

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ БЕЗВИРУСНОГО СЕМЕНОВОДСТВА КАРТОФЕЛЯ

Картофель является одним из важнейших сельскохозяйственных культур. В плане продовольственной безопасности в условиях роста населения и повышении уровня голода Генеральная Ассамблея ООН основываясь на мнении ученых, стремится привлечь внимание мирового сообщества на роль картофеля, считая, что решить проблему продовольственной безопасности будущего человечества может только картофель и развитие этой отрасли имеет очень важное стратегическое значение. Картофель в качестве продовольственной культуры потребляют более 3-х млрд. человек населения планеты и его выращивают в 150 странах мира.

За последние четыре десятилетия мировой уровень производства картофеля характеризуется существенным увеличением посевных площадей, повышением урожайности и значительным увеличением валового сбора этой культуры. Так, в сравнении с 1980 годом площади посадки картофеля в мире увеличились с 18 до 19 млн. гектар, средний уровень урожайности повысился с 14 до 17 тонн с гектара, валовой сбор возрос с 257 до 328 млн. тонн. Ежегодное мировое производство картофеля составляет более 300 млн. тонн. В Казахстане картофель возделывается на площади 160-170 тыс. га. Урожайность не превышает 15 т/га [1, с. 61].

Картофель, как быстрорастущая и высокоурожайная сельскохозяйственная культура, в относительно короткие сроки с единицы площади дает больше продуктов питания, чем любая другая сельскохозяйственная культура. Картофель культура способная решать не только проблемы мирового производства продуктов питания, но и биоэнергетики [2, с. 21].

Картофель из-за биологических особенностей в наибольшей степени, чем другие сельскохозяйственные культуры, подвержен вирусным и вириодным заболеваниям. К примеру, мировые потери от них составляют 90 млн. тонн, урожайность снижается на 40-50%, а потери клубней при хранении могут достигать 15-20%. Потери урожая определяются видом возбудителя, штаммом, степенью устойчивости сорта, условиями выращивания картофеля и погоды. Легкие формы вирусных заболеваний снижают урожай в среднем на 10-20%, тяжелые на 70-85%, а в некоторых случаях до 100%. Содержание крахмала обычно снижается на 0,8-4,6% по сравнению со здоровыми клубнями. В них уменьшается количество сырого протеина, витаминов С, В₁, В₂.

Существует 30 вирусов поражающих эту культуру. Только из-за поражения вирусами Y, M, X, S, L, V (наиболее распространенными в картофелеводческих районах республики Казахстан) урожайность картофеля ежегодно снижается на 40-50%, а также вызывает ускоренное вырождение сорта. Широкое распространение получили такие вирусные болезни как полосчатая мозаика, скручивание листьев, крапчатая мозаика, столбурное увядание и готика.

Снижение урожайности картофеля и способности храниться усиливается с каждой последующей посадкой. Растение вырождается, дегенерирует, и наблюдать это явление внешне может даже не специалист: листья картофеля покрываются морщинистой мозаикой, мозаичной крапчатостью (чередование светло- и темноокрашенных участков листа) или скручиваются-закручиваются. Это явление до настоящего времени остается главной проблемой картофелеводства [3, с. 44].

Трудность борьбы с вирусными инфекциями объясняется тем, что вирусы не обладают собственным метаболизмом и при заражении входят в такой тесный контакт с клетками хозяина, что по существу становятся их частью. Генетическая информация, заложенная в вирусной нуклеиновой кислоте, реализуется клеткой при инфекции как своя собственная, что ведет к синтезу вирусных нуклеиновых кислот и белков. Благодаря тесной ассоциации, при которой вирус использует те же механизмы и процессы, которые участвуют в синтезе нуклеиновых кислот и белков в клетках хозяина, химические препараты, которые могут влиять на размножение вируса, тормозят и синтез нормальных нуклеиновых кислот.

Наиболее успешной мерой защиты урожая в настоящее время является оздоровление посадочного материала методом культуры ткани от вирусов с последующим культивированием в условиях защиты от повторной инфекции [4, с. 30]. В практике первичного семеноводства картофеля, для получения оздоровленного исходного материала широко используются методы биотехнологии, в том числе микрочлониальное размножение, которое позволяет получить оздоровленный от вирусных инфекций семенной материал. Основой производства оздоровленного исходного материала картофеля являются получение растений-регенерантов из эксплантов апикальной меристемы, культивирование их на искусственных питательных средах, тестирование на вирусы и дальнейшее размножение методом микрочленкования в культуре *in vitro*. Это связано с тем, что вирусные болезни слабо развиваются в верхушечных точках роста – апикальных меристемах (меристема, закладывающаяся на верхушке побега и корня). Конечно этот процесс очень трудоемкий, в первоначальный период требующий определенных затрат для приобретения дорогостоящих компонентов питательной среды и оборудования, но эти затраты быстро окупаются так, как семенной картофель, освобожденный от вирусов, превышает по урожайности обычный на 40-80%, а иногда и в 2 раза [5, с. 13].

Для пробирочных растений, культивированные *in vitro*, естественные климатические условия (резкая смена температур, световой и водный режимы) являются своего рода стрессовыми факторами, поэтому при выращивании растений в полевых условиях ухудшается их приживаемость, количество погибших растений достигает до 25-30%, которые в конечном итоге влияют на продуктивность.

Многолетними исследованиями установлено, что выращиваемый непосредственно в полевых условиях исходный материал подвергается повторному заражению вирусными болезнями.

В связи с этим, актуальным является разработка технологии культивирования оздоровленных мини-клубней в тепличных условиях и использование их в качестве посадочного материала в открытом грунте вместо культуральных растений, для ведения элитного семеноводства.

Основные этапы оздоровления таковы:

Первый этап – получение оздоровленных пробирочных растений (первый год):

- подготовка клубней для вычленения апикальной меристемы из ростков клубней, стерилизация растительного материала для вычленения апикальных меристем методом культуры тканей, изолирование эксплантов;

- культивирование изолированных эксплантов *in vitro*, получение растений-регенерантов);

- диагностика регенерантов и отбор здоровых линий;

- черенкование полученных растений-регенерантов и их пассаж на питательную среду;

- диагностика линий на зараженность вирусами высокочувствительными методами ИФА и ОТ-ПЦР анализов;

- размножение регенерантов многократным черенкованием до необходимого количества.

Второй этап – производство мини-клубней:

- посадка пробирочных растений в теплицу;

- систематическая обработка растений против болезней;

- диагностика тепличных растений на зараженность вирусами [6, с. 46].

Третий этап – размножение семенного материала в полевых условиях:

- высадка мини-клубней в поле, получение первой полевой репродукции картофеля, который приравнивается к супер-суперэлите (первый год);

- размножение семенного материала и получение суперэлита (второй год);

- ежегодное проведение трех фитопрочисток в течение вегетационного периода картофеля с удалением больных растений и клубней;

- размножение семенного материала и получение элиты в условиях элитсемхозов (третий год).

В целом, схема ускоренной системы безвирусного семеноводства картофеля на биотехнологической основе выглядит следующим образом: **НИУ (оригинальные семена, супер-суперэлита, суперэлита) → элитсемхозы (элита) → семхозы (I,II,III репродукции) → товарные хозяйства и частный сектор**. Срок получения суперэлита сокращается с 5 до 2-х лет [7, с. 247].

Производство мини-клубней имеет ряд преимуществ по сравнению существующим способом микроклонального размножения пробирочных растений:

1. Из-за малого размера (20-25мм) и меньшей массы (15-25г) клубней норма расхода семян и транспортные расходы снижаются в 7-10 раз. Площади семенных участков в начальных этапах сокращаются в 1,5 - 2 раза (снижаются площади для семеноводства, расширяются площади для производства товарного картофеля). По оценкам, доля семенного материала в общем валовом объеме производства картофеля может сократиться с 30% (традиционная технология) до 7-10% за счет безвирусных мини-клубней (меньший расход семян) и повышения урожайности (большой объем сбора).

2. Расход мини-клубней на 1га составляет 50-60 тыс. шт., или 400-500кг, тогда как на 1га посевов картофеля при традиционной технологии требуется 3-4 тонн семенного материала.

3. При использовании мини-клубней повышается коэффициент размножения семенного материала в 7-10 раз, что позволяет полностью обеспечить потребность Республики Казахстан в элитном семенном материале картофеля.

4. Технология производства мини-клубней позволяет массово размножить и быстро внедрить в производство новые высокопродуктивные сорта картофеля казахстанской селекции (Астана, Ауыл, Альянс, Жанайсан, Жуалы, Карасайский, Когалы, Мирас, Нартау, Нэрли, Тамаша, Тохтар, Дуняша, Костанайские новости и др.). Из 60 сортов картофеля, районированного в Казахстане, 50% - отечественной селекции. Спрос на отечественные сорта увеличивается, однако низкий коэффициент размножения при традиционной технологии сдерживает размножение и внедрение новых сортов отечественной селекции.

Однако, без эффективных методов контроля вирусных инфекций, как на стадии получения пробирочных растений, так и при последующем размножении трудно гарантировать оздоровленность семенного материала. *Метод иммуноферментного анализа (ИФА)*. Тестирование растений проводят с помощью иммуноферментного анализа (тест ELISA (англ.) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Метод ИФА дает возможность определения антител (IgG, IgA, IgM) к возбудителям инфекции. Эти антитела вырабатываются организмом в ответ на инфицирование. Антитела выявляются при взаимодействии со специальными препаратами, содержащими соответствующие антигены, образующие с антителами прочный комплекс, который можно обнаружить разными способами. В основе метода лежит принцип взаимодействия иммуносорбента - антигена возбудителя инфекции с выявляемыми антителами. Однако выявление вируса в растениях традиционным методом ИФА не дают желаемого результата. Ранее были предприняты попытки использования антител к неструктурным белкам вируса с использованием метода western blot, но данный метод экономически неэффективен при большом количестве тестируемого материала [8, с. 275].

Метод полимеразно цепной реакции (ПЦР) в диагностике вирусных заболеваний. Среди методов диагностики инфекционных возбудителей ПЦР обладает наиболее высокими показателями чувствительности (за счет экспоненциального накопления фрагментов ДНК) и специфичности (за счет

выявления уникальных для микро- (макро-) организмов участков генетического материала). Скорость проведения анализа: время получения результатов, для некоторых инфекций меньше, чем 24 часа.

ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией - Reverse Transcription PCR, RT-PCR (англ.) — используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.

ОТ-ПЦР представляет собой метод амплификации специфического фрагмента рибонуклеиновой кислоты (РНК). Одноцепочную молекулу РНК превращают в реакции обратной транскрипции (ОТ, англ. RT, reverse transcription) в комплементарную ДНК (сДНК) и далее амплифицируют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя традиционную ПЦР. Для превращения последовательности РНК в комплементарную ДНК используют обратную транскриптазу. Экспоненциальная амплификация при помощи ОТ-ПЦР является чувствительной методикой, с помощью которой может быть обнаружено малое количество молекул РНК [9, с. 53].

Использование этого метода для диагностики вирусных заболеваний картофеля может существенно повысить надежность контроля, поскольку с помощью этого метода ведется непосредственный анализ генома вируса. При наличии большого количества разнообразных вирусов, поражающих культуру, это дает возможность установить наличие не просто вирусной инфекции, но и определить вид вируса, который обитает в изучаемых объектах.

Как видно из краткого обзора, в Казахстане имеется научнообоснованная система безвирусного семеноводства картофеля, внедрение которой позволит резко увеличить объемы его производства.

Литература:

1. Абдильдаев В.С. Семеноводство картофеля Казахстана на современном этапе развития биотехнологии. Сб. трудов НИИКОХ. Кайнар, 2003. - 165 с.
2. Амелюшкина Т.А., П.С. Семешкина. Журнал Защита и карантин растений. М.; 2011. № 3-С. 23 с.
3. Анисимов Б.В., Трофимец Л.М. Развитие безвирусного семеноводства картофеля// Селекция и семеноводство, -1990. № 4 - 49 с.
4. Байдин В.А., Чечуев Н.Ф. Оздоровление исходного материала картофеля от вирусной инфекции// Наука и опыт: прорыв в новое качество.- Алматы, 1991. - 140 с.
5. Абдильдаев В.С. Оптимизация технологий выращивания меристемных растений в полевых условиях//Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана, 2002 №2. - 24 с.
6. Абед Гера, Шломо Марко. Определение и идентификация вирусов картофеля// Вирусные вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля. КАР, Дордрехт, 2005. – 155 с.
7. Kawchuk L.M., Martin R.R., Macpherson J. Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leaf roll virus in Russet Burbank potato plants//Ibid, 1991.v.1.4. - 253 p.
8. Лебенштейн Г., Бергер Ф.Х., Брант А.А., Лоусон Р.Х. Вирусные и вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля. КАР, Дордрехт, 2005. - 275 с.
9. Федорова Н.Ю. Журнал Защита и карантин растений. М.; 2011. № 5. - 54 с.