рассады. Одновременно наблюдали увеличение средней массы мини-клубней при последовательных съемах черенков. Продуктивность рассады из маточных растений после трех циклов черенкования составляла 8,2 шт./растение при средней массе мини-клубней 38,3 г.

**Использование регуляторов роста нового поколения при полевом культивировании исходного материала в различных регионах Российской Федерации.** На полевом этапе размножения определяющее значение имеют агроприемы, направленные на увеличение коэффициента размножения оздоровленного исходного материала и сохранение статуса его здоровья.

В качестве антидепрессантов, сглаживающих проявление стрессовых воздействий в период культивирования в различных почвенно-климатических условиях, хорошо проявили себя при использовании на картофеле brassinosteroids (Бобрик, 2000, 2001).

В наших исследованиях, проведенных в условиях Московской области, последовательное применение эпибрасинолида (эпина) путем добавления в искусственную питательную среду (МС) перед последним пассажем (0,25 мг/л) и двукратного опрыскивания высаженных в защищенный грунт микрорастений (после пересадки и в фазу бутонизации-цветения) способствовало увеличению высоты растений, площади поверхности листьев и оказало положительное влияние на урожайность и количественный выход мини-клубней изучаемых сортов картофеля (Кравченко, Усков, 2005).

В среднем за три года прибавка по массе мини-клубней составила 47% для сортов Жуковский ранний и Удача, 50% - для сорта Ильинский и 51% для сорта Лукьяновский. Одновременно, возросло как общее количество мини-клубней – на 0,7-3,0 шт./куст, так и количество мини-клубней стандартной фракции 9-45 мм – на 0,2-2,7 шт./куст.

Использование антистрессовых свойств эпина позволило в значительной степени преодолеть характерные резкие колебания температуры и влажности при размножении исходного материала в предгорных районах Карачаево-Черкесской Республики (таблица 7).

В наших исследованиях показана высокая эффективность комплексного использования регуляторов роста при полевом культивировании исходного материала.

При ежегодном применении в наложении препаратов фумар для предпосадочной обработки клубней (1 мг/л) и эпин (0,25 мг/л) для опрыскивания посадок отмечали ускорение сроков появления всходов на 3-5 дней, формирования товарного урожая семенного картофеля - на 10 дней. При этом прибавка урожая составляла 4,8-13,2 т/га, а увеличение объема производства стандартного супер-суперэлитного материала в зависимости от сорта - 25-41% (таблица 8).

Таблица 7 – Урожайность исходного материала при использовании эпина в условиях предгорной зоны Карачаево-Черкесской республики , 2003г.

Сорт	Вариант обработок	Урожайность	
		г/куст	прибавка, %
СПК «Маруха, 1100 м			
Жуковский ранний	Контроль	425	-
	Эпин, 0,25 мг/л	500	17,6
	НСР <sub>095</sub>	74	-
СПК «Сторожевое», 800 м			
Жуковский ранний	Контроль	263	-
	Эпин, 0,25 мг/л	298	13,3
	НСР <sub>095</sub>	62	-
Удача	Контроль	432	-
	Эпин, 0,25 мг/л	611	41,4
	НСР <sub>095</sub>	75	-

Таблица 8 – Урожай и выход семенной фракции супер-суперэлиты при комплексном использовании регуляторов роста, 2005 г.

Вариант обработок	Урожай		Выход семенной фракции	
	т/га	прибавка, %	тыс.шт./га	%
Жуковский ранний				
Контроль	22,7	-	371	100
Фумар+эпин	32,2	42	505	139
НСР <sub>095</sub>	0,9	-	12,9	-
Удача				
Контроль	26,3	-	462	100
Фумар+эпин	39,5	50	576	125
НСР <sub>095</sub>	1,0	-	14,6	-
Ильинский				
Контроль	23,1	-	386	100
Фумар+эпин	30,8	33	543	141
НСР <sub>095</sub>	0,8	-	18,4	-
Лукьяновский				
Контроль	21,1	-	348	100
Фумар+эпин	25,9	23	448	128
НСР <sub>095</sub>	1,3	-	15,7	-

**Применение нанопродуктов с геропротекторными свойствами (ионов Скулачева) в оригинальном семеноводстве картофеля.** Культура картофеля, размножаемая вегетативно, как известно, подвержена вырождению вследствие поражения вирусными и другими болезнями, а также физиологическому старению под воздействием неблагоприятных абиотических факторов (Дементьева, 1970; Писарев, Трофимец, 1976; Сердюков, Писарев, Старцева, 1984).

Великие биологи второй половины XIX века Ч.Дарвин (1871) и А.Вейсман (1889) рассматривали старение организма как завершающий этап онтогенеза, а не как простое следствие накопления случайных ошибок.

Академик В.П.Скулачев в развитие теории А.Вейсмана считает, что в рамках обеспечения эволюционного процесса после завершения онтогенеза включается механизм фенотоза – запрограммированного старения и смерти организмов (Skulachev, 2001).

В соответствии со свободно-радикальной теорией Д.Хармана (1956, 1999) старение организмов сопровождается нарушением в клеточных структурах баланса активных форм кислорода (АФК) в сторону усиления окислительной функции, что приводит к деградации биополимерных макромолекул (Кольтовер, 1998).

Активные формы кислорода (АФК) выполняют также ряд важных биологических функций, необходимых для жизнедеятельности организма, в частности, они непосредственно участвуют в процессах взаимодействия клетки с патогенами: бактериями, вирусами и др.

В 2003-2004 гг. в России была освоена технология доставки высокоэффективных антиоксидантов в митохондрии клетки для регулирования баланса АФК. Данная технология стала базовой технологией российского инновационного биопроекта «Ионы Скулачева», главной целью которого является эффективная борьба со старением клеток посредством направленного воздействия на митохондрии (Скулачев, 2007).

В рамках проекта были синтезированы специфические регуляторы внутриклеточного баланса АФК – митохондриально-ориентированные антиоксиданты, названные «ионами Скулачева» (SkQ), и представляющие собой соединения проникающего катиона трифенилдецилфосфония и производных пластохинона хлоропластов (Antonenko et al, 2008).

Для культуры картофеля процессы физиологического старения и вырождения вследствие поражения фитопатогенами на определенном этапе развития также связаны с нарушением баланса активных форм кислорода в клетках. Отсюда логично вытекает стратегическое предположение о возможности использования ионов Скулачева для противодействия данным процессам.

В наших исследованиях, проведенных в культуре *in vitro*, добавление ионов Скулачева (2,5 нМ) в искусственную питательную среду приводило к увеличению приживаемости меристемных эксплантов сортов с более коротким вегетационным периодом (ранние и среднеранние) на 16-43%, и

сортов с более длинным вегетационным периодом (среднеспелые и среднеспоздние) - на 7-13% (рисунок 3).

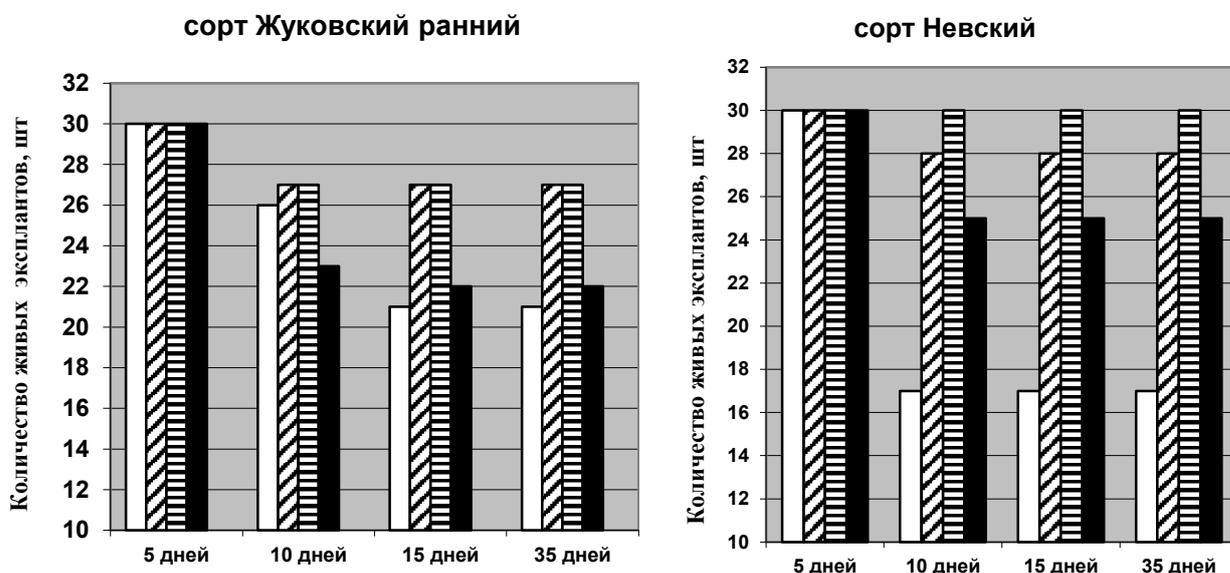


Рисунок 3 – Приживаемость эксплантов (меристем) различных сортов картофеля в зависимости от концентрации препарата SkQ1, 2008 г.

Одновременно, наблюдали повышение морфогенной активности и интенсивности роста эксплантов, сокращение времени регенерации микрорастений из эксплантов на 24-30 дней.

В наших исследованиях использование ионов Скулачева при культивировании ростковых черенков повышало выход стеблевых черенков после первого черенкования регенерантов в 1,9-2,7 раза (таблица 9).

Использование ионов Скулачева при полевом размножении исходного материала оказывало стабилизирующее воздействие на рост, развитие и продуктивность растений.

Таблица 9 – Выход стеблевых черенков после первого черенкования регенерантов при использовании ионов Скулачева

Вариант среды	Количество стеблевых черенков, шт./шт. ростковых черенков		
	2008 г.	2009 г.	среднее 2008-2009 гг.
<b>Жуковский ранний</b>			
Контроль - МС	0,60	0,50	0,55
МС+SkQ1 (2,5 нМ)	1,25	1,70	1,48
<b>Крепыш</b>			
Контроль - МС	0,35	0,40	0,38
МС+SkQ1 (2,5 нМ)	0,90	0,50	0,70

Таблица 10 – Продуктивность растений и структура урожая картофеля при обработке семенных клубней препаратом SkQ1, 2007 г.

Концентрация препарата	Продуктивность, г/куст	Прибавка, %	Количество клубней, шт.				Последствие 2008 г., г/куст
			всего	менее 30 мм	30-60 мм	более 60 мм	
<b>с. Жуковский ранний</b>							
Контроль	277	100	6,5	2,1	4,2	0,2	319
0,25 нМ	290	105	7,6	2,7	4,7	0,2	334
2,5 нМ	316	114	7,5	2,6	4,9	-	480
25 нМ	382	138	7,2	1,8	5,3	0,1	497
НСР <sub>095</sub>	47	-	1,2	-	-	-	164
<b>с. Крепыш</b>							
Контроль	163	100	4,5	2,0	2,3	0,2	316
0,25 нМ	157	96	5,5	2,4	3,1	-	327
2,5 нМ	172	105	5,8	3,0	2,7	0,1	416
25 нМ	229	140	5,3	1,8	3,3	0,2	485
НСР <sub>095</sub>	50	-	1,3	-	-	-	70
<b>с. Голубизна</b>							
Контроль	217	100	8,2	4,1	4,0	0,1	405
0,25 нМ	228	105	9,8	5,6	4,1	0,1	419
2,5 нМ	231	106	11,1	6,9	4,1	0,1	445
25 нМ	304	140	10,0	4,6	5,4	-	677
НСР <sub>095</sub>	49	-	3,0	-	-	-	228
<b>с. Никулинский</b>							
Контроль	301	100	8,8	3,2	5,3	0,3	560
0,25 нМ	296	98	8,9	3,1	5,7	0,1	556
2,5 нМ	327	109	10,0	4,0	5,9	0,1	550
25 нМ	384	128	11,1	3,2	7,9	-	642
НСР <sub>095</sub>	56	-	0,9	-	-	-	105

Так, в жарких и крайне засушливых условиях вегетационного периода 2007 года, когда значения ГТК в отдельные периоды соответствовали условиям пустыни, обработка семенных клубней перед посадкой ионами Скулачева (препарат SkQ1) в концентрации 25 нМ способствовала усилению роста и развития растений картофеля и позволила получить прибавку урожая на уровне 38-40% для сортов Жуковский ранний, Крепыш и Голубизна и 28% для сорта Никулинский. Одновременно, количество клубней семенной фракции размером 30-60 мм возрастало на 26-49% при росте общего количества клубней в пределах 11-26% (таблица 10).

В 2009 г. при выращивании опытного материала с наложением вариантов максимальные прибавки урожая отмечали при обработках клубней перед посадкой раствором SkQ1 в концентрации 25 нМ и при опрыскивании

растений – в концентрации 2,5 нМ. Для с.Жуковский ранний они были на уровне соответственно 36 и 25%, а для с.Крепыш – 26 и 24% (таблица 11).

Таблица 11 – Продуктивность растений картофеля при различных способах обработки препаратом SkQ1, 2009 г.

Вариант обработки		Продуктивность, г/куст		Прибавка урожая, %	
		последствие 2008 г.	наложение вариантов	последствие 2008 г.	наложение вариантов
<b>Жуковский ранний</b>					
контроль		491	491	100	100
клубни	0,25нМ	546	579	111	118
	2,5нМ	572	589	116	120
	25нМ	539	669	110	136
растения	0,25нМ	598	592	122	121
	2,5нМ	600	614	122	125
	25нМ	586	604	119	123
клубни+растения	0,25нМ	587	587	120	120
	2,5нМ	592	615	121	125
	25нМ	558	594	114	121
НСР <sub>095</sub>		62	62	-	-
<b>Крепыш</b>					
контроль		540	540	100	100
клубни	0,25нМ	555	575	103	106
	2,5нМ	594	605	110	112
	25нМ	575	681	106	126
растения	0,25нМ	565	619	105	115
	2,5нМ	597	667	111	124
	25нМ	579	632	107	117
клубни+растения	0,25нМ	607	610	112	113
	2,5нМ	663	681	124	126
	25нМ	613	668	114	124
НСР <sub>095</sub>		56	62	-	-

Более высокая по отношению к контролю урожайность картофеля при обработках SkQ1 проявлялась также и в следующем сезоне в последствии, что свидетельствует о сохранении высокой энергии роста и продуктивного статуса растений независимо от внешних стрессовых воздействий (таблицы 10 и 11).

В наших исследованиях продуктивность растений при обработках растворами препарата SkQ3 практически не отличалась от контрольного варианта (Усков и др., 2011). Известно, что молекулы SkQ3 превосходят по проникающей способности через биологические мембраны молекулы SkQ1 (Rokitskaya et al, 2008). В то же время антиоксидантная активность SkQ1 имеет многократный характер и на порядок выше по сравнению с SkQ3

(Antonenko et al, 2008), что, по-видимому, является решающим фактором воздействия для культуры картофеля.

Следует отметить, что использование для обработок более высоких концентраций ионов Скулачева (250 нМ) не приводило к достоверному увеличению урожайности.

В наших исследованиях показана возможность применения ионов Скулачева для обработок клубней перед посадкой в составе баковых смесей пестицидов. Применение препарата SkQ1 в составе баковой смеси давало дополнительную прибавку урожая относительно варианта с обработкой клубней раствором максима и круйзера на уровне 4-13% для сорта Жуковский ранний и до 10% для сорта Крепыш (таблица 12).

Таблица 12 – Продуктивность картофеля при использовании препарата SkQ1(25 нМ) в составе баковой смеси пестицидов

Вариант обработок	Продуктивность, г/куст			Прибавка урожая, %		
	2010г.	2011г.	2012г.	2010г.	2011г.	2012г.
<b>Жуковский ранний</b>						
контроль	252	280	354	-	-	-
SkQ1-25 нМ	275	300	404	9	7	14
максим+круйзер	317	365	456	26	30	29
SkQ1+максим+круйзер	344	402	472	37	43	33
НСР <sub>095</sub>	33,6	31,4	45,4	-	-	-
<b>Крепыш</b>						
контроль	211	252	397	-	-	-
SkQ1	251	268	438	19	6	10
максим+круйзер	249	378	509	18	50	28
SkQ1+максим+круйзер	262	380	523	24	51	38
НСР <sub>095</sub>	30,8	42,8	38,1	-	-	-

При этом максимальные прибавки урожая в опыте были получены при обработках клубней смесью препаратов максим+круйзер+SkQ1 (25нМ): до 43% для сорта Жуковский ранний и до 51% для сорта Крепыш.

В многолетнем опыте нами было изучено изменение продуктивности культуры картофеля при репродуцировании в течение пяти лет без обработок и при регулярных ежегодных обработках материала ионами Скулачева (рис.4 и 5).

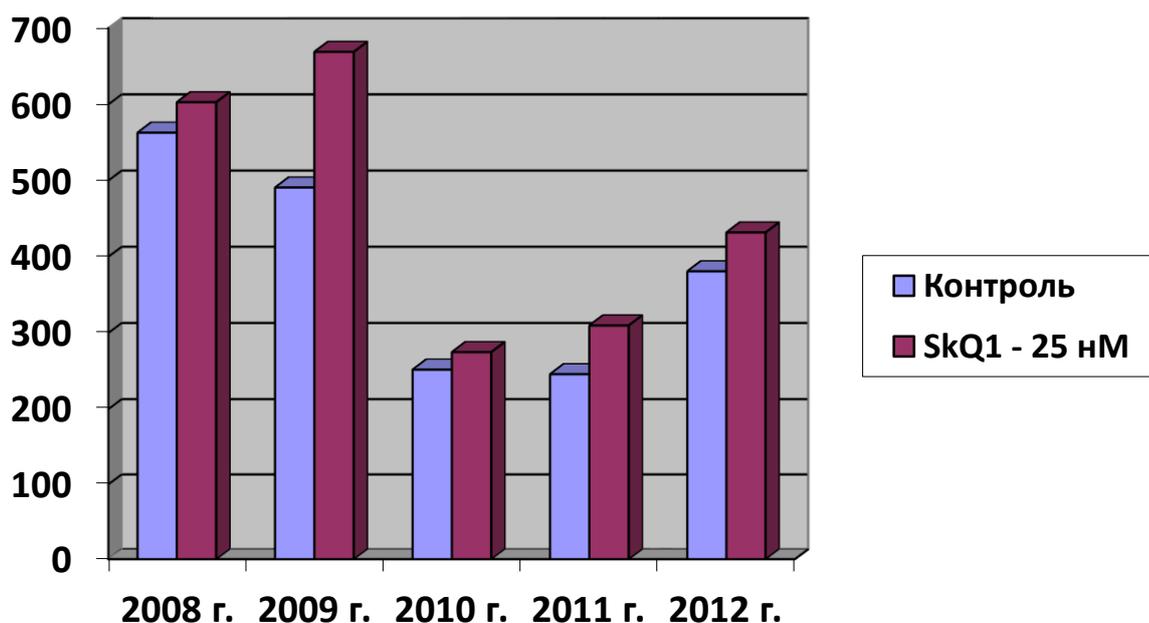


Рисунок 4 – Изменение продуктивности культуры картофеля с. Жуковский ранний в процессе репродуцирования

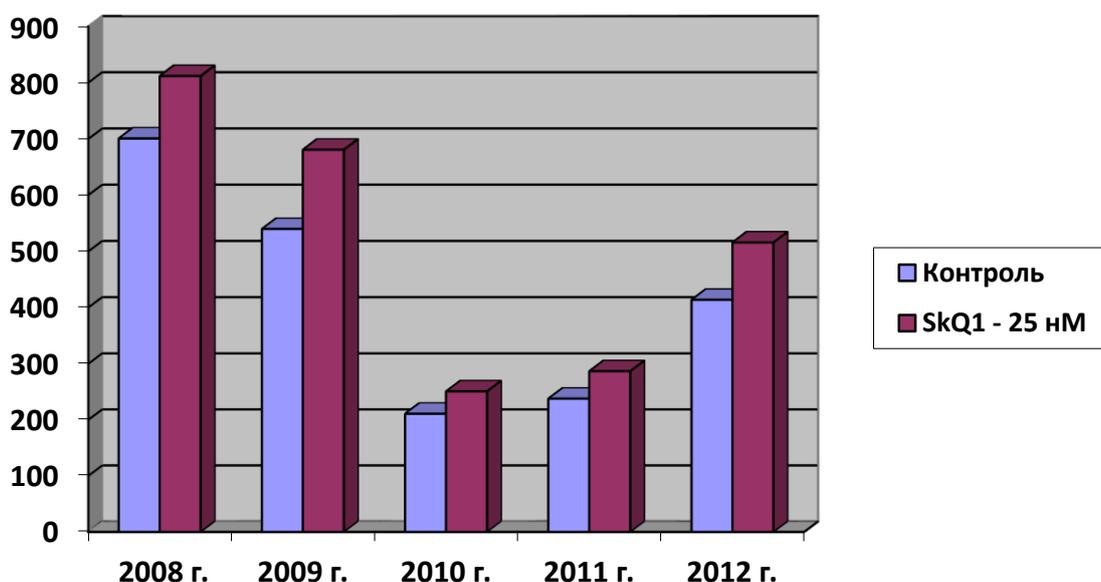


Рисунок 5 – Изменение продуктивности культуры картофеля с. Крепыш в процессе репродуцирования

При ежегодных в течение пяти лет обработках в наложении семенных клубней и посадок ионами Скулачева отмечали прибавки урожая для сорта Жуковский ранний в пределах 7-36% и для сорта Крепыш – 16-26% относительно материала, репродуцируемого без обработок.

В 2012 г. на пятый год культивирования площадь листовой поверхности на посадках сортов Жуковский ранний и Крепыш была соответственно в 1,9 и 1,2 раза больше при регулярном использовании ионов

Скулачева, а достоверная прибавка урожая при этом составляла соответственно 13 и 25% по отношению к контролю.

#### **Глава 4. Совершенствование схемы лабораторного контроля фитопатогенов в оригинальном семеноводстве картофеля**

**Сравнительная оценка норм лабораторного тестирования исходного материала.** Существующие нормативные показатели допусков по вирусным болезням для исходного материала достаточно жесткие: допускается наличие минимального количества растений с внешними признаками болезней (легкие мозаики) - до 0,4% и инфицированных в латентной форме - до 1,0% (ГОСТ Р 53136-2008).

В то же время, как свидетельствует опыт практической работы в данной области, нормы лабораторного тестирования, определяемые ГОСТ 29267-91 (1992), не позволяют эффективно контролировать качество исходного материала. Тестирование 1% растений при выращивании мини-клубней, 50 шт./га растений при выращивании первого полевого поколения, отсутствие регламентирования лабораторного контроля при выращивании супер-суперэлиты не обеспечивают объективной оценки качества производимого исходного материала и не позволяют активно влиять на процесс производства (Анисимов и др., 2005).

В процессе воспроизводства крайне важно обеспечить контроль и подтвердить безвирусный статус исходного материала на самом первом этапе размножения *in vivo* при культивировании оздоровленных микрорастений на почвенных субстратах. Как правило, безвирусный статус микрорастений обеспечивается при выращивании в условиях защищенного грунта (Stead e.a. 1996).

В наших исследованиях тотальное тестирование (100%), равно как и тестирование по ГОСТ 29267-91 (1%), не выявляло в листовых пробах тепличных растений наличия вирусных патогенов. Вместе с тем тотальное тестирование оздоровленных микрорастений, культивируемых на открытых вегетационных площадках, давало от 2 до 4% положительных реакций на РVМ и РVУ при одновременном отсутствии положительных реакций на патогены в 1%-ной выборке (таблица 13).

В этом случае 1%-ная выборка не обеспечивала отображения реальной картины статуса культивируемых микрорастений в части скрытого вирусносительства, что давало возможность распространения вирусной инфекции в последующих генерациях.

В результате, на следующий год при дальнейшем полевом размножении зараженность семенного материала значительно возрастала (таблица 14).

Таблица 13 – Содержание вирусов при различных нормах лабораторного тестирования микрорастений

Сорт	Норма тестирования	Зараженность, %				
		PVX	PVS	PVM	PVY	PLRV
Защищенный грунт						
Жуковский ранний	1%	0	0	0	0	0
	100%	0	0	0	0	0
Вегетационная площадка						
Жуковский ранний	1%	0	0	0	0	0
	100%	0	0	0	2	0
Крепыш	1%	0	0	0	0	0
	100%	0	0	1	3	0

Таблица 14 – Содержание вирусов в первом полевом поколении мини-клубней при различных нормах лабораторного тестирования микрорастений

Сорт	Проведение браковок	Зараженность, %				
		PVX	PVS	PVM	PVY	PLRV
Жуковский ранний (тепличный)	без браковки	0	0	0	0	0
Жуковский ранний (площадка)	без браковки	0	0	0	8	0
	с выбраковкой	0	0	0	1	0
Крепыш (площадка)	без браковки	0	0	6	8	0
	с выбраковкой	0	0	1	0,5	0

Так, например, количество растений сорта Жуковский ранний с положительной реакцией на PVY по результатам лабораторных тестов на следующий год возрастало с 2 до 8%. Вместе с тем, проведение на открытых площадках браковок растений с положительной реакцией на патогены позволило снизить в данном случае зараженность материала при размножении на следующий год до 1%. Аналогично, после проведения выбраковки растений с Крепыш зараженность материала на следующий год снижалась: PVM – с 3 до 1% и PVY – с 6 до 0,5%, что давало возможность сертифицировать его в соответствие с классификацией как первое полевое поколение из мини-клубней (ПП-1).

В наших исследованиях проведение браковок исходного материала по результатам лабораторного тестирования в сочетании с ранними сроками удаления ботвы (не позднее 4 недель после цветения) способствовало сохранению качества оригинального семенного картофеля в процессе размножения и позволяло увеличить выход супер-суперэлиты на 11-13% (Нестерова, Усков, 2008).

**Мониторинг качества семенного материала, выращиваемого в различных регионах Российской Федерации.** За период 1996-2012 гг. в рамках работы аккредитованной Испытательной лаборатории ВНИИКХ нами с использованием разработанных методик лабораторного тестирования листовых и клубневых проб был проведен мониторинг качества 267,1 тыс. образцов различных классов и категорий семенного картофеля из разных регионов Российской Федерации на скрытую зараженность вирусами: PVX, PVM, PVS, PVY, PVA, PLRV (таблица 15).

Таблица 15 – Результаты работы Испытательной лаборатории ГНУ ВНИИКХ Россельхозакадемии по тестированию семенного картофеля, тыс.шт.

Категория	Период				Всего
	1996-2000 гг.	2001-2005 гг.	2006-2010 гг.	2011-2012 гг.	
Исходный материал	16,2	22,5	58,5	41,3	138,5
Супер-суперэлита	-	5,5	16,1	10,4	32,0
Суперэлита + элита	-	7,5	22,2	5,8	35,5
Репродукции элиты	-	8,8	38,9	13,4	61,1
Итого:	16,2	44,3	135,7	70,9	267,1

Приведенные в таблице 15 данные свидетельствуют о значительном увеличении за период исследований объемов лабораторного тестирования семенного материала: от 16,2 тыс. образцов в период 1996-2000 гг. до 135,7 тыс. образцов в период 2006-2010 гг. и 70,9 тыс. образцов - за последние два года (2011-2012 гг.). При этом на долю оригинального семенного картофеля (исходный материал + супер-суперэлита) в общем объеме тестирования приходится 63,8%, а за последние два года 2011-2012 гг. эта доля возросла до 72,9%.

Анализ данных многолетнего мониторинга распространения на семенном материале латентной формы вирусной инфекции свидетельствует о стабильном преобладании в образцах, поступавших из различных регионов Российской Федерации, М- и Y-вирусов картофеля, вызывающих мозаичное закручивание листьев и различные формы тяжелых мозаик. На долю этих двух вирусов приходится более 80% заражений.

Причем накопление инфекции в латентной форме происходит, главным образом, во время полевого репродуцирования оздоровленного исходного материала, что свидетельствует о как неблагоприятной фитопатологической обстановке в местах выращивания, так и о несоблюдении требований технологического регламента ведения оригинального и элитного семеноводства картофеля.

В то же время из ряда регионов, таких как Новгородская, Ярославская и Тюменская области, на анализ поступало достаточно большое количество образцов семенного картофеля, свободных от вирусной инфекции, что

свидетельствует о благополучной фитосанитарной обстановке в данных регионах.

Данные лабораторной оценки 34,1 тыс. образцов оригинального семенного материала, выращиваемых в 2011-2012 гг. в Тестовом питомнике ВНИИКХ в рамках международного проекта ЕЭК ООН, позволили определить круг отечественных и зарубежных производителей высококачественного семенного картофеля и обозначить проблемы для других производителей.

В результате проведенных специальных исследований и обобщения многолетнего практического опыта по лабораторному тестированию семенного картофеля предложена новая схема лабораторного контроля фитопатогенов в процессе оригинального и элитного семеноводства картофеля (таблица 16).

Таблица 16 – Нормы и методы лабораторного тестирования листовых и клубневых проб в процессе производства оригинального и элитного семенного картофеля

Место выращивания	Полевое поколение (класс)	Нормы тестирования	Методы
Исходные растения	ИМ	100% растений	ИФА*, ПЦР**, ИХГА***
Теплицы летнего типа (мини-клубни)	ИМ	минимально 250 растений по сорту	ИФА
Полевые питомники (изоляция 2 км)	ПП-1	200 растений на участке	ИФА
	ССЭ	200 клубней от партии	ИФА
Полевые питомники (изоляция 0,5 км)	СЭ	отдельные растения	ИФА, ИХА
	Элита		

\* - иммуноферментный анализ;

\*\* - полимеразная цепная реакция;

\*\*\* - иммунохроматографический анализ.

Данная схема предусматривает значительное увеличение объемов лабораторного тестирования исходного материала и вводит нормативы для класса супер-суперэлиты.

Обозначенные в таблице 16 нормы, методы и схема лабораторного тестирования различных категорий и классов семенного картофеля вошли в проект нового национального стандарта Российской Федерации «Картофель семенной. Приемка и методы анализа».

## Глава 5. Разработка методов лабораторного контроля для рутинного и экспресс-тестирования семенного картофеля

**Создание отечественных тест-систем для идентификации фитопатогенов картофеля методом твердофазного иммуно-ферментного анализа (ИФА).** Разработку отечественной тест-системы «сэндвич-варианта» иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли в 1982-84 гг. в рамках комплексной целевой программы «Биотехнология» на основе совместных исследований Биологического факультета МГУ, Института биоорганической химии РАН и ВНИИКХ.

В процессе разработки тест-системы для ИФА была освоена технология производства иммуноспецифических препаратов, такие как:

- 1) накопление биоматериала, содержащего моноштаммы патогенов, выделенные из природных источников на территории Российской Федерации;
- 2) получение высокоочищенных препаратов вирусов и чистых культур возбудителей бактериозов картофеля;
- 3) получение высокоспецифических антисывороток из плазмы крови иммунизированных животных (кроликов);
- 4) выделение специфических иммуноглобулинов и их конъюгирование с пероксидазой из хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana Lam*).

При освоении данной технологии был решен ряд методических вопросов, касающихся, в частности, подбора штаммов патогенов для иммунизации и усовершенствования методов очистки вирусных препаратов. Так, было выявлено, что некротический штамм X-вируса картофеля, обладая идентичными антигенными свойствами с нормальным штаммом PVX, в то же время вызывает значительно более сильный иммунный ответ (Рисунок 6).

Анализ кривых титрования специфических фракций иммуноглобулинов показывает, что антитела, полученные к некротическому штамму X-вируса картофеля, как в гомологичной, так и в гетерологичной реакции проявляют большее иммунное сродство к изучаемым антигенам. Иными словами, некротический штамм является более иммуногенным по сравнению с нормальным штаммом PVX и, следовательно, более перспективным для иммунизации (Рисунок 7).

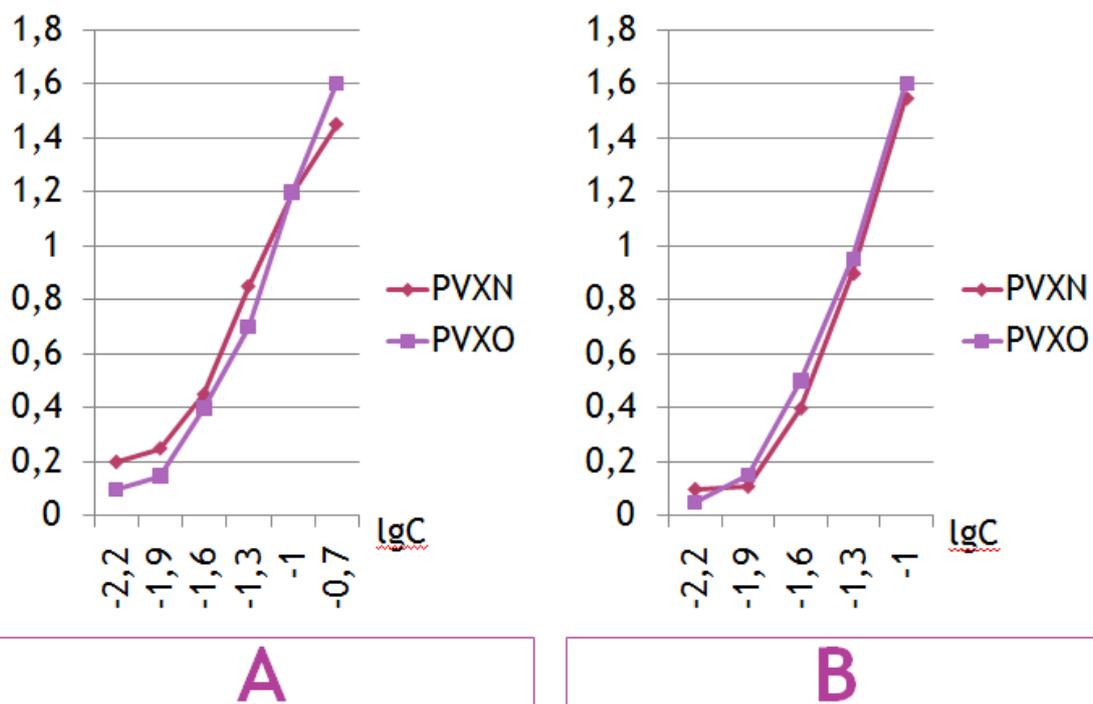


Рисунок 6 – Кривые титрования антигенов (E<sub>450</sub>) некротического (PVX<sup>N</sup>) и нормального (PVX<sup>O</sup>) штаммов X-вируса картофеля по антителам к нормальному (А) и некротическому (В) штаммам PVX

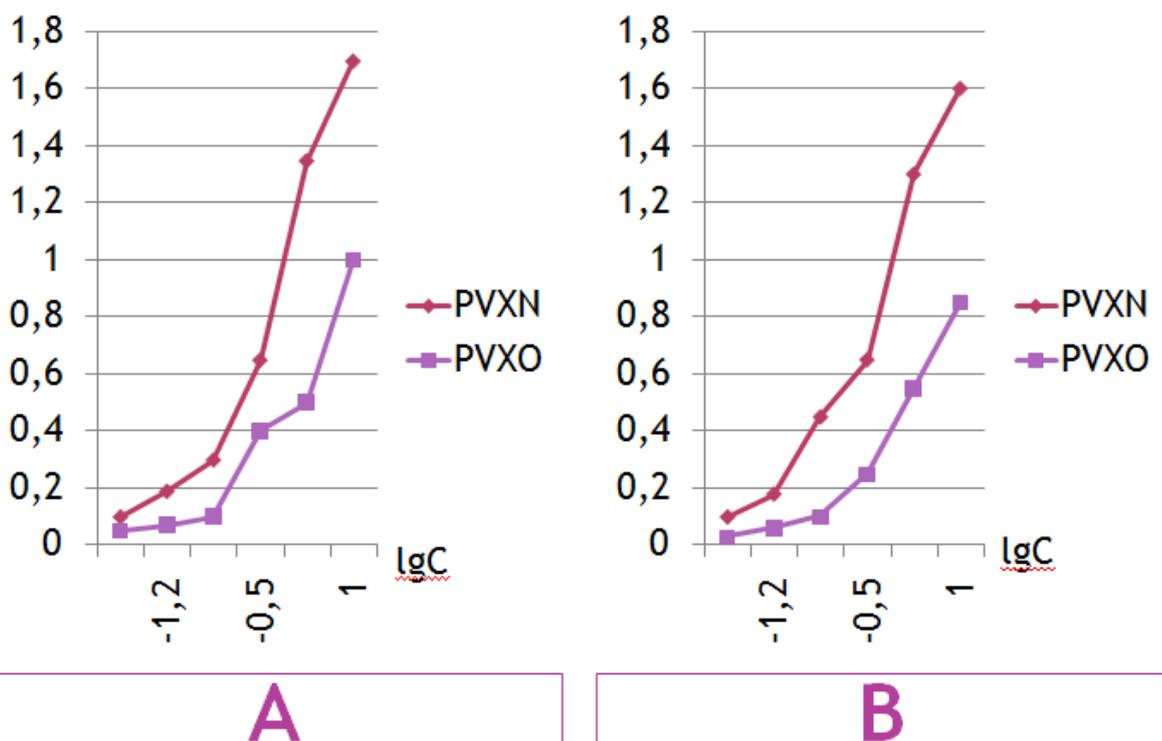


Рисунок 7 – Кривые титрования иммуноглобулинов (E<sub>450</sub>) некротического (PVX<sup>N</sup>) и нормального (PVX<sup>O</sup>) штаммов X-вируса картофеля по антигену некротического (А) и нормального (В) штаммов PVX

Усовершенствование схемы очистки нитевидных вирусов путем совмещения концентрирования вирионов и их очистки от низкомолекулярных примесей в процессе ультрацентрифугирования позволило повысить выход препаратов PVM и PVS соответственно до 40,1 и 37,5% от первоначального содержания в экстрагируемом соке. При этом оптические характеристики свидетельствуют о высокой степени очистки вирусных препаратов и нормальной степени агрегации вирусных частиц (таблица 17).

Таблица 17 – Характеристика вирусных препаратов при различных схемах выделения

Антиген	Схема выделения	Выход препарата, %	E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub>	Светорассеивание, %
PVM	рутинная	27,8	1,47	22,0
	сокращенная	40,1	1,36	16,0
PVS	рутинная	23,5	1,26	20,5
	сокращенная	37,5	1,28	13,5

В результате проведенных исследований были созданы отечественные тест-системы «сэндвич-варианта» ИФА и оптимизированы их параметры для идентификации наиболее распространенных на территории Российской Федерации вирусов: PVX, PVS, PVM, PVY, PAMV, PLRV, TRV и возбудителей бактериозов картофеля: черной ножки и кольцевой гнили. Чувствительность тест-систем для иммуноферментного определения вирусов составила 10-50 нг/мл, бактерий –  $10^3$ - $10^5$  клеток/мл, что на 2-3 и соответственно на 3-4 порядка превышало чувствительность серологического метода капельной агглютинации.

Сравнительные испытания полученных тест-систем для ИФА показали полное совпадение по количеству положительных результатов с другими методами диагностики. Одновременно, при помощи иммуноферментных тест-систем выявляли в 2,0 раза больше инфицированных полевых растений, чем при использовании аммонийно-сульфатного метода (таблица 18).

В дальнейших исследованиях были отработаны методические аспекты тестирования листовых и клубневых проб при использовании отечественных иммуноферментных тест-систем и в результате разработан регламент проведения послеуборочного лабораторного теста, применение которого дает возможность достоверного определения зараженности семенного материала патогенами.

На основе разработанных отечественных тест-систем во ВНИИКХ, начиная с 1985 г., освоено коммерческое производство диагностических наборов для ИФА к 12 патогенам, поражающим картофель.

Таблица 18 – Сравнительная эффективность различных методов диагностики вирусов картофеля

Метод	Количество образцов, шт.	Количество положительных реакций, шт.				
		PVX	PVS	PVM	PVY	всего
Микрорастения						
ЭМ	34	13				13
ИФА	34	6	2	9	2	13
Полевые растения						
АСМ	244	12	40	130	10	130
ИФА	244	20	69	243	21	243

До 1991 года при централизованной системе обеспечения потребностей селекционно-семеноводческих учреждений Советского Союза производство диагностикумов для ИФА и антисывороток для капельной серодиагностики в сумме обеспечивало ежегодно выполнение порядка 4 млн. анализов в 120 профильных организациях.

В дальнейшем после распада Советского Союза в период становления в Российской Федерации рыночной экономики спрос и объемы реализации диагностических средств значительно уменьшились. В период 1991-1995 гг. производство и реализация диагностических наборов для ИФА сократились в 10 раз: с 1400 шт. в 1991 г. до 140 наборов в 1995 году. Одновременно, последовательно уменьшалась реализация диагностических антисывороток для капельной серодиагностики: 1991 г. – 730 флаконов, 1992 г. – 588 флаконов, 1993 г. – 420 флаконов, 1994 г. – 402 флакона, 1995 г. – 312 флаконов.

Таблица 19 – Объемы реализации иммунодиагностических средств, произведенных отделом биотехнологии ВНИИКХ, млн.анализов

Продукция	Период			
	1996-2000 гг.	2001-2005 гг.	2006-2010 гг.	2011-2012 гг.
Наборы ИФА	0,46	0,56	0,45	0,20
Диагностические антисыворотки	1,19	1,35	0,92	0,17

За период 1996-2000 гг. было реализовано иммуноферментных наборов и диагностических антисывороток, произведенных на основе разработанных тест-систем, соответственно на 0,46 и 1,19 млн. анализов (таблица 19).

В двухтысячных годах спрос на диагностические наборы для ИФА стабилизировался, а на антисыворотки – продолжал снижаться.

В настоящее время диагностические наборы для определения вирусов и возбудителей бактериозов картофеля производства ГНУ ВНИИКХ Россельхозакадемии являются лидирующими и доминирующими на отечественном рынке аналогичных иммунохимических тестов. Диагностические средства производятся в объеме, обеспечивающем ежегодно проведение порядка 300-500 тыс. определений в системе контроля качества и сертификации семенного картофеля.

**Создание отечественных тест-систем для экспресс-диагностики фитопатогенов картофеля методом иммунохроматографии на тест-полосках (ИХА).** При работе с семенным материалом в полевых питомниках важная роль отводится экспресс-диагностике патогенов в целях первичной оценки качества базовых клонов и их отбора для дальнейшего размножения (Анисимов и др., 2008).

Отечественные иммунохроматографические тест-системы для визуальной экспресс-диагностики вирусных инфекций картофеля на поликомпонентных мембранных тест-полосках разрабатывали в 2008-2010 гг. в рамках совместного проекта кафедры вирусологии биологического факультета МГУ, ИФХБ им.А.Н.Белозерского, ЗАО НВО "Иммунотех" и ВНИИКХ.

В процессе исследований были сконструированы мультимембранные поликомпонентные иммунохроматографические стрипы с линейной формой движения фронта раствора, определены условия проведения иммунохроматографической реакции и оптимизированы кинетические параметры работы тест-системы на основе использования наночастиц коллоидного золота в качестве визуального маркера специфических антител.

В результате были созданы отечественные иммунохроматографические тест-системы и отработаны методические аспекты их применения для экспресс диагностики X-, M- и Y-вирусов картофеля. По результатам испытаний чувствительность выявления вирусов в образцах составила 2-8 нг/мл, а время детекции – 10-20 мин.

Соответствие результатов выявления вирусов картофеля методами ИФА и ИХГА составила для PVX и PVY соответственно 100 и 89% для инфицированных растений и 100% для здоровых растений.

Производственные испытания, проведенные в 2008 г., показали высокую эффективность использования иммунохроматографических тест-полосок при отборе базовых клонов в Банке здоровых сортов ВНИИКХ. Среди анализируемых образцов были выявлены: PVX – в 23 клонах, PVY – в 15 клонах, PVM – в 21 клоне.

Клоны 17-ти сортов с отрицательной реакцией на присутствие вирусов по данным иммунохроматографии были дополнительно проанализированы с использованием глазкового теста ИФА (таблица 20).

Из 86 отобранных с помощью ИХГА безвирусных клонов в процессе глазкового теста было дополнительно выявлено 7 клонов с положительной реакцией на вирусы и 79 клонов подтвердили безвирусный статус.

Таблица 20 – Оценка исходных базовых клонов с использованием ИХГА и ИФА, 2008 г.

ИХГА		ИФА			Количество безвирусных клонов после глазкового теста, шт.
протестировано клонов, шт.		Выявлено дополнительно клонов с вирусами, шт.			
всего	в т.ч. выявлено безвирусных клонов	PVX	PVM	PVY	
170	86	2	3	3	79

В 2008-2009 гг. с использованием отечественных иммунохроматографических стрипов было отобрано 590 клонов 37 сортов, поддерживаемых в Банке здоровых сортов картофеля (Архангельская область).

#### **Глава 6. Экономическая оценка результатов исследований**

Для оценки экономических показателей процесса воспроизводства оздоровленных исходных микрорастений по одногодичной схеме нами разработана технологическая карта, в соответствии с которой определено количество отбираемых базовых клонов и вводимых в культуру *in vitro* ростковых черенков в расчете на 1000 микрорастений, высаживаемых в защищенный грунт для производства мини-клубней.

Расчеты показывают, что для получения 20-40 исходных для микрочеренкования растений-регенерантов, обеспечивающих данный уровень производства, необходимо ежегодно отбирать в питомниках оригинального семеноводства до 10 полевых базовых клонов и вводить в культуру *in vitro* до 80 ростковых черенков.

Анализ калькуляции затрат на производство 40 исходных микрорастений-регенерантов, обеспечивающих в соответствии с технологической картой получение 1000 микрорастений для высадки в грунт, показывает, что 2/3 всех производственных затрат приходятся на статью контроля качества.

Расчетная себестоимость 1-го исходного для черенкования микрорастения, полученного с использованием одногодичной схемы воспроизводства, составила 341,8 рублей, что на 36,7% выше по сравнению с себестоимостью исходных микрорастений, получаемых по базовой двухлетней схеме (Технологический регламент, 2010).

Увеличение затрат на производство исходных для черенкования микрорастений при использовании одногодичной схемы воспроизводства влечет за собой рост себестоимости производимого оригинального семенного материала (таблица 21).

Таблица 21 – Себестоимость производства оригинального семенного материала

Оригинальный семенной материал	Себестоимость единицы продукции, руб.	
	базовая схема воспроизводства (Тех.регл., 2010 г.)	одногодичная схема воспроизводства
Исходные микрорастения, шт.	250,0	341,79
Микрорастения для высадки в грунт, шт.	23,47	38,21
Мини-клубни, шт.	9,98	12,41
ПП-1, т	50790	60341
ССЭ, т	20468	22378

Вместе с тем необходимо отметить, что получаемый в процессе производства супер-суперэлиты выигрыш по времени в один вегетационный период позволяет с лихвой покрыть дополнительные затраты и получить втрое большую прибыль от реализации продукции (таблица 22).

Таблица 22 – Сравнительная эффективность производства оригинального семенного материала

Показатели	Базовая схема воспроизводства (Тех.регл., 2010 г.)	Одногодичная схема воспроизводства
Оригинальный семенной материал	ПП-1	ССЭ
Количество, т	1	5
Затраты на производство, руб.	50790	111890
Цена реализации, руб/т	80000	40000
Выручка, руб.	80000	200000
Валовая прибыль, руб.	29210	88110

### Выводы

1. На основе разработанной аналитической модели, описывающей изменение физиологического возраста генотипов картофеля в процессе репродуцирования, оптимальным временем для проведения мероприятий по

воспроизводству исходного материала является период активного роста и максимальной продуктивности растений в течение отрезка  $t_1 - t_2$ .

2. Для повышения эффективности процесса размножения новых перспективных сортов и гибридов картофеля мероприятия по воспроизводству исходного материала целесообразно максимально приблизить к схеме селекционного процесса, начиная работы по воспроизводству с конкурсного испытания гибридов.

3. Разработанная технология воспроизводства исходных растений для семеноводства картофеля на основе комплексного использования полевых и лабораторных методов освобождения от фитопатогенов обеспечивает воспроизводство высококачественного оздоровленного исходного материала за счет использования как природных факторов (естественный отбор), так и современных достижений в области биотехнологии, иммунологии, молекулярной биологии. При выполнении производственных программ ВНИИКХ в 1996-2000 гг. с применением новой технологии было произведено 279,2 тыс. оздоровленных микрорастений и 589,2 тыс. мини-клубней.

4. Непрерывная оценка и отбор клонов являются важнейшими элементами формирования и поддержания коллекции оздоровленных сортообразцов, гарантирующими воспроизводство высококачественного исходного материала. В 1996-2002 гг. в рамках практической работы по формированию и поддержанию двухуровневой коллекции оздоровленных сортообразцов ВНИИКХ было оценено 16180 базовых полевых клонов по 65 сортам и гибридам отечественных и зарубежных селекционных учреждений. Производственная составляющая коллекции, используемая в ежегодных коммерческих программах по размножению оздоровленного исходного материала, в 2001-2002 годах насчитывала 56-58 сортообразцов по 15-16 наиболее востребованным и перспективным сортам.

5. Разработанная одногодичная схема воспроизводства исходных микрорастений позволяет сократить продолжительность культивирования в условиях *in vitro* до 3-4 пассажей, повысить урожайность и количественный выход мини-клубней стандартной фракции на 19-23% и ускорить использование оздоровленного материала в программах по размножению новых перспективных сортов картофеля на один календарный год.

6. Комплексное использование регуляторов роста нового поколения на различных этапах воспроизводства оздоровленного исходного материала обеспечивает увеличение в 1,5-2,8 раза объема корневой системы микрорастений (фумар, 0,1 мг/л), сокращение на 7-10 дней времени подращивания и улучшение на 10-12% приживаемости рассады (этамон, 10 мг/мл), повышение на 25-41% урожайности и выхода семенной фракции супер-суперэлиты при полевом размножении в различных почвенно-климатических условиях Российской Федерации (фумар, 1,0 мг/л; эпин, 0,25 мг/мл).

7. Сравнительная оценка биотехнических комплексов для нестерильного размножения исходного материала выявила увеличение на 17-53% продуктивности рассады микрорастений, выращенной с использованием ионитопонной культуры на установке БТК-1 по сравнению с гидропонным модулем «Минивит-2».

8. Использование ионов Скулачева в культуре *in vitro* (препарат SkQ1; 2,5 нМ) повышало приживаемость эксплантов ранних и среднеранних сортов (Жуковский ранний, Удача, Невский) на 16-43%, с более длинным вегетационным периодом (Голубизна, Никулинский) – на 7-13% и сокращало время регенерации микрорастений на 24-30 дней. При культивировании ростковых черенков добавление в искусственную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) препарата SkQ1 в наноконцентрации - 2,5 нМ способствовало усилению процессов ризо- и морфогенеза и повышало выход стеблевых черенков после первого черенкования регенерантов в 1,9-2,7 раза.

9. Применение ионов Скулачева при полевом размножении оздоровленного исходного материала в различных почвенно-климатических условиях Российской Федерации оказывало стабилизирующее воздействие на процесс накопления урожая, наиболее заметное в неблагоприятных стрессовых условиях выращивания. При ежегодном в течение пяти лет применении в наложении ионов Скулачева отмечали прибавки урожая для сорта Жуковский ранний в пределах 7-36% и для сорта Крепыш – 16-26% относительно материала, репродуцируемого без обработок. Максимальные прибавки урожая были получены при использовании препарата SkQ1 для обработки клубней перед посадкой (25 нМ) и опрыскивания растений в период вегетации (2,5 нМ).

10. Применение препарата SkQ1 (25 нМ) совместно с химическими средствами защиты давало дополнительную прибавку урожая на уровне 6-13% относительно варианта с обработкой клубней раствором фунгицида максим и инсектицида круйзер, что свидетельствует о возможности применения ионов Скулачева в составе баковой смеси пестицидов.

11. 1%-ная выборка для лабораторного тестирования по ГОСТ 29267-91 не позволяет контролировать распространение фитопатогенов в процессе воспроизводства исходного материала. Проведение бравок исходного материала по результатам тотального лабораторного тестирования в сочетании с ранними сроками удаления ботвы (не позднее 4 недель после цветения) способствовало сохранению качества оригинального семенного картофеля в процессе размножения и позволяло увеличить выход супер-суперэлиты на 11-13%.

12. Мониторинг качества семенного картофеля, выращиваемого в различных регионах Российской Федерации, выявил преобладание распространения на семенном материале вирусов PVM и PVY, вызывающих мозаичное закручивание листьев и различные формы тяжелых мозаик. На долю этих двух вирусов приходится более 80% заражений.

13. Разработанные отечественные тест-системы для «сэндвич-варианта» иммуноферментного анализа (ИФА) по чувствительности (3-10 нг/мл) и специфичности определения вирусов не уступают зарубежным аналогам и на 2-3 порядка по данным параметрам превосходят серологический метод капельной агглютинации.

14. В настоящее время коммерческое производство диагностических наборов на основе разработанных диагностических тест-систем для иммуноферментного определения фитопатогенов картофеля (12 наименований) обеспечивает проведение ежегодно порядка 300-500 тыс. анализов в системе контроля качества и сертификации семенного картофеля в различных регионах Российской Федерации.

15. В производственных испытаниях разработанных отечественных иммунохроматографических тест-систем для экспресс-диагностики X-, M- и Y-вирусов картофеля чувствительность определения патогенов составила 2-8 нг/мл, а время детекции не превышало 10-20 минут.

16. Использование одногодичной схемы для воспроизводства исходных микрорастений новых перспективных сортов и гибридов картофеля приводит к увеличению себестоимости сертифицированных микрорастений, предназначенных для высадки в грунт, на 62,8%, производства мини-клубней – на 24,3%, первого полевого поколения из мини-клубней (ПП-1) – на 18,8%, супер-суперэлиты (ССЭ) – на 9,3% по сравнению с материалом, произведенным в соответствии с Технологическим регламентом (2010 г.). Вместе с тем получаемый в процессе производства супер-суперэлиты выигрыш по времени в один вегетационный период позволяет в значительной степени перекрыть все понесенные дополнительные затраты за счет увеличения в 3,0 раза валовой прибыли от реализации семенного материала.

### **Предложения для производства**

*Селекционным учреждениям и оригинаторам сортов картофеля в целях повышения эффективности воспроизводства оздоровленного исходного материала для оригинального семеноводства рекомендуется:*

- проводить мероприятия по воспроизводству оздоровленного исходного материала перспективных гибридов на более ранних стадиях селекционного процесса, начиная с конкурсного испытания гибридов, используя усовершенствованный комплекс полевых и лабораторных методов освобождения от патогенов в процессе получения и поддерживания оздоровленных сортообразцов;

- применять одногодичную схему воспроизводства исходных микрорастений при ускоренном размножении новых перспективных сортов и гибридов;

- использовать комплекс регуляторов роста нового поколения на различных этапах размножения исходного материала: фумар (0,1 мг/л) при

культивировании *in vitro*, этамон (10 мг/л) и эпин (0,25 мг/л) при пересадке *ex vitro*, фумар (1,0 мг/л) и эпин (0,25 мг/л) в полевой культуре;

- добавлять в искусственную питательную среду (МС) ионы Скулачева в концентрации 2,5 нМ при получении исходных регенерантов из меристематических эксплантов и ростковых черенков;

- проводить предпосадочную обработку клубней и опрыскивание растений в период вегетации препаратами на основе ионов Скулачева в концентрациях соответственно 25 нМ и 2,5 нМ в процессе полевого размножения оздоровленного исходного материала, применяя препараты в составе баковой смеси с химическими средствами защиты растений.

*Испытательным лабораториям* в системе добровольной сертификации «Россельхозцентр», *оригнаторам сортов картофеля и сельскохозяйственным предприятиям* - производителям семенного картофеля в целях повышения эффективности контроля качества и сертификации оригинального, элитного и репродукционного семенного материала рекомендуется:

- учитывать при обследованиях и планировании агротехнических мероприятий преобладающее распространение на семенном материале, выращиваемом в различных регионах Российской Федерации, вирусов М- и Y- картофеля, распространяемых тлями-переносчиками и вызывающих мозаичное закручивание, морщинистую и полосчатую мозаики листьев картофеля;

- использовать при сертификации различных классов и поколений семенного картофеля новую схему лабораторного контроля фитопатогенов, разработанную для нового национального стандарта «Картофель семенной. Приемка и методы анализа»;

- использовать для проведения рутинных лабораторных тестов при сертификации и контроле качества семенного картофеля диагностические наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) отечественного производства (ВНИИКХ), не уступающие по чувствительности и специфичности лучшим зарубежным аналогам;

- использовать для проведения экспресс-идентификации фитопатогенов картофеля иммунохроматографические тест-полоски отечественного производства с чувствительностью определения 2-8 нг/мл и временем детекции – 10-20 минут.

### **Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ**

1. Трофимец Л.Н. Иммуноферментный метод диагностики / Л.Н.Трофимец, А.И.Замотаев, Ю.А.Варицев, В.П.Князева, К.Ф.Герасимова, **А.И.Усков**, А.В.Бабоша, Л.И.Егорова, Е.Я.Русинова // Защита растений. – 1985. - №11. – с.8-10.

2. **Усков А.И.** Особенности оздоровления исходного материала сортов картофеля / А.И.Усков, В.В.Бойко // Картофель и овощи. – 1997. - №2. – с.29.
3. **Усков А.И.** Организация воспроизводства оздоровленного исходного материала / А.И.Усков, Ю.П.Бойко, В.В.Бойко // Картофель и овощи. – 2000. - №2. – с.42.
4. **Усков А.И.** Система воспроизводства оздоровленного исходного материала / А.И.Усков, Е.А.Симаков // Картофель и овощи. – 2001. - №3. – с.15-16.
5. Симаков Е.А. Экономическая оценка технологий производства исходного оздоровленного материала / Е.А.Симаков, **А.И.Усков**, Ю.П.Бойко, В.А.Гуров, О.И.Шатилова // Картофель и овощи. – 2001. - №3. – с.17.
6. Симаков Е.А. Совершенствовать научное обеспечение семеноводства картофеля / Е.А.Симаков, **А.И.Усков** // Картофель и овощи. – 2002. - №1. – с.21-23.
7. **Усков А.И.** О системе сертификации семенного материала // Картофель и овощи. – 2002. - №2. – с.25-26.
8. Анисимов Б.В. Семеноводство картофеля в России: состояние, проблемы и перспективные направления / Б.В.Анисимов, **А.И.Усков**, С.М.Юрлова, Ю.А.Варицев // Достижения науки и техники АПК. – 2007. - №7. – с.15-19.
9. Simakov E.A. Potato breeding and seed production system development in Russia / E.A.Simakov, B.V.Anisimov, I.M.Yashina, **A.I.Uskov**, S.M.Yurlova, E.V.Oves // Potato Research. – 2008. – vol.51. - №3-4. – p.313-326.
10. **Усков А.И.** Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: обоснование стратегии // Достижения науки и техники АПК. – 2009. - №6. – с.30-33.
11. Симаков Е.А. Размножение перспективных гибридов и новых сортов в системе оригинального семеноводства картофеля / Е.А.Симаков, Б.В.Анисимов, **А.И.Усков**, А.В.Митюшкин, А.А.Журавлев, Т.А.Веселова // Достижения науки и техники АПК. – 2009. - №7. – с.35-37.
12. Дрыгин Ю.Ф. Высокочувствительный иммунохроматографический экспресс-метод определения зараженности растений вирусом табачной мозаики / Ю.Ф.Дрыгин, А.Н.Блинцов, А.П.Осипов, В.Г.Григоренко, И.П.Андреева, **А.И.Усков**, Ю.А.Варицев, Б.В.Анисимов, В.К.Новиков, И.Г.Атабеков // Биохимия. – 2009. – том 74. – вып. 9. – с.1212-1220.
13. **Усков А.И.** Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: 2. Получение исходных растений // Достижения науки и техники АПК. – 2009. - №9. – с.20-22.
14. **Усков А.И.** Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: 3. Размножение исходных растений // Достижения науки и техники АПК. – 2009. - №12. – с.17-20.

15. **Усков А.И.** Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: 4. Использование геропротекторов // Достижения науки и техники АПК. – 2010. - №3. – с.25-28.

16. **Усков А.И.** Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: 5. Схема лабораторного контроля // Достижения науки и техники АПК. – 2010. - №9. – с.24-26.

17. Приходько Ю.Н. Совершенствование фитопатологического контроля объектов карантинного значения / Ю.Н.Приходько, А.Ю.Шнейдер, Т.С.Живаева, Е.С.Мазурин, Н.А.Шероколава, У.Ш.Магомедов, **А.И.Усков**, Ю.А.Варицев, Б.В.Анисимов // Защита и карантин растений. – 2010. - №11. – с.31-38.

18. Галушка П.А. Рост и развитие ростковых черенков картофеля *in vitro* при использовании препарата SkQ1 / П.А.Галушка, **А.И.Усков**, Д.В.Кравченко // Достижения науки и техники АПК. – 2011. - №4. – с.40-41.

19. Галушка П.А. Совершенствуем схему воспроизводства исходных микрорастений при выращивании оздоровленного картофеля / П.А.Галушка, **А.И.Усков**, Д.В.Кравченко // Картофель и овощи. – 2011. - №7. – с.29-30.

20. **Усков А.И.** Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: 6. Методы лабораторного контроля // Достижения науки и техники АПК. – 2011. - №10. – с.23-25.

21. Drygin Yu.F. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection / Yu.F. Drygin, A.N.Blintcov, V.G.Grigirenko, I.P.Andreeva, A.P.Osipov, Yu.A.Varitzev, **A.I.Uskov**, D.V.Kravchenko, J.G.Atাবেков // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2012. – vol.93. - №1. – p.179-189.

22. Дрыгин Ю.Ф. Экспресс-диагностика вирусов картофеля методом иммунохроматографии на тест-полосках / Ю.Ф.Дрыгин, А.Н.Блинцов, И.Г.Атабеков, А.П.Осипов, В.Г.Григоренко, И.П.Андреева, Д.В.Кравченко, Ю.А.Варицев, **А.И.Усков** // Картофель и овощи. – 2012. - №5. – с.27-28.

#### **Авторские свидетельства и патенты на селекционные достижения и изобретения**

1. Авторское свидетельство № 39374. Сорт картофеля Крепыш. Заявка № 9705808 с датой приоритета от 27.12.02 г. Зарегистрировано в Госреестре селекционных достижений РФ 26.01.05 г.

2. Авторское свидетельство № 52368. Сорт картофеля Красавчик. Заявка № 9553926 с датой приоритета от 28.12.04 г. Зарегистрировано в Госреестре селекционных достижений РФ 23.03.10 г.

3. Авторское свидетельство № 51247. Сорт картофеля Метеор. Заявка № 9154599 с датой приоритета от 01.12.08 г. Зарегистрировано в Госреестре селекционных достижений РФ 14.02.13 г.

4. Авторское свидетельство № 48836. Сорт картофеля Василек. Заявка № 9253214 с датой приоритета от 30.11.07 г. Зарегистрировано в Госреестре селекционных достижений РФ 14.02.13 г.