

Лебедева Надежда Владимировна

Ускоренное размножение ранних сортов картофеля в условиях *in vitro* и его использование в семеноводстве Северо-Запада РФ

Специальность: 06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Работа выполнена на кафедре химии, агрохимии и агроэкологии в ФГБОУ ВПО «Великолукская государственная сельскохозяйственная академия»

Научный руководитель: **Федорова Юлия Николаевна**
доктор сельскохозяйственных наук, доцент

Официальные оппоненты: **Калашникова Елена Анатольевна**
доктор биологических наук, профессор,
Российский государственный аграрный
университет – МСХА им. К.А. Тимирязева
профессор кафедры генетики и биотехнологии

Усков Александр Ириархович
доктор сельскохозяйственных наук,
Всероссийский научно-исследовательский
институт картофельного хозяйства имени
А.Г. Лорха, заведующий отделом
биотехнологии и иммунодиагностики

Ведущая организация: Псковский научно-исследовательский институт
сельского хозяйства

Защита состоится 2015 года в на заседании диссертационного
совета Д 006.022.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте овоще-
водства по адресу: 140153, Московская область, Раменский район, д. Верея, строе-
ние 500, ВНИИО.

Факс: (496) 462-43-64;

E-mail: vniioh@yandex.ru, официальный сайт: www.vniioh.ru

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

Автореферат разослан « » 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Девочкина Наталия Леонидовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Сельское хозяйство является второй по важности отраслью специализации экономики Псковской области. Наиболее острой проблемой не только в регионе, но и на территории всей Российской Федерации является отсутствие качественного семенного материала. Это серьезно сдерживает рост урожайности картофеля в России, а также эффективное сортообновление и сортосмену. Сказывается общий невысокий уровень развития работ в области биотехнологии и устаревшая материально-техническая база семеноводства в целом.

Картофелеводство – одна из немногих отраслей сельского хозяйства, где уровень самообеспечения продукцией обычно превышает 100%. В среднем по России за 2011-2012 гг. самообеспеченность составляла 113%, по Северо-Западному федеральному округу - 86% (Измайлов, 2012).

Для поэтапного перевода оригинального, элитного и репродукционного семеноводства картофеля на современный технологический уровень необходимо объединение усилий государства и производителей семенного материала. Совместные усилия позволят российским специалистам выйти на такие объемы производства семян картофеля высокого качества, какие требуются для эффективной сертификации на всех уровнях производства семян, модернизировать лаборатории, а как следствие обеспечить продовольственную безопасность страны (Анисимов, 2000)

Один из факторов, влияющий на низкий уровень урожайности картофеля качество семенного материала. Картофель, зараженный различными фитопатогенами, обнаруживается во всех категориях хозяйств и практически во всех регионах, как с благоприятными, так и с неблагоприятными условиями возделывания (Коновалова, 2006).

Важнейшая задача семеноводства – сохранить в течение длительного времени продуктивность сортов. Значение при этом имеет наращивание производства оздоровленных клубней, совершенствование схем получения элиты, а также увеличение количественного выхода семенного картофеля, сокращения материальных, трудовых и энергетических затрат (Молявко, 2011).

Особым аспектом технологии получения высококачественного семенного картофеля является оздоровление материала методом апикальной меристемы в сочетании с термотерапией и применением клонального микроразмножения растений. Одним из путей повышения эффективности применения этого метода является поиск наиболее оптимального состава питательных сред и применение на регенерантах регуляторов роста, целенаправленный отбор пробирочного материала и миниклубней для размножения. Эти вопросы требуют тщательного изучения, закладки лабораторных и полевых опытов, внедрения их результатов в производство (Банадыев, 2003).

Для размножения должна использоваться коллекция высокопродуктивных, адаптированных к местным климатическим и почвенным условиям сортов картофеля, различающихся по продолжительности вегетационного периода (по скороспелости) и назначению использования. Это поможет разрешить сложившиеся проблемы с нестабильностью урожаев картофеля, а также качеством получаемой продукции (Лыкова, 2008).

Оптимизация процессов клонального микроразмножения позволит получать оздоровленный от вирусов и других инфекций (кроме почвенных) посевной материал, который, в свою очередь, послужит гарантом высоких урожаев (Перспективная схема размножения новых сортов..., 2009).

В работе представлена схема размножения картофеля различных по скорости созревания сортов, выращиваемых в культуре *in vitro*. Такая технология позволяет не только оздоравливать посадочный материал, но и увеличивать коэффициент размножения, а работы по созданию семенного материала ведутся в течение всего года, а не только в весенне-летний сезон, как при клоновом отборе в полевых условиях. Все представленные мероприятия позволяют обеспечивать посадочным материалом высокого качества сельскохозяйственные предприятия, что даст гарантию получения высоких урожаев, а значит, производство будет рентабельно.

Цель исследований – изучить и предложить для оригинального семеноводства ранних сортов картофеля концентрации питательных сред, приемы адаптации посадочного материала к естественным условиям с использованием фиторегуляторов и гуминового препарата.

Задачи исследований:

1. Выявить оптимальную концентрацию питательной среды для ускоренного размножения ранних сортов картофеля Лилея Белорусская, Бриз, Уладар, Тимо Ханккян, Импала полученных методом апикальной меристемы.
2. Изучить адаптационные способности меристемных растений картофеля в условиях *in vivo*.
3. Выявить оптимальные элементы технологии выращивания микрорастений картофеля в производственных условиях.
4. Определить экономическую эффективность технологии выращивания оздоровленного картофеля.

Научная новизна.

Впервые в условиях Северо-Запада РФ:

- Усовершенствована концентрация питательной среды с применением витаминов для выращивания ранних сортов картофеля.
- Предложен практический способ адаптации меристемных растений в условиях *in vivo* картофеля ранних сортов.
- Установлено положительное влияние фитогормонов и гуминового препарата при выращивании семенного материала раннего картофеля первого полевого поколения и супер суперэлиты.
- Определены и экономически обоснованы параметры технологии выращивания мини-клубней в производственных условиях.

Практическая значимость. Усовершенствованные концентрации питательной среды для ранних сортов картофеля, позволяющие увеличить коэффициент размножения в 2 раза относительно стандартной.

Выделены наиболее адаптированные сорта раннего картофеля полученного методом апикальной меристемы и разработана технология их выращивания для хозяйств Северо-Западной зоны РФ.

Возделывание сортов раннего картофеля по предложенной технологии на площади 1 га позволило получить прибавку урожая на 13 ц/га.

Положения, выносимые на защиту.

- Ускоренное размножение семенного картофеля, выращиваемого в культуре *in vitro* при использовании фитогормонов и комплекса витаминов в питательной среде.
- Параметры адаптивности к условиям *in vivo*.
- Основные элементы технологии выращивания картофеля для производства супер суперэлиты.
- Экономическая эффективность возделывания картофеля.

Степень достоверности результатов исследований. Работа выполнена согласно тематическому плану научно-исследовательских работ по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета: Совершенствование технологии производства семенного картофеля в условиях Северо-Западного региона.

Апробация положений и выводов диссертации. Результаты исследований докладывались на международных научно-практических конференциях молодых ученых ФГБОУ ВПО ВГСХА 2011-2013гг., на межд. науч.-практ. конф., посвященной 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова «Вавиловские чтения – 2012», Россия, г. Саратов, 2012 г., на междун. заочной науч.-практ. конф. «Ресурсный потенциал растениеводства - основа обеспечения продовольственной безопасности», Россия, г. Петрозаводск, 2012, 10 декабря 2012 г., на Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Россия, г. Пущино, 21 – 26 апреля 2013г.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, рекомендаций производству, списка использованной литературы, включающего 193 источников, в том числе 27 на иностранных языках. Работа изложена на 188 страницах, содержит 25 таблиц, 16 рисунков, 14 приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1 СЕМЕНОВОДСТВО КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ

В комплексе первоочередных направлений развития производства и рынка картофеля в Российской Федерации наиболее актуальной задачей является повышение эффективности использования сортовых ресурсов, прежде всего лучших отечественных селекционных достижений, а также освоение современных технологических схем производства оригинального, элитного семенного картофеля, поэтапный перевод на современные технологии обеспечит снижение затрат на производство единицы продукции и экономию расходных материалов (Усков, 2006).

Наиболее перспективным направлением для решения вышеназванной задачи является сочетание современных биотехнологических методов клонального микроразмножения, выращивание мини-клубней с проведением поддерживающих клоновых отборов в полевых условиях. Тем самым обеспечивается гарантированное и надежное качество семенного материала (Сидоренко, 2012).

Важнейшая задача семеноводства – сохранить в течение длительного времени продуктивность сортов. Значение при этом имеет наращивание производства оздоровленных клубней, совершенствование схем получения элиты, а также увеличение количественного выхода семенного картофеля, сокращения материальных, трудовых и энергетических затрат (Родькина, 2011).

Современный уровень элитного семеноводства картофеля достигает всего 77 тыс. тонн в год элитных семян, для реализации «Государственной программы развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия» требуется его увеличение на 15%. Для достижения этой цели требуется увеличение объемов производства элиты до 140-150 тыс. тонн ежегодно. При этом предстоит существенно улучшить качество производимого элитного картофеля.

ГЛАВА 2 МЕСТО, МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Место, материал и методика проведения исследований

Диссертационная работа выполнялась в лаборатории микроразмножения растений на базе ФГБОУ ВПО Великолукская ГСХА. Полевые исследования проводились на опытном поле в поселке Майкино и на сортоучастке ОАО Племзавод «Удрайское». Исследования проводились в условиях Псковской области в 2010-2013.

Объектом исследований служили сорта картофеля различающиеся по длине вегетационного периода и способности к накоплению урожая.

Опыты проводились в трехкратной повторности согласно методике работы, с культурой ткани изложенной в материалах РАСХН №6, 2002. Экспериментальные данные, полученные в опытах, подвергали математической обработке дисперсионным методом в изложении Доспехова Б.П. (2011). Экспериментальные исследования проводили с такими сортами картофеля, как Бриз, Лилея Белорусская, Импала, Тимо Ханккян, Уладар.

Для ускорения процесса приготовления необходимой среды готовили маточные или концентрированные растворы макро- и микро- солей, витаминов и фитогормонов. Мы применяли среду Мурасиге - Скуга. Для проведения исследований нами была разработана схема лабораторного опыта, представленная в таблице 1.

Таблица 1- Схема лабораторного опыта

Вариант	Название в опыте
I	MS
II	MS +вит 1,0
III	MS+вит 1,5
IV	MS+вит 2,0
V	MS +вит 2,5
VI	½ MS+ ГК 0,5
VII	½MS+ ГК 1,0

С целью изучения развития растений картофеля в зависимости от места взятия экспланта,

нами был заложен опыт. Микрочеренкование исходных растений проводили на апикальную (верхушечную), среднюю и базальную (нижнюю) части. Основным критерием было оценить количество междоузлий сформированных на среде с полной концентрацией минеральной части, а также на среде с обедненной минеральной частью, с добавлением в питательную среду гиббереллина в концентрации 0,5 мл/л, 1, мл/л.

В условиях *in vivo* проведены опыты:

Опыт 1. Приживаемость растений при различных вариантах предпосадочного замачивания.

Опыт 2. Приживаемость растений при различных вариантах полива.

Опыт 3. Изучение оптимизации густоты стояния.

Целью нашего исследования было изучение приживаемости растений, при пересадке их из условий *in vitro* в *in vivo*. Наблюдения проводились в три срока: 10, 20 и 30 дни вегетации.

Перед высадкой в ящики с землей применяли следующие условия: растения без замачивания водой, с замачиванием в воде, с замачиванием в препарате Макс Супер - Гумат (М.С.Г.) в различных концентрациях мл/л.

Далее на части растений использовался полив водой, другая часть поливалась Макс Супер - Гуматом в концентрации 4мл/1л воды.

Высадка растений в естественные условия схема посадки 70x25, 70x15, 70x20.

Наблюдения и учеты в опытах проводили согласно общепринятой методике исследований по культуре картофеля.

ГЛАВА 3 ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОРАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

3.1 Морфогенез растений-регенерантов картофеля в зависимости от состава питательной среды

Одним из показателей при работе с культурой ткани является число сформированных междоузлий на регенерируемом растении. Чем выше их выход, тем больше микрорастений можно получать при черенковании в процессе ускоренного размножения.

Наличие в питательной среде комплекса витаминов способствовало увеличению числа междоузлий на растении-регенеранте картофеля.

Таблица 2 – Формирование растений-регенерантов ранних сортов картофеля в зависимости от концентрации комплекса витаминов в питательной среде (среднее за 2011-2013гг)

Сорт	Среда	Период культивирования, дни			Высота растений на 21-е сутки, мм	± Число междоузлий на 21-е сутки к St, шт	± Высота растений на 21-е сутки к St, мм
		7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки			
Импала	MS(St)	1,4	2,6	4,7	45,6	-	-
	MS+ вит 1,0	2,0	3,0	5,1	58,1	+0,4	+12,5
	MS+ вит 1,5	2,3	3,3	5,4	60,6	+0,7	+15,0
	MS+ вит 2,0	2,2	3,5	5,8	63,4	+1,1	+17,8
	MS+ вит 2,5	2,5	3,4	6,6	79,6	+1,9	+34,0
Лилея Белорусская	MS(St)	1,6	2,4	5,1	53,4	-	-
	MS+ вит 1,0	2,0	3,0	5,3	65,8	+0,2	+12,4
	MS+ вит 1,5	2,2	3,0	6,0	69,4	+0,9	+16,0
	MS+ вит 2,0	2,5	3,5	6,2	74,8	+1,1	+21,4
	MS+ вит 2,5	2,6	3,4	6,1	82,4	+1,0	+29,0
Уладар	MS(St)	1,5	3,2	5,3	55,1	-	-

Продолжение таблицы 2

Уладар	MS+ вит 1,0	1,7	2,8	4,4	58,6	-0,9	+3,5
	MS+ вит 1,5	2,3	3,3	6,0	68,5	+0,7	+13,4
	MS+ вит 2,0	2,5	3,4	6,6	79,6	+1,3	+24,5
	MS+ вит 2,5	1,8	2,6	6,0	91,0	+0,7	+35,9
Тимо Ханккян	MS(St)	1,2	2,4	4,8	53,7	-	-
	MS+ вит 1,0	1,5	2,3	5,1	62,2	+0,3	+8,5
	MS+ вит 1,5	1,8	2,6	6,0	69,1	+1,2	+15,4
	MS+ вит 2,0	2,5	3,0	6,0	82,4	+1,2	+28,7
	MS+ вит 2,5	1,8	2,7	5,6	58,7	+0,8	+5,0
Бриз	MS(St)	1,8	2,4	4,3	60,1	-	-
	MS+ вит 1,0	1,9	2,5	4,9	59,6	+0,6	-0,5
	MS+ вит 1,5	2,2	2,6	5,8	70,5	+1,5	+10,4
	MS+ вит 2,0	3,0	4,6	6,7	82,4	+2,4	+22,3
	MS+ вит 2,5	2,5	3,4	6,6	87,3	+2,3	+27,2
НСР 05 для сорта				0,7	14,0	-	-
НСР 05 для среды				0,8	14,3	-	-

В результате проведения опытов получены следующие результаты: у сортов картофеля с увеличением концентрации комплекса витаминов число междоузлий на растение увеличивается в прямой зависимости от 4,7 шт. на сорте Импала на стандартной питательной среде до 6,6 шт. на среде с концентрацией витаминов 2,5 мл/л. У сорта Уладар на среде MS с добавлением витаминов в концентрации 2,5 мл/л также формируется 6,6 междоузлий, превышение со стандартной питательной средой составляет +1,3 штуки на растение. Сорта Тимо Ханккян и Бриз сформировали к 21 дню от 6,0...6,7 штук междоузлий на питательных средах MS+витамины 2,0...2,5 мл/л.

Важным оценочным показателем при производстве пробирочного материала является изучение высоты полученных регенерантов.

Максимального значения показателя сорт Импала достигал на 21-е сутки на питательной среде с комплексом витаминов в концентрации 2,5 мл/л, высота растений составляла 79,6 мм, превышение со стандартной питательной средой +34,0 мм. Сорт картофеля Лилея Белорусская на 21-е сутки формировал растения высотой 82,4 мм, превышение стандарта составляло +29,0 мм. Высоты в 91,0 мм достигали растения-регенеранты сорта Уладар. Сорта Тимо Ханккян и сорт Бриз на 21-е сутки эксперимента формировали растения высотой 82,4-87,3 мм соответственно.

Таким образом, на морфогенез растений-регенерантов ранних сортов картофеля положительное влияние оказывает концентрация витаминов в питательной среде 2,0...2,5 мл/л.

3.2 Морфогенез растений-регенерантов картофеля в зависимости от состава питательной среды и типа экспланта

Микрочеренкование исходных растений проводили на апикальную (верхушечную), среднюю и базальную (нижнюю) части. Основным критерием было оценить число междоузлий, сформированных на среде с полной концентрацией минеральной части, а также на среде с обедненной минеральной частью, с добавлением в питательную среду гиббереллина в концентрации 0,5...1,0 мл/л.

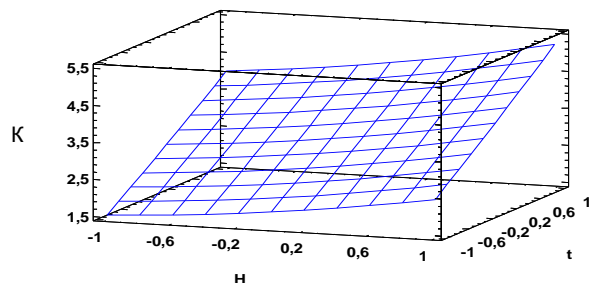
Сорта Уладар и Тимо Ханккян формируют от 1,6 штук междоузлий с Н1 до 2,6 штук междоузлий с Н3. Наибольшее количество междоузлий растения-регенеранты ранних сортов картофеля формируют на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS + ГК 0,5 на экспланте Н3: 2,5...3,3 штук междоузлий на растение по представленным сортам соответственно.

Для выявления характера воздействия питательной среды на число сформированных междоузлий с разных ярусов нами были сформированы математические модели процесса морфогенеза и ризогенеза.

На рисунке 1 представлена поверхность отклика для сформированных междоузлий на ис-

следуемом сорте картофеля Импала. Анализируя полученную зависимость (1), отмечаем, что число междоузлий увеличивается с продолжительностью времени выращивания растений картофеля *in vitro*.

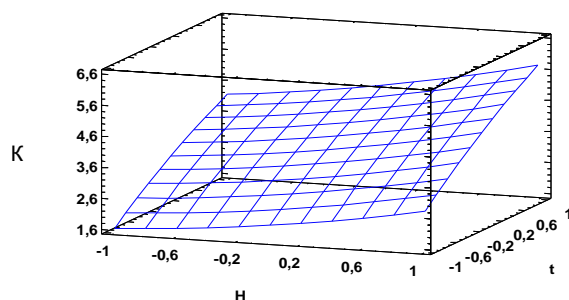
Для оценки формирования междоузлий на растениях картофеля сорта Импала и при наличии в питательной среде ГК в концентрации 0,5 получено уравнение регрессии $\frac{1}{2} MS + GK 0,5 = 3,58 + 0,68 * H + 1,4 * t + 0,1 * H * t + 0,17 * H^2 - 0,173684 * t^2$ (1).



K-число междоузлий на растении, шт
H- высота растений, мм
t-время выращивания, дни

Рисунок 1 – Зависимость формирования междоузлий сорта картофеля Импала на среде MS и времени культивирования

Наиболее значимым показателем является время выращивания картофеля – чем большее время растения находятся в условиях *in vitro*, тем большее число междоузлий они способны сформировать (Рисунок 2). $\frac{1}{2} MS + GK 0,5 = 3,58 + 0,68 * H + 1,4 * t + 0,1 * H * t + 0,17 * H^2 - 0,173684 * t^2$ (2)



K-число междоузлий на растении, шт
H- высота растений, мм
t-время выращивания, дни

Рисунок 2 - Зависимость формирования междоузлий сорта картофеля Импала на среде $\frac{1}{2} MS + GK 0,5$ и времени культивирования

К 21-му дню исследований в нашем опыте четко прослеживается тенденция прямой зависимости количества междоузлий от высоты взятия черенка на материнском растении. Растения картофеля исследуемых сортов сформировали от 4,2 до 5,4 штук междоузлий на растениях Н1, от 4,3 до 5,6 штук на Н2, и 5,3...6,8 штук междоузлий на черенке из верхнего яруса.

Положительное влияние уменьшения минеральной части и добавление в питательную среду ГК в концентрации 0,5 мл/л оказывает на формирование эксплантов апикальной части растений у исследуемых растений картофеля. Лиляя Белорусская +2,5 шт. междоузлий и +45,0 мм к контролю, сорт Бриз - +2,2 шт. междоузлий и +25,0 мм, сорт Тимо Ханккян - +1,8 шт. междоузлий и 37,9 мм по высоте, сорт Уладар +28,6 мм по высоте и 2,5 шт. междоузлий составила прибавка к контрольному варианту. Сорт Импала положительно реагирует на повышение ГК до 1,0 мл/л в питательной среде.

3.3 Обоснование подбора состава питательной среды для процесса ризогенеза растений картофеля

Важным моментом при клональном микроразмножении является усиление процесса ризогенеза. Основным показателем ризогенеза для растений *in vitro* можно считать число корней и их длину. Хорошо сформированная корневая система оказывает положительное влияние на онтогенез микрорастений.

По формированию корней на среде с витаминами 1,5 мл/л можно отметить сорта Бриз и Тимо Ханккиян, Уладар при такой концентрации они способны формировать 4,6...5,7 штук корней в среднем на растение (Таблица 3).

Таблица 3 – Динамика роста корневой системы микрорастений картофеля различных сортов на различных модификациях среды MS (среднее за 2011-2013 гг.)

Сорт	Среда	Период культивирования, дни			Длина корней на 21-е сутки, мм	± Число корней на 21-е сутки к St, шт.	± Длина корней на 21-е сутки к St, мм
		7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки			
Импала	MS	1,2	2,3	5,1	51,7	-	-
	MS+ вит 1,0	1,4	2,8	5,4	56,6	+0,3	+4,9
	MS+ вит 1,5	2,2	3,9	5,5	57,7	+0,4	+6,0
	MS+ вит 2,0	3,4	5,1	6,5	66,9	+1,4	+15,2
	MS+ вит 2,5	3,4	5,0	7,5	92,3	+2,4	+40,6
Лиляя Белорусская	MS	1,6	2,5	5,6	60,6	-	-
	MS+ вит 1,0	2,1	3,1	5,4	63,9	-0,2	+3,3
	MS+ вит 1,5	2,7	3,6	5,7	68,0	+0,1	+7,4
	MS+ вит 2,0	3,4	4,8	6,2	71,1	+0,6	+10,5
	MS+ вит 2,5	3,3	6,2	7,0	92,5	+1,4	+31,9
Уладар	MS	1,5	2,6	5,4	67,8	-	-
	MS+ вит 1,0	2,6	3,7	6,2	74,6	+0,8	+6,8
	MS+ вит 1,5	3,0	4,6	6,7	82,2	+1,3	+14,4
	MS+ вит 2,0	3,3	4,9	7,2	91,7	+1,8	+23,9
	MS+ вит 2,5	2,8	4,3	5,8	63,3	+0,4	-4,5
Тимо Ханккиян	MS	1,9	2,8	5,5	70,9	-	-
	MS+ вит 1,0	2,3	4,4	5,9	71,3	+0,4	+0,4
	MS+ вит 1,5	2,9	4,7	6,6	77,7	+1,1	+6,8
	MS+ вит 2,0	3,0	6,1	7,0	82,5	+1,5	+11,6
	MS+ вит 2,5	3,3	4,9	7,2	91,7	+1,7	+20,8
Бриз	MS	1,8	2,7	5,6	58,7	-	-
	MS+ вит 1,0	2,4	4,1	6,6	67,4	+1,0	+8,7
	MS+ вит 1,5	2,8	5,7	7,4	74,8	+1,8	+16,1
	MS+ вит 2,0	3,9	6,7	8,8	93,5	+3,2	+34,8
	MS+ вит 2,5	4,0	6,8	8,2	71,8	+2,6	+13,1
НСР 05 для сорта				1,5	11,4	-	-
НСР 05 для среды				1,3	10,0	-	-

Лучшее корнеобразование на 21-е сутки отмечается на питательной среде MS+ витамины 2,5. Если контрольный вариант в среднем образовывал 5,1штук корней, длина которых составляла 51,7 мм (Импала), то на вышеуказанной среде сформировано 7,5 штук длиной 92,3 мм, таким образом, превышение стандарта по количеству корней составило +2,4 штук, а по длине +40,6 мм.

Аналогично представленной схеме формирования корней под действием витаминов разви-

тие корневой системы наблюдается и у других сортов. Полученные результаты исследований позволяют отметить положительное воздействие витаминов на общую длину корневой системы картофеля *in vitro*. Достаточная длина способствует в будущем хорошей приживаемости, более полному поглощению питательных веществ, а также развитию всего микрорастения.

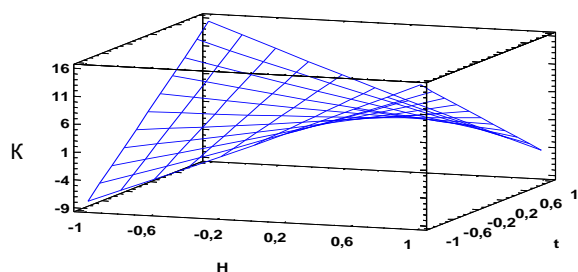
3.4 Ризогенез растений-регенерантов картофеля в зависимости от состава питательной среды и типа экспланта

Для изучения развития корневой системы микрорастений картофеля в зависимости от места взятия экспланта нами был заложен опыт, основной задачей которого являлась оценка количества и длины корневых волосков, сформированных на средах с полной концентрацией минеральной части, с обедненной минеральной частью и с добавлением в питательную среду гиббереллина в концентрации 0,5-1,0 мл/л. (Рисунок 3).

После проведения регрессионного анализа получено уравнение

$$MS = 3,22 + 1,0 * N + 0,86 * t + 1,23E-11 * N * t + 0,34 * N^2 + 0,04 * t^2 \quad (3).$$

На рисунке 3.8 отражена поверхность отклика для формирования корневой системы сорта картофеля Импала.



K-количество корней, штук
 N- параметры питательной среды
 t- время выращивания, дни

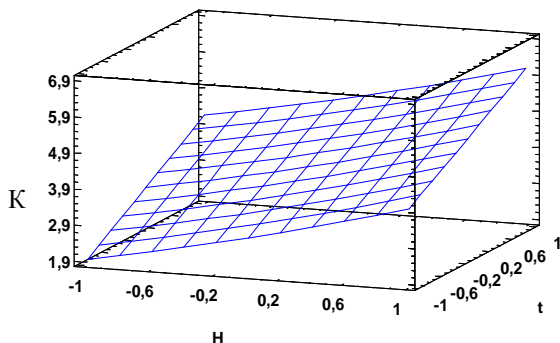
Рисунок 3 – Динамика роста корневой системы картофеля сорта Импала на среде MS и времени культивирования

При анализе уравнения регрессии (3) отмечаем, что на корневую систему наибольшее влияние оказывает состав питательной среды, время культивирования менее значимо для данного параметра. Но наибольшие значения отмечаются к 21-му дню исследований.

Сорт Импала сформировал 3,7 штуки корней на растении. Сорта Лилея Белорусская и Уладар - по 3,0...3,4 штук корней в среднем на растение. Сорта Тимо Ханккян и Бриз сформировали от 3,4 до 4,0 штук корней на растение соответственно.

Согласно общей тенденции предыдущего опыта, формирующаяся корневая система растений картофеля *in vitro* зависит от места взятия экспланта на материнском растении, а также от состава среды, на которой выращивается. Для оценки формирования корневой системы сорта картофеля Импала при добавлении в состав питательной среды ГК 0,5 получено уравнение (4).

$\frac{1}{2} MS + GK 0,5 = 3,93 + 0,98 * N + 1,11 * t - 0,02 * N * t + 0,10 * N^2 + 0,007 * t^2 \quad (4)$, из представленных данных можно сделать вывод о положительном влиянии фитогормона на формирование корневой системы исследуемого сорта (Рисунок 4).



K-количество корней
 N- параметры питательной среды
 t- время выращивания, дни

Рисунок 4 – Зависимость формирования корневой системы сорта картофеля Импала на среде $\frac{1}{2} MS + GK 0,5$ и времени культивирования

На 21-е сутки пассажа по количеству корней нами получены следующие результаты: максимальный показатель был получен у сорта Бриз на черенке из апикальной части материнского растения. Растения образуют в среднем 6,9 штук корней, их длина составляет 104,1 мм, превышение стандарта +3,4 штуки корня, +61,3 мм длины. Результаты, полученные на варианте черенка НЗ на сорте Импала – 6,1 штук корней, при их длине в 92,8 мм, значения выше стандартного на 43,1 мм по длине и 2,0 штук по количеству корней.

Сорт Лилея Белорусская – 6,3 штук корней в среднем на растение, длина корней 105,4мм, превышение стандарта +2,2 штук корней, +55,7 мм длины. Сорт Тимо Ханккян по количеству корней превысил стандарт на 2,4 штуки, длина корней составила 91,5 мм, значение выше стандартного на 41,8 мм.

3.5 Создание морфологических структур растений-регенерантов картофеля в зависимости от состава питательной среды

В ходе онтогенеза каждый организм закономерно проходит последовательные фазы, стадии и периоды развития. Онтогенез микрорастений начинается от момента черенкования и может быть прерван очередным пассажем при поддержании коллекции *in vitro* или завершиться высадкой микрорастений в условия *in vivo*. В первом случае растения-регенеранты формируют отдельные органы, во втором – проходят полный цикл онтогенеза.

В таблице 4 проведен комплексный анализ основных показателей морфо - и ризогенеза растений-регенерантов в зависимости от состава питательной среды.

Таблица 4 - Морфогенез растений-регенерантов при использовании различного состава питательной среды на 21-е сутки эксперимента, среднее за 2010-2013гг

Сорт	Состав питательной среды	Число междоузлий, шт.	Высота растения, мм	Корнеобразование	
				шт.	мм
Импала	MS+вит 2,0	5,8	63,4	6,5	66,9
	MS+вит 2,5	6,6	79,6	7,5	92,3
	½ MS+ ГК 0,5(НЗ)	5,7	67,3	6,1	91,8
	½ MS+ ГК 1,0(НЗ)	5,4	78,0	6,0	91,5
Лилея Белорусская	MS+вит 2,0	6,2	74,8	6,2	71,1
	MS+вит 2,5	6,1	82,4	7,0	92,5
	½ MS+ ГК 0,5(НЗ)	6,7	94,7	6,3	107,0
	½ MS+ ГК 1,0(НЗ)	6,3	70,0	6,2	91,5
Уладар	MS+вит 2,0	6,6	79,6	7,2	91,7
	MS+вит 2,5	6,0	91,0	5,8	63,3
	½ MS+ ГК 0,5(НЗ)	5,9	87,6	6,0	94,6
	½ MS+ ГК 1,0(НЗ)	6,1	84,0	5,7	84,0
Тимо Ханккян	MS+вит 2,0	6,0	69,1	7,0	82,5
	MS+вит 2,5	6,0	82,4	7,2	91,7
	½ MS+ ГК 0,5(НЗ)	6,8	100,1	6,5	104,7
	½ MS+ ГК 1,0(НЗ)	6,5	95,0	11,4	115,3
Бриз	MS+вит 2,0	6,7	82,4	8,8	93,5
	MS+вит 2,5	6,6	87,3	8,2	71,8
	½ MS+ ГК 0,5(НЗ)	6,7	96,7	6,9	115,8
	½ MS+ ГК 1,0(НЗ)	5,8	72,6	6,0	99,4

Интерпретация полученных экспериментальных данных по изучению образования морфологической структуры микрорастения в зависимости от питательной среды позволяет отметить:

- наивысшие результаты по морфогенезу отмечены на сортах Лилея Белорусская и Тимо Ханккиян на варианте питательной среды $\frac{1}{2}$ MS+ ГК 0,5. Такие растения образовали 6,7...6,8 штук междоузлий на 21-е сутки культивирования;
- внесение в состав питательной среды комплекса витаминов в концентрации 2,0...2,5 мл/л способствовало увеличению выхода междоузлий у растений-регенерантов сортов Импала и Бриз до 6,6... 6,7 штук;
- высокий ризогенез сорта отмечается в вариантах питательной среды с комплексом витаминов в концентрации 2,0-2,5 мл/л: Импала 6,5...7,5; Тимо Ханккиян 7,0...7,2; Бриз 8,2...8,8 в среднем штук корней на растение-регенерант. Длина корней превысила показатель стандарта на 15,2...40,6 мм, 11,6...20,8 мм и 13,1...34,8 мм по вышеуказанным сортам соответственно;
- высота растений – регенерантов при культивировании *in vitro* находилась в прямой зависимости от состава питательной среды. Выявлено положительное влияние на рост растений питательной среды $\frac{1}{2}$ MS+ ГК 0,5, добавление гиббереллина способствовало получению хорошо развитых растений, высота которых на 21-е сутки достигала 67,3...101,1 мм, и превысила растения на стандартной среде по этому показателю на 17,6...37,9 мм в зависимости от изучаемого сорта.

ГЛАВА 4 АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

Использование препарата Макс Супер Гумат в различных концентрациях дало положительные результаты.

Для лучшей адаптации корневой системы картофеля, а также растения в целом можно использовать воду, а также добавлять в нее препарат, стимулирующий развитие корневой системы и способствующий укоренению.

В варианте «без замачивания» приживаемость растений резко снижается с 63 % на 10-й день после высадки в грунт до 40 % на 30-й день у сорта Импала. В представленных условиях растения картофеля сортов Лилея Белорусская, Бриз и Уладар к 10-му дню приживаются на 80 % от посаженных в опыте, к 30-му дню приживаемость снижается до 47...53 %. Наилучшая приживаемость отмечается у сорта Тимо Ханккиян – к 10-му дню приживается 83 % высаженных растений, к 30-му их количество снижается до 60 %.

При замачивании растений в воде выявлены следующие закономерности: у сорта Импала на 10 день приживается до 90 % растений картофеля, на 30-й день исследований их количество снижается до 83 %. Лучшие результаты в представленном варианте опыта получены у сорта Лилея Белорусская – приживаемость составляет 100 % в первые 20 дней после высадки в грунт, к концу эксперимента она снижается до 90 %.

Использование препарата Макс Супер Гумат в различных концентрациях дало положительные результаты, так картофель сорта Импала к 30-му дню опыта приживается на 77% при концентрации препарата перед посадкой 2 мл/л, и на 83 % при концентрации препарата 3 мл/л. Сорт Лилея Белорусская приживается на 87 % при обоих вариантах концентрации.

При проведении опыта получено, что наилучшие показатели при переносе растений картофеля *in vitro* в *in vivo* достигаются при предварительном замачивании с препаратом Макс Супер Гумат в концентрации 2мл/л, а также их поливать тем же препаратом, увеличив концентрацию до 4мл/л. Такие условия способствуют стабильной адаптации растений к внешним условиям, меньшим выпадом в условиях грунта.

ГЛАВА 5 ПРИМЕНЕНИЕ ФИТОРЕГУЛЯТОРОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА МЕРИСТЕМНОГО МАТЕРИАЛА

В целом, изучаемые фиторегуляторы оказали положительное влияние на процессы роста и развития растений картофеля. Наиболее эффективно стимулировали рост и развитие картофеля фиторегуляторы Циркон в меньшей степени Эпин. Положительным моментом стимуляции является то, что увеличение общей биомассы растений приводило к повышению интенсивности фотосинтетических процессов в листьях картофеля.

Таблица 5 - Структура урожая растений в зависимости от применения фиторегуляторов на картофеле сорта Импала (среднее за 2011-2012гг.)

Вариант	Урожайность, т/га	Масса клубней, г/раст	Число клубней, шт./раст.	Масса клубней по фракциям, г		
				<30	30-90	>90
Контроль	17,4	531,7	8,3	1,5	6,3	0,5
Гумат натрия	17,7	530,1	8,5	1,1	6,5	0,9
Циркон	25,3	801,2	11,9	1,1	8,9	1,9
Эпин	21,3	652,9	10,7	1,2	7,7	1,8
Гетероауксин (Корневин)	24,7	790,3	11,6	1,1	8,7	1,8
НСР ₀₅	7,5	-	3,4	-	-	-

Анализ полученных данных по влиянию фиторегуляторов на продуктивность картофеля показывает, что все фиторегуляторы способствовали увеличению его продуктивности (2...47 %). Максимальная прибавка урожая (46,2 %) отмечена в варианте с обработкой Цирконом по сравнению с контролем и эталоном соответственно (Таблица 5). Эффективность препарата Эпин в увеличении урожайности существенно ниже (22,7 %). Фиторегулятор Циркон оказал влияние на увеличение урожайности.

ГЛАВА 6 ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ

6.1 Влияние сроков удаления ботвы на урожайность супер-суперэлитного картофеля

Завершающим звеном оригинального семеноводства картофеля является производство супер-суперэлитного материала. Растения, соответствующие данной классности должны образовывать на посадках типичные по морфологическим признакам и выровненные по росту и развитию растения. Соответственно качественные характеристики данного класса в периоды выращивания, уборки и хранения должны находиться на высоком уровне.

Для закладки опыта по изучению количественного и качественного выхода семенного материала в зависимости от сроков удаления ботвы в питомнике супер-суперэлитного картофеля использован посадочный материал из питомника первого полевого поколения при удалении ботвы через 10 и 20 дней после начала цветения. Продуктивность растений различалась как в зависимости от сроков уборки, так и от особенностей сорта. Выход количественного материала с площади при удалении ботвы через 10 дней после начала цветения на контрольном сорте Импала составил 8,6 штук клубней с одного растения, в аналогичном варианте сорта картофеля Бриз, выход увеличился на 30%, что составляло 11,2 штук клубней с одного растения. Более длительное вегетирование растений и скашивание ботвы через 20 дней после начала цветения способствовало росту данных показателей. Сорт Импала сформировал 9,6 штук клубней – превышение контрольного варианта составило 1,0 клубень или 11%, у сорта Бриз данный показатель составил 12,5 клубней на растение, превышение контрольного варианта составило 45%.

Выход семенного материала в питомнике супер-суперэлитного картофеля отмечен у сорта Импала при удалении ботвы через 20 дней после начала массового цветения – 602,5 тыс. шт./га, превышение контрольного варианта составила 151,0 тыс. шт./га. Наибольший выход семенного материала при тех же условиях отмечается у сорта картофеля Бриз – 853,0 тыс. шт./га, превышение контрольного варианта составило 401,5 тыс. шт./га или 88%. Урожайность составила на контрольном варианте 15,6 т/га, превышение показателя на 9,5 т/га отмечалось у сорта Импала при проведении технологического мероприятия через 20 дней после начала массового цветения.

Урожайность сорта Бриз составила 33,5 т/га в первом варианте скашивания ботвы, превышение контрольного варианта составило 17,9 т/га, урожайность при скашивании ботвы во второй срок составило 46,0 т/га, превышение контроля на 30,4 т/га.

6.2 Влияние густоты посадки пробирочных растений на урожайность мини-клубней в открытом грунте

В контрольном варианте на раннем сорте Импала из 100 высаженных растений к уборке сохранилось 89,5%, в варианте 70x15см доля сохранившихся растений составила 88,5%, а в варианте 70x25 – 91%. По сравнению с контрольным вариантом по площади питания 70x20см количество растений к уборке составило 94,5%, что выше контрольного варианта на 5,0%, уменьшение площади питания до 70x15см для сорта Бриз привело к приживаемости растений до 95%, превышение контрольного варианта составило 5,5%. Лучшей площадью питания для сорта картофеля Бриз стала 70x25см, превышение контрольного варианта составило 9%, в среднем за 2 года из 100 высаженных растений приживалось 98,5 штук.

Общее количество клубней у сорта Импала составляет 10,5...12,3 штуки в зависимости от варианта площади питания, количество клубней с одного куста сорта Бриз на варианте 1 – 12,8 штук, 12,4 штук на варианте посадки 2, максимальное значение показателя 13,9 штук клубней на варианте 3 – площадь питания составляет 70x25.

6.3 Результаты обработки гуминовыми препаратами *in vitro* размножаемых растений картофеля в условиях *in vivo*

С развитием рыночных отношений требования к качеству продукции растут с каждым годом и товаропроизводителям уже важно не только получить высокий урожай, но и поставлять покупателю здоровые, неповрежденные, клубни высокого качества, особенно такие критерии целесообразно применять для воспроизводимого семенного материала. В опытах использовали препараты «Макс Супер Гумат» и «Гумат Сахалинский». Стандартом являлся сорт Импала. Внекорневые подкормки путем опрыскивания растений дважды: 1-контроль, без обработки, 2-Макс Супер Гумат, 3- Гумат Сахалинский. Максимальное значение такого показателя как количество клубней с одного растения картофеля наблюдается в варианте 2, на обоих исследуемых сортах, превышение контрольного варианта составляет 1,5...2,0 штук клубней на растение. В варианте 3 в обоих случаях обработки превышение стандарта достигает 0,9...1,3 штук клубней на растение. Максимальное значение такого показателя как урожайность также выявлено на варианте 2, превышение контроля на 0,6...4,5 т/га.

Таблица 6 - Результаты обработки *in vitro* размножаемых растений картофеля гуминовыми препаратами

Сорт	Вариант	Структура урожая клубней одного растения				
		Кол-во клубней на растение, шт.	Урожайность, т/га	По наибольшему поперечному диаметру		
				>60мм	60-30мм	<30мм
средняя масса клубня, г						
Импала	1	7,1	19,0	76,0	47,0	26,5
	2	8,6	19,6	64,0	41,0	27,5
	3	8,0	19,0	69,5	36,5	31,0
Бриз	1	7,0	20,9	84,5	45,5	32,0
	2	9,1	23,5	83,0	47,0	34,0
	3	8,4	21,5	76,5	41,0	31,5
НСР05	-	-	1,9	-	-	-

1-контроль, без обработки, 2-Макс Супер Гумат, 3- Гумат Сахалинский

Наименьший выход нестандартных клубней наблюдается у исследуемых сортов на варианте 2, этот показатель составляет 3,4...4,0%.

На основании анализа представленной таблицы можно сделать вывод о том, что для наилучшей адаптации в условиях *in vivo* на безвирусном семенном материале картофеля следует использовать гуминовый препарат Макс Супер Гумат в рекомендуемой производителем концентрации для овощных культур.

ГЛАВА 7 ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экономически наиболее выгодным является вариант при выращивании картофеля сорта Бриз, при поливе посадок гуминовым препаратом Макс Супер Гумат. В этом варианте выше урожайность мини клубней – 23,5 ц/га, а рентабельность производства мини клубней составляет 49%.

ВЫВОДЫ

1. Максимального морфологического развития на питательных средах с различной концентрацией витаминов и фитогормонов растения картофеля в условиях *in vitro* достигают на 21-й день.
2. Большую отзывчивость на состав питательной среды и концентрацию витаминов проявили сорта Импала, Лилея Белорусская, Тимо Ханккиян, Бриз. Оптимальные морфологические показатели зафиксированы у этих сортов на питательной среде MS+ вит. 2,0мл/л. По количеству междоузлий +1,1...+1,9 шт. на 1 растение; по высоте растений +1,7...+36,8мм; по общей длине корневой системы +15, 2...41,8мм ; количеству корней +1,1...+3,7 шт. на 1 растение.
3. Наиболее адаптированной к условиям *in vivo* была рассада картофеля предварительно замачиваемая в растворе препарата Макс Супер-Гумат в концентрации 2мл/л, с последующим их поливом этим же препаратом в концентрации 4мл/л. Приживаемость составила 90-97%.
4. Обработка посадок картофеля фиторегуляторами способствовала меньшей заболеваемости растений фитофторозом. Количество пораженных растений картофеля при обработке Цирконом, Эпином и Гетероауксином составила 27, 4%.
5. Применение фиторегуляторов в период вегетации на сортах картофеля стимулировало клубнеобразование, увеличивало коэффициент размножения, выход семенной фракции, что приводило к увеличению продуктивности до 50,6%.
6. Наибольший выход семенного материала в питомнике супер-суперэлитного материала отмечен у исследуемых сортов картофеля при удалении ботвы через 20 дней после начала массового цветения – 25 т/га сорт Импала, 46 т/га сорт Бриз. Оптимальной схемой для выращивания семенного материала являлась площадь питания 70x15см для сорта Импала, 70x25 для сорта Бриз. Продуктивность в граммах с 1го куста – 741,0 (16,5шт.) – сорт Импала; 409,4 (7,7шт.) – сорт Бриз.
7. Доращивание различных сортов картофеля с использованием гуминовых препаратов является экономически оправданным приемом. Лучшим в опыте являлся вариант с использованием препарата Макс Супер-Гумат на сорте Бриз (рентабельность 49,0%, условный чистый доход (руб./га) - 463787,8; условный чистый доход (руб./кг)- 19,74; себестоимость семенных клубней, руб./га – 40,26).

Предложения производству

1. Выращивая картофель *in vitro* при приготовлении питательной среды следует использовать комплекс витаминов (В1, В6, С) в концентрации 2 мл/л и ГК 0,5 мл/л, уменьшив при этом минеральную часть на ½.
2. Для лучшей адаптации мини-растений картофеля к условиям *in vivo* их следует предварительно замачивать в растворе препарата Макс Супер-Гумат в норме расхода 2 мл/л с последующим поливом во время роста растений этим же препаратом в норме расхода 4 мл/л. Оптимальной площадью питания для выращивания картофеля следует считать 70x15см для сорта Импала, 70x25 для сорта Бриз.
3. С целью увеличения коэффициента размножения и сохранения клубней 1-го полевого поколения ботву следует скашивать через 20 дней после начала массового цветения.
4. Для снижения заболеваемости растений картофеля фитофторозом на семенных посадках следует использовать препараты Циркон и Эпин в норме расхода 10 г/л и 80 мл/л соответственно.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лебедева Н. В. Использование оздоровленного картофеля в производственных условиях Порховского района / Ю. Н. Федорова, Л. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // **Труды Кубанского государственного аграрного университета**. – 2011. - № 3(30). – 178-181с. (личное участие – 70 %)
2. Лебедева Н. В. Оптимизация получения растений картофеля в культуре *in vitro* / Ю. Н. Федорова, А. Н. Кононенко, Н. В. Лебедева // **Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета**. – 2012. - №28. – С. 15-17. (личное участие – 75 %)
3. Лебедева Н. В. Изучение мини-растений картофеля белорусской селекции в условиях Псковской области / Ю. Н. Федорова, Л. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // **Вестник КрасГАУ**. - 2013. – Вып. 9. - С.99-103. (личное участие – 80 %)
4. Лебедева Н. В. Влияние культуры ткани на морфологические признаки сортов / Ю. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // Достижения молодых ученых: перспективы, технологии, инновации для развития АПК: сб. материалов межд. науч.-практ. конф. – Великие Луки: РИО ВГСХА, 2011. – С.105-106. (личное участие – 90 %)
5. Лебедева Н. В. Оптимизация условий ускоренного размножения микро-растений картофеля в условиях *in vitro* ведения оригинального семеноводства. / Ю. Н. Федорова, Л. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // Вавиловские чтения - 2012: материалы межд. науч.-практ. конф., посвященной 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов: ИЦ «Наука», 2012. – 444 с. (личное участие – 80 %)
6. Лебедева Н. В. Результаты исследований процесса морфогенеза на различных питательных средах у сортов картофеля Наяда и Изора / Ю. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // Ресурсный потенциал растениеводства - основа обеспечения продовольственной безопасности: тр. межд. заочной науч.-практ. конф. (10 декабря 2012 года, г. Петрозаводск). - Петрозаводск: Изд-во Петр-ГУ, 2012. – С. 196. (личное участие – 90%)
7. Лебедева Н. В. Оптимизация условий ускоренного размножения *in vitro* микрорастений картофеля в условиях ведения оригинального семеноводства / Ю. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // Достижения молодых ученых в решении проблем АПК: материалы межд. науч. – практ. конф. молодых ученых (18-19 апреля 2012 г., г. Великие Луки). – Великие Луки: РИО ВГСХА, 2012. – С.5-7. (личное участие – 95%)
8. Лебедева Н. В. Применение различных концентраций витаминов на картофеле, выращиваемом в культуре *in vitro*. / Ю. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // Биология – наука XXI века: сб. тез. 17-й межд. Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 21 – 26 апреля 2013 г., г. Пущино). - Пущино, 2013. - С. 346-347. (личное участие – 95%)
9. Лебедева Н. В. Приживаемость растений при пересадке их из условий *in vitro* в *in vivo* / Ю. Н. Федорова, Н. В. Лебедева // Взгляд молодых ученых на техническую и технологическую модернизацию АПК: материалы межд. науч.-практ. конф. молодых ученых (18-19 апреля 2013 года, г. Великие Луки). – Великие Луки: РИО ВГСХА, 2013. – С.116-121. (личное участие – 95%)