УДК 631.811.9875.117.2.577.2.08 https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1281

ШИША О. М.[1], СПІВАК С. І.[1]✉, ЦИГАНКОВА В. А.[2], ІУТИНСЬКА Г. О.[3], БІЛЯВСЬКА Л. О.[3], ЄМЕЦЬ А. І.[1], БЛЮМ Я. Б.[1]

[1] Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net
[2] Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України,
Україна, 02094, м. Київ, вул. Мурманська, 1, e-mail: vtsygankova@ukr.net
[3] Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: galyna.iutynska@gmail.com
✉ *svetlana_spivak@ukr.net, (050) 159-00-57*

ЗАСТОСУВАННЯ БІОРЕГУЛЯТОРІВ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ ДЛЯ ОТРИМАННЯ *IN VITRO* ЛІНІЙ КАРТОПЛІ З ПІДВИЩЕНОЮ СТІЙКІСТЮ ДО ПАРАЗИТИЧНИХ НЕМАТОД

Мета. Отримання в умовах *in vitro* ліній картоплі (*Solanum tuberosum* L.) сорту Вернісаж із генетично-опосередкованою стійкістю до паразитичної нематоди *Heterodera schachtii* на живильних середовищах МС з мікробними біорегуляторами. ***Методи.*** В умовах *in vitro* досліджено процес органогенезу рослин картоплі на живильних середовищах МС, що містили мікробні біорегулятори у концентраціях 25–100 мкл/л в комплексі з фітогормонами 2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК. Методом дот-блотінгу визначали ступінь гібридизації між цитоплазматичними si/miРНК, виділеними з клітин рослин-регенерантів картоплі, вирощених на штучному інвазійному фоні, та мРНК нематоди. У безклітинній системі білкового синтезу з проростків пшениці *in vitro* досліджено сайленсингову активність препаратів si/miРНК, виділених із клітин рослин-регенераторів картовплі, на матрицях мРНК, виділених із клітин нематоди. ***Результати.*** Дослідження, проведені в умовах *in vitro*, показали, що додавання біорегуляторів у концентраціях 25–100 мкл/л до живильного середовища МС у комплексі з фітогормонами 2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК підвищує ефективність регенерації пагонів до 43–47 % порівняно з показниками, отриманими на контрольному середовищі МС. Встановлено зростання ступеня гібридизації до 19–38 % між цитоплазматичними мРНК, виділеними з клітин нематоди *H. schachtii*, та si/miРНК, виділеними з клітин рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на живильних середовищах із додаванням біорегуляторів на штучному інвазійному фоні. ***Висновки.*** Застосування в умовах *in vitro* мікробних біорегуляторів як складових компонентів живильного середовища МС сприяє підвищенню ефективності регенерації пагонів картоплі та посиленню РНКі-опосередкованої резистентності рослин-регенерантів до паразитичної нематоди *H. schachtii.*

Ключові слова: мікробні біорегулятори, органогенез картоплі *in vitro*, стійкість картоплі до нематоди *Heterodera schachtii*, РНК-інтерференція.

Актуальним напрямком у сучасній біотехнології є одержання нових ліній сільськогосподарських рослин із підвищеною резистентністю до хвороб, що спричиняються патогенними організмами грибного та бактеріального походження, а також паразитичними нематодами [1]. Щорічне зниження обсягу сільськогосподарської продукції внаслідок ураження фітонематодами варіює у межах 10–20 %, в окремих випадках втрати врожаю досягають 70–90 %. У грошовому еквіваленті ці збитки оцінюють у 125 млрд дол. США, що не може залишатися поза увагою захисників рослин.

Існують різні засоби управління чисельністю нематод: хімічні, фізичні, біологічні та агротехнічні (покривні культури, сівозміна, сорти рослин, стійкі до пошкодження нематоди, соляризація ґрунту, пестициди та ін.), карантинні [2]. Хімічні засоби досі є найбільш ефективним способом боротьби з шкідниками, проте, окрім прямої протинематодної дії, вони завдають шкоди навколишньому середовищу, чинять негативну дію на якість урожаю та загрожують здоров'ю людей, внаслідок чого застосування нематицидів в останні роки призупинено у багатьох країнах [2]. Серед перспективних мікроб-

© **ШИША О. М., СПІВАК С. І., ЦИГАНКОВА В. А., ІУТИНСЬКА Г. О., БІЛЯВСЬКА Л. О., ЄМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.**

них продуцентів речовин із нематицидними властивостями значне місце належить ґрунтовим стрептоміцетам та їх унікальним властивостям синтезувати антибіотики, ліпіди, лектини, вітаміни, рослинні гормони та інші біологічно активні сполуки. Співробітниками відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України на основі метаболітів ґрунтових стрептоміцетів розроблено нові полікомпонентні біорегулятори (Аверком, Фітовіт, Віолар), які можуть гальмувати розвиток гельмінтів рослин та шкідливих комах, сприяючи поліпшенню санітарного стану ґрунту [3]. Новим аспектом використання розроблених біорегуляторів є застосування їх для отримання ліній сільськогосподарських рослин із підвищеною резистентністю до нематод в умовах *in vitro*. Проведені нами раніше дослідження на культурі пшениці (*Triticum aestivum* L.) двох сортів (Ятрань 60 і Зимоярка) показали, що додавання композиційних біорегуляторів, створених на основі продуктів метаболізму ґрунтових стрептоміцетів Аверком, Аверком нова-2, Віолар та Фітовіт, до живильного середовища МС значно підвищує резистентність до паразитичних нематод рослин-регенерантів, отриманих в умовах *in vitro*, які надалі вирощувались в умовах теплиці на природному інвазійному фоні [4, 5]. Молекулярно-генетичні дослідження показали, що підвищена під впливом біорегуляторів стійкість рослин до паразитичних нематод є генетично зумовленою та виникає внаслідок індукції у клітинах рослин процесу РНК-інтерференції, тобто шляхом підвищення синтезу імунозахисних si/miРНК [4, 5].

Метою нашої роботи є селекція в умовах *in vitro* нових ліній клітин рослин картоплі (*Solanum tuberosum* L.) сорту Вернісаж, вирощених на живильних середовищах із біорегуляторами мікробного походження, які мають підвищену стійкість до паразитичної нематоди *Heterodera schachtii*, відповідно до молекулярно-генетичних показників.

Матеріали і методи

Отримання рослин рослин-регенерантів картоплі в умовах in vitro. В експериментах було використано сорт картоплі Вернісаж української селекції, для якого в Державній установі «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (ДУ ІХБГ НАНУ) було розроблено протоколи індукції калюсогенезу та регенерації рослин в умовах *in vitro* [6]. Стерильні рослини сорту Вернісаж було отримано із колекції ДУ ІХБГ НАНУ; їх мікроклонування *in vitro* проводили на живильному середовищі МС [7].

Визначення впливу біорегуляторів мікробіологічного походження на індукцію морфогенезу в культурі ізольованих клітин та тканин рослин картоплі проводили на експлантах міжвузлів стебел. Рослинний матеріал переносили до кліматичної камери і кожні 3 тижні пасували на свіжоприготовлені живильні середовища для регенерації. Як контроль застосовували середовище МС, доповнене фітогормонами 2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, як дослідне живильне середовище застосовували середовище МС, доповнене фітогормонами 2 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК у комплексі з біорегуляторами мікробіологічного походження Аверком, Аверком нова-2, Віолар та Фітовіт, які було використано в діапазоні концентрацій 25–100 мкл/л. Регенеровані пагони пасували протягом 2,5–3-х місяців на живильних середовищах МС, які містили 25–100 мкл/л біорегуляторів, для подальшого росту рослин-регенерантів і формування коріння. Кожен експеримент проводився у трьох повторах. Ефективність регенерації (%) визначали через п’ять тижнів після початку експерименту як співвідношення кількості пагонів (регенерантів), отриманих на контрольних та експертиментальних середовищах МС, до загальної кількості висаджених експлантів (гіпокотилів) [8].

Дослідження молекулярно-генетичних показників стійкості рослин-регенерантів картоплі, отриманих в умовах in vitro, до нематоди H. schachtii. Виділення цитоплазматичних мРНК та фракцій низькомолекулярних si/miРНК із клітин контрольних та дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на штучному інвазійному фоні на живильних середовищах з біорегуляторами, проводили за допомогою розробленого нами методу [9]. Оцінку розміру (21–25 нт) виділених із клітин рослин si/miРНК (попередньо [^{33}P]-мічених *in vivo* за допомогою $Na_2HP^{33}O_4$) проводили за допомогою методу одномірного електрофорезу в 15 %-ному поліакриламідному гелі (ПААГ), просоченому етидіумбромідом перед фотографуванням фракцій РНК в УФ [4, 5]. Отримані гелі висушували за допомогою теплової вакуумної сушарки (LKB, Швеція). Флюорографування здійснювали шляхом додавання в гель флуоресцентного

реагенту 2,5-дифенілоксазолу та експозиції гелю протягом двох місяців з Х-рентгенівською плівкою за – 70°С. Виділення цитоплазматичних мРНК із клітин личинок паразитичної нематоди *H. schachtii* проводили відповідно до методу, детально описаного в опублікованій нами раніше роботі [9]. За допомогою дот-блот методу [4, 5] визначали ступінь гібридизації між цитоплазматичними мРНК, виділеними з клітин нематоди *H. schachtii*, та si/miРНК, виділеними з клітин дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених на штучному інвазійному фоні на живильних середовищах із додаванням біорегуляторів. Радіоактивність гібридних молекул (імп./хв/20мкг мРНК) визначали на склофільтрах «Millipore» АР-15 в толуольному сцинтиляторі, що містив флуоресцентний реагент 2,5-дифенілоксазол (ППО) в сцинтиляційному лічильнику LS 100С фірми «Beckman» [4, 5]. Ступінь гібридизації (%) визначали за різницею показників гібридизації між молекулами цитоплазматичних мРНК, виділеними з клітин нематоди *H. schachtii*, та si/miРНК, виділеними з клітин дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* [4, 5]. Сайленсингову активність si/miРНК, ізольованих із клітин контрольних та дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro,* на матриці мРНК, виділених із клітин нематод, визначали у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці [4, 5, 10]. У цих експериментах використовували немічені мРНК та si/miРНК, у якості міченої амінокислоти для синтезу поліпептидів на матриці мРНК використовували [S^{35}]-метионін. Радіоактивність синтезованих у безклітинній системі поліпептидів визначали за кількістю включення [S^{35}] мітки у синтезовані поліпептиди (імп./хв/мг білка) на склофільтрах «Millipore» АР-15 у толуольному сцинтиляторі, що містив ППО у сцинтиляційному лічильнику LS 100С (Beckman). Сайленсингову активність si/miРНК (%) визначали за показниками радіоактивності синтезованих на мРНК матриці поліпептидів, отриманих у дослідних стосовно шодо контрольних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* [4, 5].

Статистичну обробку даних здійснювали методом дисперсійного аналізу за допомогою стандартного t–критерію Стьюдента [11] та з використанням комп'ютерних програм Statistica 6.0 та Microsoft Excel 2002, відмінності між експериментом і контролем є статистично достовірними за рівня значущості $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Дослідження впливу біорегуляторів на органогенез рослин картоплі в умовах in vitro. Для досліджень особливостей морфогенетичних реакцій картоплі в умовах *in vitro* раніше вже оптимізовано склад живильних середовищ, визначено найбільш оптимальні типи експлантів, підібрано найкращі умови для одержання калюсних клітин та рослин-регенерантів, мікробульб та процесів ризогенезу [12, 13]. В дослідженнях нами були використані протоколи індукції клітин калюсу та пагонів в умовах *in vitro,* розроблені саме для сорту Вернісаж [6]. Оскільки більш висока здатність до регенерації рослин характерна для експлантів міжвузлових ділянок стебел порівняно з листковими експлантами, у яких виявлено незначну здатність до утворення пагонів, то дослідження ми проводили, враховуючи раніше отримані результати [6, 12]. Результати проведеного статистичного аналізу даних з регенерації пагонів у клітинах і тканинах картоплі показали, що на живильному середовищі МС, доповненому біорегулятором Аверком у концентраціях 25 та 50 мкл/л відповідно в комплексі з фітогормонами БАП (2 мг/л) і (НОК 0,1 мг/л), відбувається підвищення ефективності регенерації пагонів до 45 % (порівняно з меншою ефективністю регенерації пагонів – до 38 %, отриманою на контрольному середовищі, яке не містить біорегуляторів (рис. 1).

Також встановлено, що на живильному середовищі МС, доповненому біорегуляторами Аверком нова-2, Віолар та Фітовіт у концентраціях 75 мкл/л та 100 мкл/л мкл/л відповідно, в комплексі з фітогормонами БАП та НОК, застосованими у концентраціях 2 мг/л і 0,1 мг/л, відбувається підвищення ефективності регенерації пагонів до 47 %, 43 % та 45 % відповідно у клітинах і тканинах *S. tuberosum* (порівняно з меншою ефективністю регенерації пагонів – до 38 %, отриманою на контрольному середовищі, яке не містить біорегуляторів) (рис. 1). Надалі лінії рослин картоплі сорту Вернісаж, отримані в умовах *in vitro* на живильних середовищах МС, доповнених фітогормонами БАП і НОК та біорегуляторами Аверком, Аверком нова-2, Віолар та Фітовіт, досліджувалися на стійкість до нематоди *H. schachtii* за молекулярно-генетичними показниками.

Дослідження молекулярно-генетичних показників стійкості рослин-регенерантів картоплі до паразитичної нематоди H. schachtii. Методом дот-блот гібридизації встановлено зростання показника гібридизованих молекул цитоплазматичних мРНК, виділених із клітин нематоди *H. schachtii*, та si/miPHK, виділених із клітин рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на живильних середовищах із додаванням біорегуляторів: Аверкомом – до 38 %, Аверкомом нова-2 – до 31 %, Фітовітом – до 25 %, Віоларом – до 19 % відповідно (порівняно з аналогічним показником контрольних рослин-регенерантів картоплі) (рис. 2). Менш виражені зміни за показником гібридизованих молекул виявлено між популяціями цитоплазматичних мРНК, виділених із клітин нематоди, та si/miPHK, виділених із клітин дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на штучному інвазійному фоні на живильних середовищах без додавання біорегуляторів, – до 13 % (порівняно до аналогічного показника контрольних рослин-регенерантів картоплі) (рис. 2).

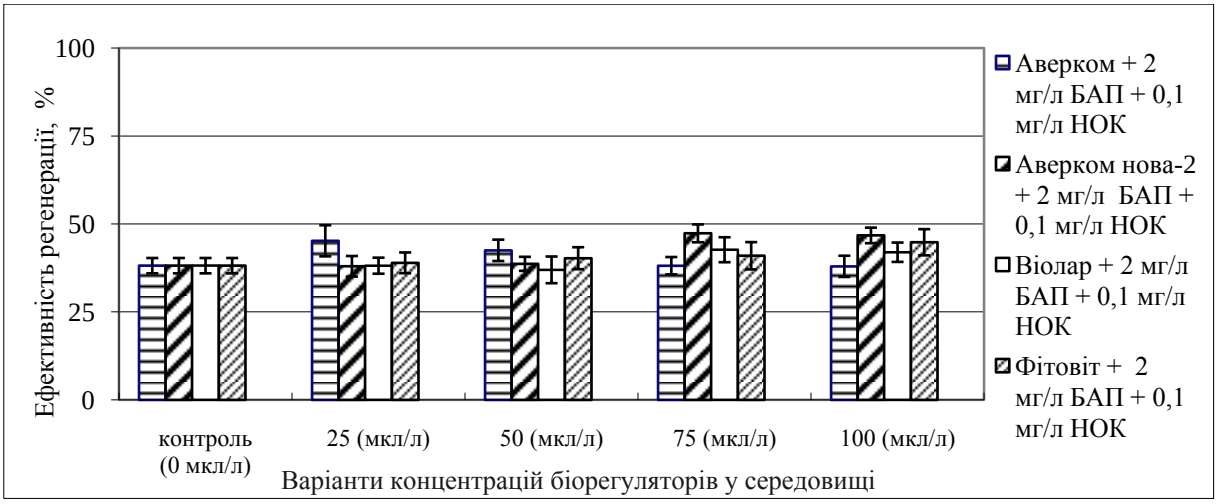

Рис. 1. Ефективність регенерації пагонів картоплі сорту Вернісаж, отриманих в умовах *in vitro* на живильних середовищах МС, доповнених фітогормонами БАП та НОК, застосованими у концентраціях 2 мг/л і 0,1 мг/л, та біорегуляторами мікробіологічного походження Аверком, Аверком нова-2, Віолар та Фітовіт у концентраціях 25–100 мкл/л.

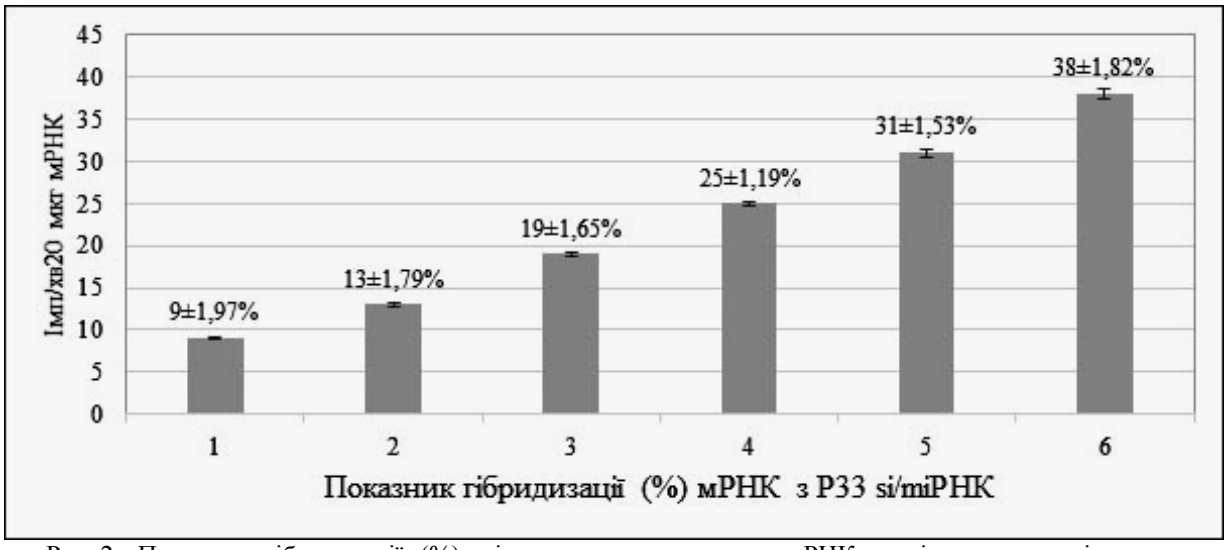

Рис. 2. Показник гібридизації (%) між цитоплазматичними мРНК, виділеними з клітин нематоди *H. schachtii*, та si/miPHK, виділеними з клітин дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на штучному інвазійному фоні на живильних середовищах із додаванням біорегуляторів: 1 – мРНК з личинок нематод (ЛМ) та si/miPHK з контрольних неінфікованих рослин; мРНК із ЛМ та si/miPHK з дослідних рослин, вирощених за наявності: 2 – ЛМ; 3 – ЛМ і Віолару; 4 – ЛМ і Фітовіту; 5 – ЛМ і Аверкому нова-2; 6 – ЛМ і Аверкому.

У безклітинній системі білкового синтезу з проростків пшениці *in vitro* встановлено підвищення сайленсингової активності на матриці цитоплазматичних мРНК, виділених із клітин паразитичної нематоди *H. schachtii*, популяцій цитоплазматичних si/miPHK, виділених із клітин дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на штучному інвазійному фоні на живильних середовищах із біорегуляторами: Аверкомом нова-2 – до 37 %, Аверкомом – до 33 %, Фітовітом – до 28 %, Віоларом – до 25 % (порівняно до контролю) (рис. 3).

Меншу сайленсингову активність на матрицях мРНК, виділених із клітин нематоди *H. schachtii*, встановлено для si/miPHK, ізольованих із дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на штучному інвазійному фоні на живильних середовищах без додавання біорегуляторів, – до 16 % (рис. 3).

Висновки

Таким чином, результати проведених молекулярно-генетичних досліджень свідчать про те, що у клітинах рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на живильних середовищах з мікробними біорегуляторами на інвазійному фоні, значно підвищується рівень синтезу малих регуляторних si/miPHK, що містять послідовності компліментарні еволюційно консервативним послідовностям мРНК нематод [4, 5, 9]. У результаті цих процесів покращується ріст та розвиток рослин-регенерантів картоплі на інвазійному фоні завдяки підвищенню їх резистентності до паразитичної нематоди *H. schachtii.*

Дослідження було виконано за підтримки проекту цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» на 2015–2019 рр. «Отримання ліній клітин сільськогосподарських рослин з підвищеною стійкістю до патогенних та паразитичних організмів шляхом індукції процесу РНК-інтерференції біорегуляторами мікробного походження» (№ Держреєстрації 0115U005201).

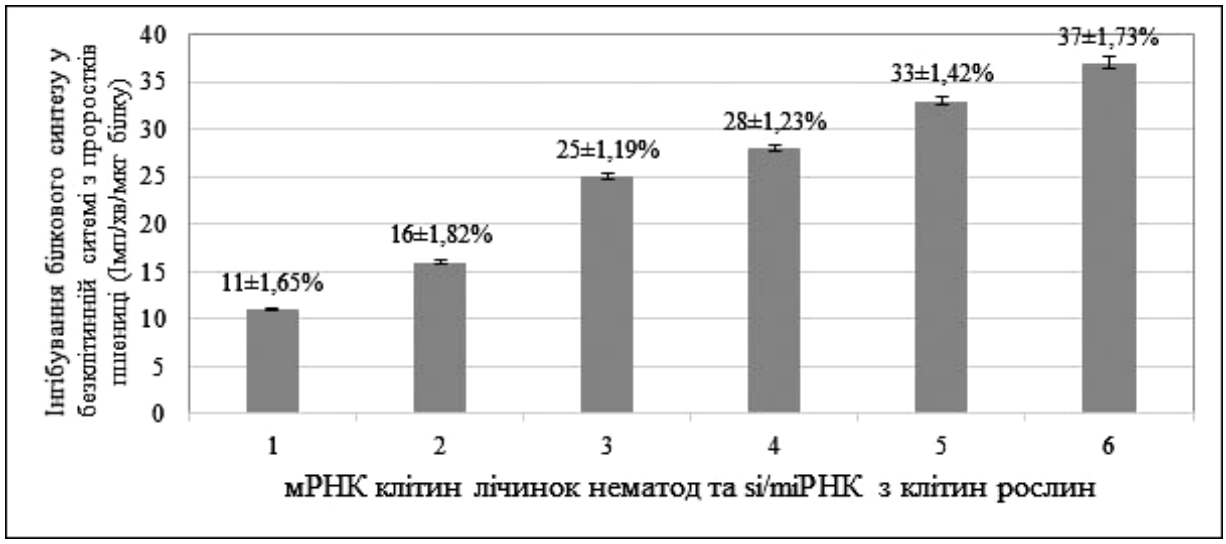

Рис. 3. Сайленсингова активність (%) si/miPHK, виділених із клітин контрольних та дослідних рослин-регенерантів картоплі, вирощених в умовах *in vitro* на штучному інвазійному фоні на живильних середовищах із додаванням біорегуляторів, на матрицях мРНК, виділених із клітин нематоди *H. schachtii:* 1 - мРНК з личинок нематод (ЛМ) та si/miPHK з контрольних неінфікованих рослин; мРНК з ЛМ та si/miPHK з дослідних рослин, вирощених за наявності): 2 – ЛМ; 3 – ЛМ і Віолару; 4 – ЛМ і Фітовіту; 5 – ЛМ і Аверкому; 6 – ЛМ і Аверкому нова-2.

References

1. Bird D.McK., Opperman Ch.H., Davies K.G. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. *Intern. J. Parasit.* 2003. Vol. 33. P. 1269–1276.
2. Schmitt D.P., Sipes B.S. Plant-parasitic nematodes and their management. *Plant Disease*. CTAHR. 1998. PD-15. 4 p.
3. Iutynska G.O., KozyrytskaV.E., Valagurova O.V., Mukvich M.S., Bilyavska L.O., Petruk T.V. Strain Streptomyces avermitilis - producer of avermectins, substances of antiparasitic action: Patent 69639 UA, МКИ[1] C 12N 1/20 C 12P 17/02, C 12P 17/18, C 12P 19/62, C 12R 1/465. Bulletin 2006. № 8.

4. Tsygankova V.A., Andrusevich Ya.V., Shysha E.N., Biliavska L.O., Galagan T.O., Galkin A.P., Yemets A.I., Iutynska G.A., Blume Ya.B. RNAi-mediated resistance against plant parasitic nematodes of wheat plants obtained in vitro using bioregulators of microbiological origin. *Curr. Chem. Biol.* 2019. Vol. 13. P. 73–89. doi: 10.2174/2212796812666180507130017.
5. Blyuss K.B., Fatehi F., Tsygankova V.A, Biliavska L.O., Iutynska G.O., Yemets A.I., Blume Y.B. RNAi-Based biocontrol of wheat nematodes using natural poly-component biostimulants. *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00483.
6. Zhuk V.P., Olijnik T.M., Єmec' A.I., Blyum Ya.B. Regeneraciya ukraïns'kikh sortiv kartopli ta ikh genetichna transformaciya sintetichnim CRY-genami. *Trudy Nikitskogo botanicheskogo sada.* 2009. T. 131. S. 197–201. [in Ukrainian] / Жук В.П., Олійник Т.М., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Регенерація українських сортів картоплі та їх генетична трансформація синтетичним CRY-генами. *Труды Никитского ботанического сада.* 2009. Т. 131. С. 197–201.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
8. Tsygankova V., Shysha E., Galkin A., Biliavska L., Iutynska G., Yemets A., Blume Y. Impact of microbial biostimulants on induction of callusogenesis and organogenesis in the isolated tissue culture of wheat *in vitro*. *J. Med. Plants. Stud.* 2017. Vol. 5. P. 155–164.
9. Tsygankova V.A., Andrusevich Ya.V., Ponomarenko S.P., Galkin A.P., Blume Ya.B. Isolation and amplification of cDNA from the conserved region of the nematode *Heterodera schachtii* 8H07 gene with a close similarity to its homolog in rape plants. *Cytol. Genetics.* 2012. Vol. 46, № 6. P. 335–341.
10. Takai K., Sawasaki T., Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nature Protocol.* 2010. Vol. 5, № 2. P. 227–238. doi: 10.1038/nprot.2009.207.
11. Statistical Methods in Molecular Biology. Series: Methods in molecular biology / (Eds.). New York: Humana Press. 2010. Vol. 13. №. 620. 636 p.
12. Kravets O., Pogrebnyak N., Shysha E., Lopato S., Gleba Yu. Transformation of different potato cultivars and analysis of the transgenic plants. *Biopolymers and Cell*. 1992. Vol. 8, № 6. P. 44–48.
13. Boroday V.V., Kliachenko O.L. Osoblyvosti indukovanoho morfohenezu ta reheneratsii henotypiv *Solanum tuberusum* L. ukrains'koi selektsii. *Naukovi pratsi instytutu bioenerhetychnykh kul'tur ta tsukrovykh buriakiv*. 2014. Vyp. 21. S. 205–211. [in Ukrainian] / Бородай В.В., Кляченко О.Л. Особливості індукованого морфогенезу та регенерації генотипів *Solanum tuberusum* L. української селекції. *Наукові праці інституту біоенергетичних культур та цукрових буряків.* 2014. Вип. 21. С. 205–211.

SHYSHA O.M.[1], SPIVAK S.I.[1], TSYGANKOVA V.A.[2], IUTYNSKA G.O.[3], BILIAVSKA L.O.[3], YEMETS A.I.[1], BLUME Y.B.[1]

[1] Institute of Food Biotechnology and Genomics Nat. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net
[2] V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine,
Ukraine, 02094, Kyiv, Murmanska str., 1, e-mail: vtsygankova@ukr.net
[3] Danilo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotny Academy str., 154, e-mail: galyna.iutynska@gmail.com

THE APPLICATION OF MICROBIAL ORIGINATING BIOREGULATORS TO OBTAIN *IN VITRO* LINES OF POTATO WITH INCREASED RESISTANCE TO PARASITIC NEMATODES

Aim. Obtaining *in vitro* new lines of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Vernissage with genetically mediated resistance to the parasitic nematode *H. schachtii* on nutrient MS media with microbial bioregulators. ***Methods.*** *In vitro* conditions the process of organogenesis of potato plants on nutrient MS media containing microbial bioregulators used at concentrations 25-100 μl/l in combination with phytohormones 2 mg/l BAP and 0,1 mg/l NAA was investigated. Using dot blotting method the degree of hybridization between cytoplasmic si/miRNA isolated from cells of potato plants-regenerants, grown on the artificial invasive background, and nematode mRNA was studied. In the wheat seedlings cell-free system *in vitro* the silencing activity of si/miRNA isolated from cells of potato plants-regenerants on the template of nematode mRNA was investigated. ***Results.*** The experiments conducted *in vitro* conditions showed that the addition of microbial bioregulators at concentrations 25-100 μl/l in combination with phytohormones 2 mg/l BAP and 0,1 mg/l NAA into MS media increased the efficiency of regeneration of potato shoots to 43–47 % as compared with similar indices obtained on control MS media. The increase of the degree of hybridization to 19-38 % between cytoplasmic mRNA isolated from cells of nematode *H. schachtii* and si/miRNA isolated from cells of experimental potato plants-regenerants grown *in vitro* conditions on nutrient media containing bioregulators on the artificial invasive background was shown. ***Conclusions.*** Using microbial bioregulators *in vitro* conditions as components of nutrient MS medium increases potato shoot regeneration efficiency and enhances RNAi-mediated resistance of plants-regenerants to parasitic nematode *H. schachtii.*

Keywords: microbial bioregulators, potato organogenesis *in vitro*, potato resistance to nematode *Heterodera schachtii*, RNA interference.