

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Бабешко Я. А. Основні напрями інтенсифікації виробництва стевії в Україні / Я. А. Бабешко // Економіка та підприємство: Зб. наук. праць.-К.: КНЕУ, 2009.-в. 12.-С. 256–260.
2. Стефанюк В. Й. Стевія в Україні / В. Й. Стефанюк. К.: Труд-ГриПол, 2009.-128 с.
3. Організаційно-економічні нормативи витрат та інформаційно-статистичні матеріали з виробництва рослинницької продукції за біоадаптивними технологіями і методичні рекомендації / [М. В. Поїк, В. М. Сінченко, В. Й. Стефанюк та ін.]. — К.: ІБЦІБ НААН, 2014.-194 с.

АНОТАЦІЯ

УДК 633.66.631.54

СПОСОБИ ВИРОЩУВАННЯ СТЕВІЇ МЕДОВОЇ ТА ЇЇ ЕФЕКТИВНІСТЬ

Стефанюк В. Й., к. с.-г. наук

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

Мета — розробити постатейне витрати при вирощуванні стевії залежно від способів вирощування. **Методи** — лабораторний, польовий, розрахунково-порівняльний. **Результати** — наведені результати досліджень щодо впливу способів технології вирощування стевії на постатейні і загальні витрати, вро-

жайність зеленої маси і сухого листя. **Висновки** — в умовах України цілком можлива технологія вирощування стевії насінням. Це дозволить вирощувати і отримувати врожайність зеленої маси 18–20 т / га, сухого листя — 3,0–3,5 т / га.

Ключові слова: технологія вирощування in vitro, живцювання, насіння, нормативні витрати, собівартість, продуктивність.

ABSTRACT

UDC633.66.631.54

WAYS GROWN UP STEVIAS AND THEIR EFFICIENCY

Stefanyk V. I., edging. agricultural sciences

Institute of biopower spheres tour and NAAN sugar beet of Ukraine

The purpose — to develop itemized expenses at cultivation of a stevia depending on ways of cultivation. **Methods** — laboratory, field, settlement and comparative. **Results** — are given results of researches concerning influence of ways of technology of cultivation of a stevia on the itemized and total costs, productivity of green material and dry leaves. **Conclusions** — in the conditions of Ukraine the technology of cultivation of a stevia seeds is quite possible. To resolve it cultivation and to receive productivity of green material of 18–20 t/h, dry leaves — 3.0–3.5 t/h.

Keywords: Technology of cultivation: in vitro, grafting, seeds, standard costs, prime cost, productiveness

УДК 633.63:631.52:57.081

МЕТОД СТЕРИЛІЗАЦІЇ АГАРУ ТА ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В КУЛЬТУРІ IN VITRO

ГОНТАРЕНКО С.М. —

к. с.-г. наук, *

ГЕРАСИМЕНКО Г.М. —

науковий співробітник

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03110, Україна, *e-mail: sgontarenko44@gmail.com

Вступ. У біотехнології при приготуванні живильних середовищ їх стерилізацію проводять в автоклавах (вертикальних або горизонтальних) за допомогою пару, який подається в автоклав за надлишкового тиску. Завдяки пару в автоклаві можна досягти та підтримувати температуру, яка вище за 100° С (130–140° С).

Цей метод стерилізації, який широко застосовується як в дослідженнях в культурі in vitro, так і в промисловому виробництві для швидкого розмноження цінного посадкового матеріалу [1, 2, 3, 4, 5, 6], включає попередню стерилізацію агару в автоклаві під тиском 1 атм протягом 40 хвилин, додавання його в підігріте живильне середовище з макро-мікроелементами, вітамінами, гормонами, вуглеводами та іншими компонентами, стерилізацію живильних середовищ в автоклаві під тиском 1,3 атм протягом 40 хвилин [4]. Але цей метод не забезпечує максимального збереження біологічної цінності цукрів, вітамінів, регуляторів росту, амінокислот тому, що їх стерилізацію проводять в автоклавах протягом 40 хвилин під тиском за допомогою пару, температура якого

значно вища за 100°С (130–140°С). Термін стерилізації живильного середовища складає 1 годину 20 хвилин: 40 хвилин — стерилізація агару + 40 хвилин — стерилізація живильного середовища з макро-мікроелементами, вітамінами, гормонами, вуглеводами та іншими компонентами.

Відомо широке використання мікрохвильових печей для приготування їжі. Досвід застосування мікрохвильових печей в багатьох країнах світу в останні десятиріччя довів беззаперечно переваги цього способу приготування їжі — швидкість, економічність, простоту використання [7]. Механізм дії мікрохвиль забезпечує збереження молекулярної структури, вмісту та біологічної цінності органічних та мінеральних речовин, оскільки мікрохвилі діють тільки на молекули води, вони розігрівають субстрат тільки до температури кипіння. Мікрохвильове або надчастотне (НВЧ) випромінювання — це електромагнітні хвилі довжиною від одного міліметра до одного метра, які використовуються також в системах супутникового телебачення, сотової телефонії, радіолокації тощо [7, 8]. Частота мікрохвиль в побутових НВЧ печах, згідно міжнародних угод, складає 2450 МГц для того, щоб не ускладнювати роботу пристроїв, де використовуються мікрохвилі (радары). Довжина хвилі мікрохвильового випромінювання даної частоти дорівнює 12,25 см. Мікрохвилі взаємодіють з молекулами речовин, які мають дипольні молекули, тобто такими, на одному кінці яких є позитивний електричний заряд, а на іншому — негативний (наприклад, вода) [9, 10]. У відсутності поля молекули розміщені

хаотично. В електричному полі вони розташовуються за напрямом силових ліній поля «плюсом» в одну сторону, «мінусом» в іншу. При зміні напрямку поля на протилежний молекули перевертаються на 180°С. При частоті мікрохвиль 2450 МГц поле змінює полярність 4900000000 разів в секунду. Молекули перевертаються з великою частотою, труться між собою, тепло, що вивільняється, розігріває субстрат [10].

Мета досліджень: розробити метод стерилізації агару та живильних середовищ для розмноження та культивування in vitro рослинного матеріалу, що забезпечить отримання стерильних живильних середовищ в коротші строки (3–5 хвилин) без застосування автоклаву, з максимальним збереженням живильних властивостей середовища при швидкому нагріванні агару та середовищ до 100°С з використанням мікрохвильової печі (НВЧ-печі).

Методи. Досліди проводили в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків впродовж 2014–2017 років. В дослідженнях застосовували автоклави, мікрохвильову піч, агар, модифіковані живильні середовища, які використовували в дослідженнях з різним рослинним матеріалом: пиляками, калусами, ембріонами цукрових буряків, мікророслинами міскантусів, павлонії та інших біоенергетичних культур.

Термічну обробку агару та живильних середовищ проводили в автоклаві та в мікрохвильовій печі. В автоклаві агар стерилізували під тиском 1 атм протягом 40 хвилин, живильні середовища — 1,3 атм також протягом 40 хвилин. В мікро-

Вплив режимів стерилізації живильних середовищ на їх якість (інфікування, стерильність та щільність).

Таблиця 1.

Режими стерилізації: проміжок часу	Рівень мікрохвильової потужності, вт						
	500	750	900	750+500 +750	900+500 +900	750+750 +750	900+900 +900
1хв.	IC	IC	IC	-	-	-	-
2 хв.	IC	IC	C	-	-	-	-
3 хв.	C	C	СЩ	-	-	-	-
5 хв.	C Щ	C Щ	СЩ	-	-	-	-
1хв.+ 2 хв.	C	C	C	-	-	-	-
1хв.+ 1хв.+1хв.	-	-	-	C	C	C	СЩ
30 сек.+1хв.+30 сек.	-	-	-	IC	C	C	C
30 сек.+2хв.+30 сек.	-	-	-	C	C	C	СЩ
30 сек.+30 сек.+30 сек.	-	-	-	IC	IC	IC	C

IC — інфіковані живильні середовища, C — стерильні живильні середовища, СЩ— щільні живильні середовища.

хвильовій печі режими стерилізації включали: 1–5 хвилин при постійному режимі потужності та 1 хвилина + 2 хвилини; 30 секунд + 30 секунд + 30 секунд; 30 секунд + 1 хвилина + 30 секунд; 30 секунд + 2 хвилини + 30 секунд; 1 хвилина + 1 хвилина + 1 хвилина з рівнем потужності від 500 до 900 вт при пульсуючому режимі (таблиця 1).

1. Стерилізація агару.

Для приготування 1 літру живильного середовища наважку агару (6–8 г) заливали дистильованою водою ½ від об'єму середовища, ретельно розмішували, закривали накривками і транслювали в мікрохвильову піч, де витримували після закипання агару (появи перших бульбочок) протягом 2 хвилин при 900 вт, 3 хвилин при 500–750 вт при постійному режимі, або у пульсуючому режимі: 1) 30 секунд при 750–900 вт. + 1–2 хвилини при 500 вт + 30 секунд при 750–900 вт, 2) 30 секунд + 30 секунд +30 секунд при 750–900 вт.

2. Стерилізація живильних середовищ.

В підготовлене живильне середовище, що містить макро-мікроелементи, вітаміни, гормони, вуглеводи та інші необхідні компоненти додавали розчин агару.

Середовище розливали в колби об'ємом 100–250 см по 15–35 мл залежно від об'єму колби. Колби з накривками вставляли мікрохвильову піч, де витримували після закипання середовища (появи перших бульбочок) протягом 2–3 хвилин при 750–900 вт при постійному режимі, або 1 хвилина + 2 хвилини; 30 секунд + 30 секунд + 30 секунд; 30 секунд + 1 хвилина + 30 секунд; 30 секунд + 2 хвилини + 30 секунд; 1 хвилина + 1 хвилина + 1 хвилина з рівнем потужності від 500 до 900 вт при пульсуючому режимі.

В дослідженнях аналізували стан живильних середовищ після стерилізації — стерильність, інфікування, щільність.

Результати досліджень. В результаті наших чисельних експериментів, проведених з стерилізацією агару та живильних середовищ різного складу — модифіковані середовища Мурасіге–Скуга, Гамборга та ін. [2, 3, 5, 6, 11, 12], із застосуванням різних домішок (амінокислоти, регулятори росту, вітаміни, тощо) визначена можливість застосування мікрохвильових печей для стерилізації живильних середовищ та агару (рис. 1).

Результати досліджень, які наведені в таблиці 1, свідчать, що при стерилі-

зації живильних середовищ протягом до 2 хвилин включно з рівнем мікрохвильової потужності 500–750 вт спостерігається наявність інфекції середовищ, тоді, як за потужності 900 вт протягом 2 хвилин, живильні середовища залишаються стерильними.

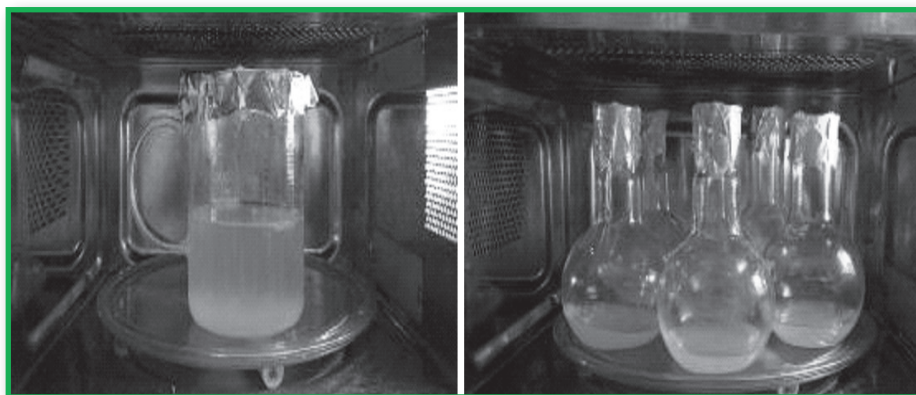
Ущільнення живильних середовищ внаслідок википання рідини відмічали при збільшенні часу стерилізації з 3 хвилин до 5 хвилин, а також при використанні мікрохвильової високої потужності — 900 вт при (стерилізація 3 хвилини), навіть у пульсуючому режимі. Найкращими були варіанти стерилізації живильних середовищ 2–3 хвилини при 750–900 вт, або у пульсуючому режимі: 1) 30 секунд при 750–900 вт + 1–2 хвилини при 500 вт +30 секунд при 750–900 вт, 2) 30 секунд + 30 секунд+30 секунд при 900 вт. Пульсуючий режим стерилізації був застосований для запобігання їх википання та підвищення щільності живильного середовища внаслідок випаровування рідини. Але зменшення сумарного часу на стерилізацію до 1,5 хвилини (30+30+30) секунд з рівнем мікрохвильової потужності 500–750 вт не дало позитивного результату. Інфекції не спостерігалось при такому режимі стерилізації тільки при 900 вт рівня мікрохвильової потужності. Пульсуючий режим стерилізації також показав найкращі результати і для стерилізації агару.

Згідно даним, що наведені в таблиці 2, стерилізація живильних середовищ з використанням автоклавів (відомий метод) відбувається завдяки нагрітому до 130–140°C пари під тиском 1,3 атм, тоді, як у розробленому нами методі стерилізація відбувається завдяки дії мікрохвиль, які розігрівують внутрішню рідину тільки до 100°C.

Проміжок часу, що необхідний для стерилізації, за розробленим методом, з використанням НВЧ печі складає 2–3 хвилини — в 13–20 разів менший, ніж у відомому методі, з використанням автоклаву, що значно зменшує загальні витрати на стерилізацію агару та живильних середовищ. Метод стерилізації агару та живильних середовищ з використанням НВЧ надає значні переваги при проведенні біотехнологічних робіт, особливо при розмноженні, пасивуванні рослинного матеріалу in vitro, коли є необхідність приготувати малі партії живильних середовищ різних за складом компонентів в короткі строки.

Оформлено патент на корисну модель [13]. За цим методом було виготовлено більш 30 різних за складом живильних середовищ для мікроклонального розмноження міскантусу, павловнії, отримання морфогенних калусів та ембріодів цукрових буряків (рис. 2) за методом андрогенезу in vitro [14,15].

Впровадження запропонованого методу стерилізації живильних середовищ забезпечує стерильність та збереження біологічної цінності органічних та мінеральних речовин та економічність про-



а)

б)

Рис. 1. Стерилізація в мікрохвильовій печі агару (а) та живильних середовищ (б).

Таблиця 2.

Характеристика методів стерилізації агару та живильних середовищ

Методи стерилізації живильних середовищ	Прилад, що використовується для стерилізації	Стерилізуючий агент	Температура стерилізації	Проміжок часу, необхідний для стерилізації
Відомий метод	автоклав	пара	130–140° С.	40 хвилин під тиском 1,3 атм
Розроблений метод	НВЧ піч	мікрохвилі та розігріта рідина	100° С.	2-3 хвилини після закипання

цесу, зокрема енергетичну, за рахунок приготування живильних середовищ в короткі терміни.

Висновки. Розроблено метод стерилізації живильних середовищ для розмноження та культивування *in vitro* різних видів рослинного матеріалу за допомогою його термічної обробки з використанням мікрохвильової печі, де проводять як попередню стерилізацію агару, так і агаризованого живильного середовища в ємностях, які після закипання (появи перших бульбочок) витримують протягом 2–3 хвилин при 750–900 Вт в постійному, або у пульсуючому режимі: 1) 30 секунд при 750–900 Вт + 1–2 хвилини при 500 Вт + 30 секунд при 750–900 Вт, 2) 30 секунд + 30 секунд + 30 секунд при 900 Вт.

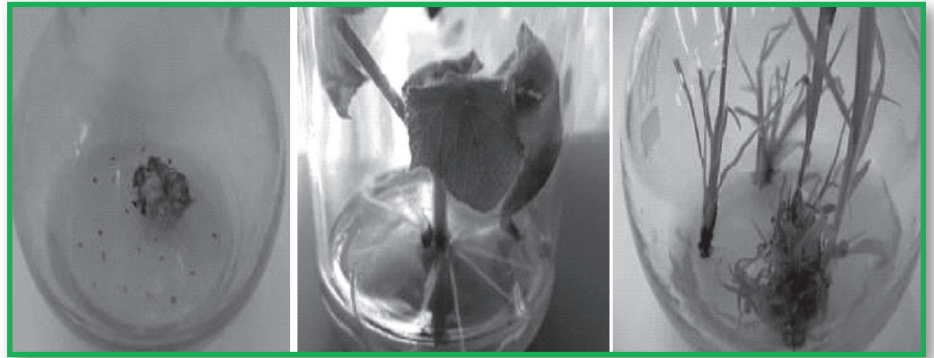


Рис. 2. Культивування рослинного матеріалу на живильних середовищах, виготовлених в НВЧ: андрогенний калус цукрових буряків (а), павловнія (б), міскантус (в).

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-пресс, 1999. — 160 с.
2. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. К.: Наук. думка, 2005. — 271 с.
3. Кильчевский А. В., Хотылева Л. В. Биотехнология и селекция растений. Клеточная инженерия. Минск: Беларус. Навука, 2012. — 489 с.
4. Буряки цукрові. Методи отримання розсади клональним мікророзмноженням: ДСТУ 6055:2008. Дата введення в дію: 01.01.2010.
5. Robert N. Trigiano, Dennis J. Gray Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. CRS Press. 2016. — 608 p.
6. Bishun Deo Prasad, Sangita Sahni, Prasant Kumar, Mohammed Wasim Siddiqui: Plant Biotechnology: Principles, Techniques, and Applications. CRC Press. 2017. 562 p.
7. Молодцова М. А., Севастьянова Ю. В. Возможности и перспективы использования микроволнового излучения в промышленности. Лесной журнал. 2017. № 2. — С. 173–187. DOI: 10.17238/issn05361036.2017.2.173
8. Полищук Т. С., Череватюк Г. В., Патрушева О. В. Использование микроволнового излучения в нефтехимии. Молодой ученый. 2017. № 2.1. С. 23–27. URL <https://moluch.ru/archive/136/39059>
9. Никифоров В. Н., Иваннова Е. К. Иванов А. В., Тамаров К. П., Оксенгендер Б. Л. О возможном механизме воздействия микроволнового излучения на биологические макромолекулы. Медицинская физика. 2014. № 4. — С. 46–49.
10. Кубракова И. В. Микроволновое излучение в аналитической химии: возможности и перспективы использования. Успехи химии. 2002. Том 71. № 4. С. 327–240.
11. Murashige T., Skoog F. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 1962. P. 473–497.
12. Gamborg O.L., Constable F., Shiluk J. P. Organogenesis in callus form shoot apices of *Pisum Sativum*. *Physiol. Plant.* 1974. № 30. P. 125–128.
13. Гонтаренко С. М., Герасименко Г. М. Патент на корисну модель № 106914, Україна, МПК А01Н 4/00, Спосіб приготування живильних середовищ заявник і патентовласник ІБКЦБ; заявл. 20.11.2015; опубл. 10.05.2016, Бюл. № 9.
14. Гонтаренко С. М. Лашук С. О. Отримання рослин *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack та *Miscanthus sinensis* Andersson у культурі *in vitro* шляхом непрямого морфогенезу. Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2017. Т. 13, № 3. — С. 230–235.
15. Гонтаренко С. М., Герасименко Г. М. Метод підвищення ефективності індукції експериментального андрогенезу цукрових буряків в умовах *in vitro*. Селекція і насінництво. 2018. № 114. — С. 98–105.

АНОТАЦІЯ

Метод стерилізації агару та живильних середовищ для біотехнологічних досліджень в культурі *in vitro*

С. М. Гонтаренко — к. с.-г. наук, *

Г. М. Герасименко — науковий співробітник

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінична, 25, м. Київ, 03110, Україна, *e-mail: sgontarenko44@gmail.com

Мета. Розробити метод стерилізації агару та живильних середовищ для розмноження та культивування *in vitro* рослинного матеріалу з використанням мікрохвильової печі (НВЧ-печі). **Методи.** Лабораторні, біотехнологічні, фізіологічні, аналітичні. **Результати.** В дослідженнях визначена можливість застосування мікрохвильової печі для стерилізації живильних середовищ та агару. Проаналізовано вплив умов стерилізації в мікрохвильовій печі (термін, режим та потужність мікрохвильового

випромінювання) на якість живильних середовищ — стерильність, щільність, інфікування. Встановлено оптимальні умови стерилізації в мікрохвильовій печі: в постійному режимі 2–3 хвилини після закипання рідини (температура біля 100° С) при 750–900 Вт; у пульсуючому — 30 секунд при 750–900 Вт + 1–2 хвилини при 500 Вт + 30 секунд при 750–900 Вт або 30 секунд + 30 секунд + 30 секунд при 900 Вт, які забезпечують отримання стерильних якісних середовищ в короткі терміни. Тоді як в автоклавах стерилізацію агару та живильних середовищ проводять за температури, яка вища за 100° С (130–140° С) протягом 120 хвилин, що не забезпечує збереження біологічної цінності цукрів, вітамінів, регуляторів росту, амінокислот. За розробленим методом стерилізації було виготовлено більш 30 різних за складом живильних середовищ для мікроклонального розмноження міскантусу, отримання морфогенних калусів та ембріодів цукрових буряків за методом андрогенезу *in vitro*. **Висновки.** Розроблено метод стерилізації живильних середовищ для розмноження та культивування *in vitro* рослинного матеріалу за допомогою їх термічної обробки з використанням мікрохвильової печі, який дозволяє приготування живильних середовищ в значно коротші терміни (2–3 хвилини), ніж при застосуванні автоклаву (120 хвилин) і забезпечує стерильність та збереження біологічної цінності органічних та мінеральних речовин та економічність процесу.

Ключові слова. Агар, живильні середовища, мікрохвильові печі, рослинний матеріал, стерилізація, *in vitro*

ABSTRACT

UDK 633.63:631.52:57.081

The method of sterilization of agar and nutrient media for biotechnological research in culture *in vitro*

Svitlana Gontarenko <http://orcid.org/0000-0003-0472-720X>

Ganna Gerasymenko <http://orcid.org/0000-0003-4338-7295>

Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet, 25, Klinichna str., Kyiv, Ukraine

Purpose. To develop a method of sterilization of agar and nutrient media for the propagation and cultivation of *in vitro* plant material using a microwave oven. **Methods.** Laboratory, biotechnological, physiological, analytical. **Results.** The research has identified the possibility of using a microwave oven to sterilize nutrient media and agar. The influence of sterilization conditions in a microwave oven (terms, mode and power of microwave radiation) on the quality of nutrient media — sterility, density, infection was analyzed. The optimal conditions of sterilization in a microwave oven was established: in a continuous mode 2–3 minutes after boiling of a liquid (temperature about 100° C) at 750–900 W; in a throbbing 30 seconds at 750–900 W + 1–2 minutes at 500 W + 30 seconds at 750–900 W or 30 seconds + 30 seconds + 30 seconds at 900 W, which ensure the production of sterile qualitative media in a short time. While in autoclaves, agar and nutrient media was sterilized at temperatures above 100° C (130–140° C) for 120 minutes, which does not ensure the preservation of the biological value of sugars, vitamins, growth regulators, amino acids. According to the developed method of sterilization, more than 30 different compositional nutrient media were produced for microclonal propagation of miscanthus, obtaining morphogenic callus and embryos of sugar beet by the method of androgenesis. *in vitro*. **Conclusions.** The method of sterilization of nutrient media for the propagation and cultivation of *in vitro* plant material by thermal treatment using a microwave oven allows the preparation of nutrient media in much shorter terms (2–3 minutes) than when using an autoclave (120 minutes) and provides sterility and the preservation of the biological value of organic and mineral substances and the cost-effectiveness of the process.

Keywords. Agar, nutrient media, microwave ovens, plant material, sterilization, *in vitro*.