





УДК 633.66:632.4

Отримання толерантного до альтернаріозу матеріалу стевії в культурі *in vitro*

 В. І. Войтовська¹,  А. В. Заболотна²,  Т. В. Поліщук²,  О. О. Коробко³

¹Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03110, Україна, e-mail: vvojtovska6@gmail.com

²Уманський державний педагогічний університет ім. Павла Тичини, вул. Садова, 2, м. Умань, Черкаська обл., 20300, Україна

³Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького, б-р Шевченка, 81, м. Черкаси, 18031, Україна

Мета. Отримати вихідний матеріал стевії, толерантний до альтернаріозу, в культурі *in vitro*. **Методи.** Пагони різних сортів ('Берегиня', 'Славутич', 'Галина') та ліній (№ 3, № 11, № 14, № 16) стевії висаджували на живильне середовище Murasige – Скуга з модифікаціями, додаючи фільтрат культуральної рідини (ФКР) *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler у концентраціях від 10 до 100 %. Контрольним варіантом був сорт 'Берегиня'. Культивування проводили за температури 24 ± 2 °C та фотоперіоді 16/8 год. Життєздатність та біометричні показники пагонів визначали на 3-тю та 7-му добу. **Результати.** Концентрація 100 % ФКР призвела до повної загибелі пагонів усіх сортів і ліній. За концентрації 10 % вплив на життєздатність був незначним; більшість пагонів залишалася у доброму стані без змін у біометричних показниках. Концентрації 15 і 20 % забезпечили високу життєздатність (72–95 %) в усіх матеріалів, найкращі показники демонстрували сорти 'Берегиня' та 'Славутич'. За концентрації 25 % життєздатність знизилася до 70–91 %, а при 30 % – до 68–90 %. Концентрації 35–45 % знижували життєздатність пагонів до 20–63 % і 20–47 % відповідно, причому сорт 'Галина' мав найнижчі показники. Некротичні зміни були помічені за концентрацій 25–45 %, причому кількість некротичних пагонів зростала з підвищенням концентрації. Концентрації 15–20 % не викликали некротичних змін у сортах 'Берегиня' та 'Славутич', натомість у сорту 'Галина' і лініях кількість некротичних пагонів залишалася на низькому рівні. **Висновки.** Додавання ФКР у середовище в концентраціях до 20 % не впливало критично на життєздатність пагонів, їх пагоноутворювальну здатність та біометричні показники. Збільшення концентрації понад 20 % призводить до зниження життєздатності пагонів та збільшення кількості некротичних рослин. Сорти 'Берегиня' та 'Славутич' демонстрували найбільшу стійкість, тоді як сорт 'Галина' виявився найчутливішим, порівняно навіть із досить нестійкими лініями стевії.

Ключові слова: *Stevia rebaudiana*; сорти; лінії; фільтрат культуральної рідини (ФКР); концентрації; пагоноутворення; життєздатність пагонів; біометричні показники.

Вступ

Альтернаріоз, збудниками якого є гриби з роду *Alternaria*, є однією з найпоширеніших хвороб, що уражає різні культури, включно зі стевією (*Stevia rebaudiana*). Це захворювання негативно впливає на розвиток сільськогосподарських рослин, знижуючи їхню врожайність та якість продукції [1, 2]. Сучасні методи контролювання альтернаріозу часто включають використання хімічних фунгіцидів, однак їх застосування має обмеження через потенційні негативні екологічні наслідки та резистентність патогенів. У цьому контексті розроблення стійких сортів рослин, здатних протистояти інфекціям, є важливим завданням для забезпечення стабільного виробництва [3, 4].

Стевія, відома своєю високою біоактивністю та використанням як натурального підсолоджувача, є перспективною культурою для агропромислового виробництва в умовах України. Однак для забезпечення її ефективного вирощування необхідно подолати низку агрономічних і біотехнологічних проблем, зокрема, підвищену чутливість до хвороб [5]. Використання культури

in vitro для отримання толерантних форм стевії є ефективним підходом, оскільки дає змогу швидко оцінювати та відбирати рослини, які мають підвищену стійкість проти патогенів. Тому дослідження, спрямовані на отримання вихідного матеріалу, толерантного до альтернаріозу стевії, сьогодні є актуальними [6, 7].

У роботі Р. В. Ковбасенка та О. П. Дмитрієва досліджено вплив збудника у культурі за вирощування пасльонових *in vitro* та *in vivo*. Їхні дослідження базувалися на використанні штучних умов, де до живильного середовища Мурасіге – Скуга додавали замість фітогормонів аква *N*-оксі-2-метилпіридин(II) хлорид або замінювали макро- й мікроелементи наночастками цих елементів. Вказується, що це сприяло росту й розвитку калюсів у томатів, які проявляли стійкість у польових умовах до альтернаріозу й фітофторозу [8].

Дослідження *Alternaria solani* показали, що колонії грибів інтенсивно проростають у середовищі V8 при 25 °C у темряві через 7 днів. На картопляно-декстрозному агарі (рН 6,5), інкубованому при 25 ± 2 °C в умовах ультрафіолетового світла та 12-годинного фотоперіоду, зростання грибів також є активним. Відмічено, що вони можуть довготривало зберігатися на різних господарях і в різних умовах [9].

Цінні дослідження проведено на чебреці, шавлії, мускатному горісі, евкалипті та касії у культурі *in vitro* за концентрацій фільтрату від 100–500 ppm. Виявлено, що олії цих рослин мають протигрибну дію проти *A. alternata*. Найбільшу активність проявила олія касії, найменшу – чебрецю [10].

Alternaria spp. досліджували на хрестоцвітих за концентрації 30–60 %, що пригнічувала ріст міцелію на 50 % (ЕС 50). У культурі толерантні форми отримано при ЕС 50 > 100 мг/л, які в польових умовах виявили високу стійкість проти хвороби [11].

Аналіз літературних джерел вказує, що для різних культур концентрація добиралася залежно від ступеня ураженості рослин. Зокрема, в дослідженнях з *Alternaria species* використовували концентрації 0,5–80 мг/л і відмічали отримання стійких форм при 33 мг/л. В інших дослідках *Alternaria alternata* вводили у концентраціях 10–100 %, а найкращі результати отримано при 50 % розчині [12, 13].

Вплив ізолятів *Alternaria brassicicola* та *A. brassicae* на хрестоцвіті показав, що ріст міцелію не відбувався за концентрації до 45 %, але збільшувався за концентрації 75 %. Оптимальні концентрації забезпечили отримання 30–60 % вихідного матеріалу [14].

Істотну протигрибну дію виявлено у штучних умовах на *Laurus nobilis* проти *Alternaria alternata*. Як стресовий фактор вводили витяжки в *in vitro* та *in vivo*, досліджуючи біометричні показники. За концентрації 80 мкг/мл *L. nobilis* повністю пригнічувався ріст *A. alternata*, а також конідіальне проростання. Досліди *in vivo* показали, що концентрація 50,0 мкг/мл *L. nobilis* зберігала помідори черрі (*Lycopersicon esculentum*) від інфекції *A. alternata* з коефіцієнтом інгібування 33,9 % [15].

Досліди на різних видах гірчиці (*Brassica campestris*, *B. juncea* і *B. napus*) до *Alternaria brassicae* і *A. brassicicola* вказують, що застосування манкоцебу (75 % WP), саліцилової кислоти (73,33 %), *Allium sativum* (54,44 %) та *Zingiber officinale* (17,78 %) ефективно пригнічувало патоген. У польових умовах толерантні форми найкраще проявили себе проти альтернаріозу в разі використання розчину з гриба [16].

Alternaria alternata спричиняє морфологічні та фізіологічні зміни у різних культурах. У польових умовах застосовуються різні фунгіциди: тірам, каптан, оксихлорид міді, манкоцеб, хлороталоніл, карбендазим, гексаконазол, пропіконазол, комбіновані препарати (карбендазим + манкоцеб, каптан + гексаконазол) та азоксистробін із нормою внесення 500 ppm. Проте збудник демонструє адаптацію до цих засобів, що знижує їхню ефективність. Тому створення толерантних форм до альтернаріозу є важливим завданням, що дозволить зменшити токсичний вплив на навколишнє середовище [17–19].

Мета досліджень – отримати вихідний матеріал стевії, толерантний до альтернаріозу, в культурі *in vitro*.

Матеріали та методика досліджень

Дослідження проводили в лабораторії біотехнології Інституту біоенергетичних культурі цукрових буряків НААН.

Пагони різних сортів – ‘Берегиня’, ‘Славутич’, ‘Галина’ і ліній № 3, № 11, № 14, № 16 – були висаджені на живильне середовище за прописом Мурасіге – Скуга з модифікаціями. Як контрольний

варіант було обрано сорт 'Берегиня', який характеризується стійкістю проти хвороб та має високий вміст цінних біохімічних складників.

Сорти 'Берегиня', 'Славутич', 'Галина' і лінії № 3, № 11, № 14, № 16 створені в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН. Сорти 'Берегиня' і 'Славутич' занесені до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення на території України у 1999 році й рекомендовані для вирощування в усіх зонах країни. Створені методом індивідуального добору. Кущ – 45–60 см і 45–50 см; висота – 60–65 см і 60 см; листя: довжина – 5,5–6,0 см і 4,5–5,0 см, ширина – 3,5–4,0 см. Суцвіття – кошики, зібрані в щиток. Вегетаційний період – 180 і 175 діб. Високий ступінь облистяності. Вміст детерпенових глікозидів – 5,5–6,5 %, у 'Славутич' – до 7,5 %; збір цукру – 450 ц/га.

Сорт 'Галина' зареєстрований у 2017 році. Вегетаційний період – 110 діб. Висота рослини – 80 см, кущ – 65 см, листя: довжина – 6,2 см, ширина – 4,3 см. Уміст детерпенових глікозидів – 6,5 %, стевіозиду – 21 %.

Лінії № 3, № 11, № 14, № 16 мають вегетаційний період 180 діб. Висота рослин – 75 см, кущ – 60 см. Листя: довжина – 6,0 см, ширина – 4,0 см. Вміст детерпенових глікозидів – 4,3–7,0 %, стевіозиду – 17–20 %.

Для отримання толерантних форм стевії додатково вводили фільтрат культуральної рідини (ФКР) гриба *Altemaria alternata* (Fr.) Keissler, який додавали до середовища у концентраціях від 10 до 100 %.

У чашках Петрі розмножували патоген у трьох пасажах. До них додавали 5 мл автоклавованої води й змивали конідії з поверхні середовища. Її потім фільтрували й додавали до живильного середовища за прописом Чапека та інкубували 21 добу за температури +26 °С. Потім фільтрат вводили в живильне середовище в різних концентраціях.

Культивування проводили за температурного режиму 24 ± 2 °С й фотоперіоду 16/8 год.

Пагони, які були толерантними, пересаджували на живильне середовище МС і розмножували [20–13].

Під час досліджень визначали біометричні показники, життєздатність, пагоноутворення залежно від досліджуваних факторів у культурі *in vitro* [24].

Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних проводили за допомогою пакета Statistica-6 відповідно до методичних вказівок [25].

Результати досліджень

Ґрунтуючись на літературних даних, у середовище вводили концентрації ФКР від 10 до 100 %. Установлено, концентрація 100 % спричинила повну загибель пагонів усіх досліджуваних сортів і ліній стевії, тому використовувати її недоцільно.

Аналізуючи отримані результати, нами було досліджено вплив концентрацій ФКР на життєздатність пагонів стевії від 10 до 45 % і проведено аналіз на 4-ту добу культивування.

Експериментально встановлено, що концентрація 10 % істотно впливу на життєздатність не мала, і за її введення у середовище майже всі пагони перебували у гарному стані. Окрім того, не було виявлено змін у біометричних показниках та ознак некротичності.

Дослідження впливу 15 і 20 % ФКР показало, що пагони мали високий відсоток життєздатності (від 72 до 95).

За цих концентрацій сорти 'Берегиня' і 'Славутич' мали 95 і 92 % та 92 і 90 % життєздатних пагонів відповідно, а лінії: № 3 – 93 і 90 %, № 11 – 92 і 90 %, № 14 – 95 і 93 %, № 16 – 88 і 86 %. Сорт 'Галина', як за високих, так і за низьких концентрацій, мав низькі показники життєздатності порівняно з усіма досліджуваними зразками – 80 і 72 %.

Збільшення вмісту ФКР у середовищі створювало зворотну реакцію та сприяло зменшенню життєздатності пагонів стевії всіх матеріалів. Зокрема, за концентрації 25 % життєздатність знизилася до 70–91 %. Сорт 'Славутич' і лінії № 3 і № 14 мали цей показник на рівні 90 %, № 11 – 87 %, № 16 – 83 %, а найнижчий рівень життєздатності відзначено в сорту 'Галина' – 70 %.

Високий відсоток життєздатних пагонів стевії було отримано за концентрації 30 % (від 68 до 90). Як і в попередніх варіантах, найнижчі показники були у сорту 'Галина' – 68 %, а найвищі у сортів 'Берегиня' і 'Славутич' – 90 %. Лінії мали такі показники: № 3 – 88 %, № 11 – 85 %, № 14 – 83 %, № 16 – 80 %.

Збільшення концентрації до 35 % не було критичним і забезпечило високий відсоток життєздатних пагонів стевії (від 66 до 89). У досліджуваних матеріалів отримано такі показники: сорти 'Берегиня' і 'Славутич' – 89 і 87 %, лінії № 3 – 85, № 11 – 83, № 14 – 80, № 16 – 78 %, а найнижчий показник мав сорт 'Галина' – 66 %.

Більш згубними були концентрації ФКР 40 і 45 %. За першої концентрації було визначено 31–63 % життєздатних пагонів, а за другої – 20–47 %. Найменше значення встановлено у сорту 'Галина' – 31 і 20 %, а найбільше у 'Берегиня' – 63 і 47 %, далі у лінії № 3 – 62 і 38 %, сорту 'Славутич' – 60 і 38 %, лінії № 14 – 57 і 39 %, № 11 – 54 і 35 %, № 16 – 48 і 31 % (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив концентрації ФКР на життєздатність пагонів стевії, %

Матеріал	Концентрація ФКР, %										
	15	20	25	30	35	40	45	50	70	90	100
'Берегиня' (κ)	95	93	91	90	89	63	47	36	27	21	17
'Славутич'	92	90	90	90	87	60	45	32	20	16	10
'Галина'	80	72	70	68	66	31	20	12	9	8	–
№ 3	93	90	90	88	85	62	38	28	19	17	16
№ 11	92	90	87	85	83	54	35	25	16	15	10
№ 14	95	93	90	83	80	57	39	31	15	12	8
№ 16	88	86	83	80	78	48	31	24	13	10	6
НІР _{0,05}	0,7	0,5	0,4	0,8	0,5	0,6	0,7	0,5	0,4	0,9	0,4

На 7-му добу культивування кількість життєздатних пагонів за концентрації більше ніж 50 % була незначною, і можна відзначити їх загибель. Дослідження концентрації 70 % дозволило отримати від 9 до 27 % життєздатних пагонів. Сорт 'Берегиня (κ)' за цим показником переважав усі й мав 27 %, 'Славутич' – 20 %, а найменше з усіх варіантів відмічено у сорту 'Галина' – 9 %. Лінії стевії не переважали контроль, але мали вищі показники, ніж сорт 'Галина'. Зокрема, № 3 – 19 %, № 11 – 16 %, № 14 – 52 %, № 16 – 13 %.

Концентрація 50 % також негативно впливала на життєздатність пагонів стевії. У сортів було отримано від 12 до 36 %, а у ліній – від 24 до 31 % (табл. 1).

Дослідженнями було вивчено не лише життєздатні пагони, а й некротичні за низьких концентрацій ФКР і тривалості культивування. Доцільно вказати, що некротичні пагони утворюються за різкого впливу токсичних речовин, які всмоктуються із живильного середовища, та вказують на те, що з рослинами відбуваються негативні, а часто й незворотні процеси (загибель). Досліджуючи зовнішній стан рослин у культурі *in vitro*, відразу помітно їхній стан і можна визначити вплив тієї чи іншої досліджуваної речовини.

Зокрема, за концентрації 15 % на 3-тю добу культивування не було відмічено некротичних пагонів, а за 20 % – лише 4 і 2 % у сорту 'Галина' і лінії № 16 відповідно. Використання 25 % у живильному середовищі вказує, що кількість некротичних пагонів варіювала від 5 до 10 %, а за 30 % – від 8 до 18 %. Введення в середовище 35 % ФКР збільшило кількість некротичних пагонів до 8–18 %. Зі збільшенням концентрації до 40 і 45 % показники зростали до 17–37 %.

За культивування пагонів на 7-му добу було відмічено зростання кількості некротичних пагонів, але ті, що були на 3-тю добу, уже на досліджувану дату мали пригнічений вигляд та інтенсивніше жовте забарвлення (табл. 3). Концентрації 15 і 20 % у сортів 'Берегиня' і 'Славутич' не спричинили некротичних пагонів; сорт 'Галина' – 12 і 15 %, лінії: № 3 – 5 і 6 %, № 11 – 8 і 10 %, № 14 – 10 і 12 %, № 16 – 10 і 15 %. Збільшення концентрації до 25 і 30 % вказує, що кількість некротичних пагонів зросла від 8 до 24 %. Концентрація 35 % дала такі результати: 'Берегиня' і 'Славутич' – 16 і 14 % відповідно, 'Галина' – 29 %, № 3 – 18 %, № 11 – 20 %, № 14 – 25 %, № 16 – 28 %.

Найкритичнішими були живильні середовища зі вмістом 40 і 45 % ФКР, на яких кількість некротичних пагонів становила від 25 до 39 % (табл. 2).

Дослідження вказують, що ФКР та тривалість культивування впливали на висоту пагонів стевії. Зокрема, на 7-му добу за високих концентрацій – 35–45 % вона була від 3 до 10 см. У варіантах з меншими концентраціями – 15 і 20 % висота пагонів збільшувалася: у сортів 'Берегиня' і 'Славутич' – 12 і 10 см та 10 см, сорт 'Галина' – 8 і 5 см, у ліній: № 3 – 14 і 12 см, № 11 – 12 і 10 см, № 14 – 13 і 11 см, № 16 – 10 см. За концентрацій 25 і 30 % було визначено висоту від 3 до 12 см відповідно.

Таблиця 2

Некротичні пагони стевії за низьких концентрацій ФКР і тривалості культивування, %

Матеріал	Концентрація ФКР, %						
	15	20	25	30	35	40	45
3 доба							
‘Берегиня’ (к)	–	–	5	8	10	21	25
‘Славутич’	–	–	5	5	8	25	31
‘Галина’	–	4	10	15	18	28	37
№ 3	–	–	6	10	14	18	27
№ 11	–	–	5	8	12	17	29
№ 14	–	–	8	12	15	20	25
№ 16	–	2	8	12	15	23	20
НІР _{0,05}	–	0,2	0,3	0,4	0,6	0,5	0,7
7 доба							
‘Берегиня’ (к)	–	–	8	13	16	25	33
‘Славутич’	–	–	7	10	14	28	37
‘Галина’	12	15	18	24	29	36	48
№ 3	5	6	8	15	18	26	29
№ 11	8	10	10	15	20	28	31
№ 14	10	12	16	22	25	29	36
№ 16	10	15	17	20	28	31	39
НІР _{0,05}	0,6	0,8	0,7	0,5	0,8	0,5	0,7

У разі збільшення тривалості культивування до 14-ти діб рослини за концентрацій 35–45 % мали висоту від 5 до 12 см. Із зменшенням концентрації висота пагонів збільшувалася до 19 см (табл. 3).

Таблиця 3

Висота пагонів стевії залежно від концентрації ФКР і тривалості культивування, см

Матеріал	Концентрація ФКР, %						
	15	20	25	30	35	40	45
3 доба							
‘Берегиня’ (к)	12	10	10	8	7	5	5
‘Славутич’	10	10	10	8	8	5	5
‘Галина’	8	5	5	3	3	3	3
№ 3	14	12	12	10	10	8	6
№ 11	12	10	10	8	8	6	5
№ 14	13	11	9	7	7	5	5
№ 16	10	10	8	8	6	4	3
НІР _{0,05}	0,3	0,2	0,4	0,2	0,5	0,3	0,2
7 доба							
‘Берегиня’ (к)	17	15	14	12	10	8	8
‘Славутич’	15	15	13	13	10	10	7
‘Галина’	12	12	10	10	8	8	6
№ 3	19	16	15	12	12	10	8
№ 11	15	13	11	9	9	7	5
№ 14	18	16	14	12	10	8	6
№ 16	14	12	10	10	8	6	5
НІР _{0,05}	0,6	0,3	0,4	0,3	0,7	0,2	0,4

Одним із важливих показників є пагоноутворення. Залежно від досліджуваних факторів його не було відмічено на всіх варіантах за концентрації ФКР 40 і 45 % на 7-му добу та на 14-ту добу за 45 %. Концентрація 40 % на 14-ту добу дозволила отримати по 2 шт. пагонів у сорту ‘Берегиня’ (к) і ‘Славутич’ та по 1 шт. у лінії. У сорту ‘Галина’ й лінії № 16 пагонів не сформувалось узагалі.

Установлено, що на 7-му добу культивування пагонів за концентрації 15 і 20 % було по 2 шт. у сортів ‘Берегиня’ і ‘Славутич’ та по 1 шт. у ліній (лише у лінії № 3 – 2 шт.). Вплив ФКР із концентраціями 25 і 30 % істотно на пагоноутворення не був виражений, і кількість пагонів становила 1 шт. в усіх досліджуваних варіантах, а у лінії № 16 і сорту ‘Галина’ їх не виявлено взагалі (табл. 4).

Пагоноутворення стевії залежно від концентрації ФКР і тривалості культивування, шт.

Матеріал	Концентрація, %						
	15	20	25	30	35	40	45
	7 доба						
‘Берегиня’ (к)	2	2	2	1	1	-	-
‘Славутич’	2	2	1	1	1	-	-
‘Галина’	-	-	-	-	-	-	-
№ 3	2	1	1	1	1	-	-
№ 11	1	1	1	-	-	-	-
№ 14	1	1	1	1	1	-	-
№ 16	-	-	-	-	-	-	-
НР _{0,05}	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
‘Берегиня’ (к)	13	11	10	10	5	2	-
‘Славутич’	12	12	10	8	2	2	-
‘Галина’	8	7	5	4	1	-	-
№ 3	10	10	8	8	6	1	-
№ 11	12	10	10	7	4	1	-
№ 14	11	8	6	4	2	1	-
№ 16	10	10	8	5	3	-	-
НР _{0,05}	0,7	0,5	0,3	0,4	0,2	0,1	-

Культивування на 14-ту добу за 15 і 20 % ФКР дало змогу отримати такі результати: ‘Берегиня’ і ‘Славутич’ – 13 і 11 шт. та 12 шт.; ‘Галина’ – 8 і 7 шт.; № 3 – 10 шт.; № 11 – 12 і 10 шт.; № 14 – 11 і 8 шт.; № 16 – 10 шт. Зменшення кількості пагонів відмічено за вмісту 25 і 30 % ФКР – від 4 до 10 шт. Доцільно відмітити сорт ‘Галина’, у якого кількість пагонів становила 5 і 4 шт., та лінію № 16 – 5 і 8 шт., а найвищі показники – у сорту ‘Берегиня’ – 10 шт. Кількість пагонів варіювала за концентрації 35 % від 1 до 6 шт. відповідно (табл. 5).

Усі пагони стевії, які були толерантні до ФКР гриба, були відібрані, розмножені, укорінені й випробувані у польових умовах.

Висновки

Концентрації від 90 до 100 % ФКР істотно впливали на всі показники досліджуваних матеріалів стевії та спричиняли їхню загибель.

Згубними були концентрації ФКР 40 і 50 %: за першої було від 31 до 63 % пагонів, а за другої – від 12 до 36 % у сортів і від 24 до 31 % у ліній.

За тривалого культивування пагонів на 7-му добу спостерігалось збільшення кількості некротичних пагонів. Збільшення тривалості культивування до 14-ї доби за концентрацій 35–45 % ФКР призводило до формування пагонів заввишки від 5 до 12 см, а зі зменшенням концентрації висота пагонів збільшувалась до 19 см.

Використана література

1. Fernandes C., Casadevall A., Gonçalves T. Mechanisms of *Alternaria* pathogenesis in animals and plants. *FEMS Microbiology Reviews*. 2023. Vol. 47, Iss. 6. Article fuad061. doi: 10.1093/femsre/fuad061
2. Maiti C. K., Sen S., Acharya R., Acharya K. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. *Plant Pathology*. 2007. Vol. 56, Iss. 4. P. 723–723. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01578.x
3. McLaughlin M. S., Roy M., Abbasi P. A. et al. Why Do We Need Alternative Methods for Fungal Disease Management in Plants? *Plants*. 2023. Vol. 12, Iss. 22. Article 3822. doi: 10.3390/plants12223822
4. Nayak A. M., Dhange P. R., Farooqkhan Muhammad Suhaib Ismayil M. Fungal Bioagents and Botanicals Efficacy against *Alternaria alternata* Responsible for Leaf Blight Disease of *Stevia rebaudiana*. *International Journal of Plant & Soil Science*. 2023. Vol. 35, Iss. 22. P. 254–260. doi: 10.9734/ijpss/2023/v35i224131
5. Стефанюк В. Й., Павліченко М. В. Стевія (*Stevia Rebaudiana* Bertoni): біологія, вирощування, переробка та економіка. Київ : Компринт, 2022. 345 с.
6. Gunasena M. D. K. M., Senarath W. T. P. S. K. *In vitro* plant regeneration of *Stevia rebaudiana* through indirect organogenesis. *International Journal of Botany Studies*. 2019. Vol. 4, Iss. 4. P. 199–203.

7. Положенець В. М., Федорчук С. В. Вплив біопрепаратів на збудника альтернаріозу картоплі (*Alternaria solani*) в умовах *in vitro* зони Полісся України. *Наука – агропромислового виробництва: тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції* (м. Житомир, 30 квітня 2014 р.). Житомир: Житомир. нац. агрокол. ун-т, 2014. С. 12–14.
8. Ковбасенко Р. В., Дмитрієв О. П. Використання наночастинок біогенних елементів і хітозану при вирощуванні пасльонових *in vitro* та *in vivo*. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія*. 2019. № 1. С. 73–80.
9. Meng Q., Zou J., Zou J. et al. Effect of Cu²⁺ concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2007. Vol. 49, Iss. 1. P. 95–101.
10. Rodrigues T. T., Maffia L. A., Dhingra O. D., Mizubuti E. S. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*. 2010. Vol. 35. P. 203–212. doi: 10.1590/S1982-56762010000400001
11. Feng W., Zheng X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*. 2007. Vol. 18, Iss. 9. P. 1126–1130. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.05.017
12. Kuźniak E. Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *Journal of Phytopathology*. 2001. Vol. 149, Iss. 10. P. 575–582. doi: 10.1046/J.1439-0434.2001.00682.X
13. Iacomini-Vasilescu B., Avenot H., Bataille-Simoneau N. et al. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*. 2004. Vol. 23, Iss. 6. P. 481–488. doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.003
14. Singh P. C., Singh D. *In vitro* evaluation of fungicides against *Alternaria alternata*. *Annals of Plant Protection Sciences*. 2006. Vol. 14, Iss. 2. P. 500–502. doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i4as.10203
15. Hessel-Pras S., Kieshauer J., Roenn G., Luckert C. et al. *In vitro* characterization of hepatic toxicity of *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*. 2019. Vol. 35. P. 157–168. doi: 10.1007/s12550-018-0339-9
16. Xu S., Yan F., Ni Z. et al. *In vitro* and *in vivo* control of *Alternaria alternata* in cherry tomato by essential oil from *Laurus nobilis* of Chinese origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014. Vol. 94, Iss. 7. P. 1403–1408. doi: 10.1002/jsfa.6428
17. Biswas M. K., Ghosh T. Evaluation of Phyto-extracts, Biological Agents and Chemicals against the Development of *Alternaria brassicae* *in vitro* and *in vivo*. *Evaluation*. 2008. Vol. 4. Article 14. doi: 10.9734/EJMP/2018/40412
18. Kong H., Fu X., Chang X. et al. The ester derivatives of ferulic acid exhibit strong inhibitory effect on the growth of *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Postharvest Biology and Technology*. 2023. Vol. 196. P. 112–158. doi: 10.1016/j.postharvbio.2022.112158
19. Hohenbichler J., Aichinger G., Rychlik M. et al. *Alternaria alternata* toxins synergistically activate the aryl hydrocarbon receptor pathway *in vitro*. *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, Iss. 7. Article 1018. doi: 10.3390/biom10071018
20. Sharma R. L., Ahir R. R., Yadav S. L. et al. Effect of nutrients and plant extracts on *Alternaria blight* of tomato caused by *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2021. Vol. 128, Iss. 4. P. 951–960. doi: 10.1007/s41348-021-00485-4
21. Стефанюк В. Й. Вегетативне розмноження стевої: метод. реком. Київ: ІБКіЦБ, 2011. 24 с.
22. Завгородній В. М. Оптимізація елементів технології вирощування стевої в умовах Лісостепу України: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Київ, 2005. 21 с.
23. Стефанюк В. Й., Жужалова Т. П. Клональне мікророзмноження стевої. *Цукрові буряки*. 2014. № 3. С. 19–20.
24. Стефанюк В. Й., Балан В. М., Фурса А. В., Єндружієвська Л. П. Технологія вирощування стевої насінням: метод. реком. Київ: ІБКіЦБ НААН, 2019. 30 с.
25. Ермантраут Е. Р., Присяжнюк О. І., Шевченко І. Л. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних в пакеті Statistica-6: метод. вказівки. Київ: ПоліграфКонсалтинг, 2007. 55 с.

References

1. Fernandes, C., Casadevall, A., & Gonçalves, T. (2023). Mechanisms of *Alternaria* pathogenesis in animals and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(6), Article fuad061. doi: 10.1093/femsre/fuad061
2. Maiti, C. K., Sen, S., Acharya, R., & Acharya, K. (2007). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. *Plant Pathology*, 56(4), Article 723. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01578.x
3. McLaughlin, M. S., Roy, M., & Abbasi, P. A. (2023). Why do we need alternative methods for fungal disease management in plants? *Plants*, 12(22), Article 3822. doi: 10.3390/plants12223822
4. Nayak, A. M., Dhange, P. R., & Farooqkhan, M. S. I. (2023). Fungal bioagents and botanicals efficacy against *Alternaria alternata* responsible for leaf blight disease of *Stevia rebaudiana*. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(22), 254–260. doi: 10.9734/ijpss/2023/v35i224131

5. Stefaniuk, V. Y., & Pavlichenko, M. V. (2022). *Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni): Biology, Cultivation, Processing, and Economy*. Kyiv: Komprint. [In Ukrainian]
6. Gunasena, M. D. K. M., & Senarath, W. T. P. S. K. (2019). *In vitro* plant regeneration of *Stevia rebaudiana* through indirect organogenesis. *International Journal of Botany Studies*, 4(4), 199–203.
7. Polozhenets, V. M., & Fedorchuk, S. V. (2014). The effect of biopreparations on the causative agent of potato alternariosis (*Alternaria solani*) under *in vitro* conditions in the Polissia region of Ukraine. *Science for Agro-Industrial Production: Abstracts of Scientific and Practical Conference* (pp. 12–14). Zhytomyr: Zhytomyr National Agroecological University. [In Ukrainian]
8. Kovbasenko, R. V., & Dmytriiev, O. P. (2019). Use of nanoparticles of biogenic elements and chitosan in the cultivation of solanaceous plants *in vitro* and *in vivo*. *Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series: Biology*, 1, 73–80. [In Ukrainian]
9. Meng, Q., Zou, J., Zou, J., Jiang, W., & Liu, D. (2007). Effect of Cu²⁺ concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 49(1), 95–101.
10. Rodrigues, T. T., Maffia, L. A., Dhingra, O. D., & Mizubuti, E. S. (2010). *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*, 35, 203–212. doi: 10.1590/S1982-56762010000400001
11. Feng, W., & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*, 18(9), 1126–1130. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.05.017
12. Kuźniak, E. (2001). Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *Journal of Phytopathology*, 149(10), 575–582. doi: 10.1046/J.1439-0434.2001.00682.X
13. Iacomì-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataille-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M., & Simoneau, P. (2004). *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*, 23(6), 481–488. doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.003
14. Singh, P. C., & Singh, D. (2006). *In vitro* evaluation of fungicides against *Alternaria alternata*. *Annals of Plant Protection Sciences*, 14(2), 500–502. doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i4as.10203
15. Hessel-Pras, S., Kieshauer, J., Roenn, G., Luckert, C., Braeuning, A., & Lampen, A. (2019). *In vitro* characterization of hepatic toxicity of *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 35, 157–168. doi: 10.1007/s12550-018-0339-9
16. Xu, S., Yan, F., Ni, Z., Chen, Q., Zhang, H., & Zheng, X. (2014). *In vitro* and *in vivo* control of *Alternaria alternata* in cherry tomato by essential oil from *Laurus nobilis* of Chinese origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), 1403–1408. doi: 10.1002/jsfa.6428
17. Biswas, M. K., & Ghosh, T. (2008). Evaluation of Phyto-extracts, Biological Agents and Chemicals against the Development of *Alternaria brassicae* *in vitro* and *in vivo*. *Evaluation*, 4, Article 14. doi: 10.9734/EJMP/2018/40412
18. Kong, H., Fu, X., Chang, X., Ding, Z., Yu, Y., Xu, H., & Ding, S. (2023). The ester derivatives of ferulic acid exhibit strong inhibitory effect on the growth of *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Postharvest Biology and Technology*, 196, 112–158. doi: 10.1016/j.postharvbio.2022.112158
19. Hohenbichler, J., Aichinger, G., Rychlik, M., Del Favero, G., & Marko, D. (2020). *Alternaria alternata* toxins synergistically activate the aryl hydrocarbon receptor pathway *in vitro*. *Biomolecules*, 10(7), Article 1018. doi: 10.3390/biom10071018
20. Sharma, R. L., Ahir, R. R., Yadav, S. L., Sharma, P., & Ghasolia, R. P. (2021). Effect of nutrients and plant extracts on *Alternaria blight* of tomato caused by *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(4), 951–960. doi: 10.1007/s41348-021-00485-4
21. Stefaniuk, V. Y. (2011). *Vegetative propagation of stevia: Methodological recommendations*. Kyiv. [In Ukrainian]
22. Zavhorodnii, V. M. (2005). *Optimization of elements of stevia cultivation technology in the conditions of the Forest-Steppe of Ukraine*: Abstract of the dissertation for the degree of Candidate of Agricultural Sciences. Kyiv. [In Ukrainian]
23. Stefaniuk, V. Y., & Zhuzhalova, T. P. (2014). Clonal micropropagation of stevia. *Sugar Beet*, 3, 19–20. [In Ukrainian]
24. Stefaniuk, V. Y., Balan, V. M., Fursa, A. V., & Yendruzhiivska, L. P. (2019). *Technology of stevia cultivation by seeds: Methodological recommendations*. Kyiv. [In Ukrainian]
25. Ermantraut, E. R., Prysiazhniuk, O. I., & Shevchenko, I. L. (2007). *Statistical analysis of agronomic experimental data in the Statistica-6 package: Methodological guidelines*. Kyiv: PolihrafConsaltyng. [In Ukrainian]

UDC 633.66:632.4

Voitovska, V. I.¹, Zabolotna, A. V.², Polishchuk, T. V.², & Korobko, O. O.³ (2024). Obtaining *Alternaria*-tolerant stevia breeding genotypes *in vitro*. *Advanced Agritechnologies*, 12(3). <https://doi.org/10.47414/na.12.3.2024.316883> [In Ukrainian]

¹*Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet NAAS of Ukraine, 25 Klinichna St., Kyiv, 03110, Ukraine, e-mail: vvojtovska6@gmail.com*

²*Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University, 2 Sadova St., Uman, Cherkasy region, 20300, Ukraine*

³*Bohdan Khmelnytsky National University of Cherkasy, 81 Shevchenko Blvd, Cherkasy, 18031, Ukraine*

Purpose. To obtain breeding genotypes of stevia tolerant to *Alternaria alternata in vitro*. **Methods.** Shoots of different stevia varieties ('Berehynia', 'Slavutych', and 'Halyna') and lines (No. 3, No. 11, No. 14, and No. 16) were cultivated on modified Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented with *Alternaria alternata* culture filtrate (CF) at concentrations ranging from 10 to 100%. 'Berehynia' variety served as the control. Cultivation was conducted at 24 ± 2 °C with a photoperiod of 16/8 hours. Shoot viability and biometric parameters were assessed on the 3rd and 7th days. **Results.** A 100% CF concentration led to the death of shoots across all varieties and lines. At 10% concentration, the impact on viability was minimal, with most shoots remaining healthy and showing no changes in biometric parameters. Concentrations of 15 and 20% ensured high viability (72–95%) in all genotypes, with the best results observed for 'Berehynia' and 'Slavutych'. At 25% concentration, viability decreased to 70–91%, and at 30%, to 68–90%. Concentrations from 35 to 45% reduced shoot viability to 20–63% and 20–47%, respectively, with 'Halyna' exhibiting the lowest values. Necrotic changes were observed at 25–45% concentrations, with the number of necrotic shoots increasing as concentration rose. Concentrations of 15–20% did not induce necrotic changes in 'Berehynia' and 'Slavutych', while in 'Halyna' and the lines, the number of necrotic shoots remained low. **Conclusions.** The addition of CF to the medium at concentrations up to 20% did not critically affect shoot viability, shoot formation ability, or biometric parameters. Increasing concentrations above 20% led to reduced shoot viability and increased numbers of necrotic plants. The 'Berehynia' and 'Slavutych' varieties demonstrated the highest tolerance, whereas 'Halyna' proved the most sensitive, even compared to relatively tolerant stevia lines.

Keywords: *Stevia rebaudiana*; varieties; lines; culture filtrate (CF); concentrations; shoot formation; shoot viability; biometric parameters.

Надійшла / Received 16.11.2024

Погоджено до друку / Accepted 06.12.2024