

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ФИЦИНА И МИКРОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА В ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ БЕРЕЗЫ ПУШИСТОЙ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ИНФИЦИРОВАННЫХ ЭКСПЛАНТОВ

С. С. Ольшанникова¹, Ю. А. Редько¹, М. С. Лавлинская^{1,2}, А. В. Сорокин^{1,2}, С. М. Панкова^{1,3}, О. А. Федорова⁴, Т. А. Гродецкая⁴, П. М. Евлаков⁴, М. Г. Холявка^{1,5*}, В. Г. Артюхов¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

² ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий

³ ФГБОУ ВО Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

⁴ ФГБОУ ВО Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова

⁵ ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

Поступила в редакцию 03.09.2021 г.

Аннотация. Поддержание стерильных условий при культивировании растений *in vitro* необходимо для сохранения показателей их роста и продуктивности. Антибиотики активно используются в качестве стерилизующих агентов, однако, они могут сильно влиять на рост и развитие растений. Использование ферментов протеаз способствует снижению инфекционной нагрузки без влияния на ростовые процессы растений. Изучены перспективы использования растительного фермента фицина, микрочастиц хитозана (200 кДа) и комплексов этих микрочастиц с фицином для снижения количества инфицированных эксплантов березы пушистой *Betula pubescens*. Стерильные экспланты березы высаживали на агаризованную питательную среду WPM с добавлением микрочастиц хитозана, свободного фицина и комплекса микрочастиц и фермента в различных вариантах опыта. В течение 21 дня оценивали количество стерильных и жизнеспособных эксплантов.

Было выявлено, что при создании комплексов фицина с микрочастицами хитозана протеолитическая активность биокатализатора по сравнению со свободным ферментом сохранялась на 75 %. Активность свободного фицина составляла 8 % от первоначального уровня (контроля) после 168 часов инкубации, в то время как активность протеазы в комплексе с хитозаном была 21 %, что свидетельствует об увеличении стабильности фермента в комплексе.

Использование иммобилизованного фицина в концентрации ~ 0.15 г/л в пересчете на фермент и ~ 0.22 г/л в пересчете на содержание хитозана позволило увеличить количество стерильных эксплантов на 50 % относительно контроля. Анализ влияния микрочастиц хитозана вне комплекса и свободного фицина на уровень инфицированности позволил установить соответственно ~ 0.22 и 0.15 г/л оптимальными концентрациями для стерилизации *in vitro* клонов березы пушистой. Добавление микрочастиц хитозана и фицина по отдельности и в виде их комплекса в среду культивирования не сказалось на жизнеспособности эксплантов, и во всех вариантах опыта она составляла 100 %. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование фицина, иммобилизованного на микрочастицах хитозана, в качестве стерилизующего агента при культивировании *in vitro* клонов березы пушистой.

Ключевые слова: фицин, микрочастицы хитозана, иммобилизация, комплекс, экспланты, стерилизация, *Betula pubescens*

Клональное микроразмножение растений – процесс, состоящий из нескольких стадий, для каждой из которых установлены определенные требования: 1) создание асептической культуры (введение

эксплантов в культуру *in vitro*); 2) мультипликация (пролиферация); 3) укоренение; 4) перевод растений в нестерильные условия (адаптация или акклиматизация); 5) доращивание адаптированных растений [1, 2]. Стадия введения эксплантов в культуру – важный этап, от которого в большей степени зависит успех всего дальнейшего микроразмножения. Он

© Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., 2021

Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

начинается с отбора растительного материала и завершается получением стерильной культуры в состоянии роста. Этот этап обычно продолжается 1-2 месяца, в ходе которых несколько десятков исходных эксплантов дают начало нескольким стерильным микрорастениям, которые затем переводятся на стадию мультипликации. Растущие растения «загрязнены» микроорганизмами и, реже, вредителями [3, 4]. Эти «загрязнители» в основном ограничиваются внешними поверхностями растения (эпифитная микрофлора), хотя некоторые бактерии могут находиться и в тканях (эндофитная микрофлора). Поскольку питательные среды, на которых культивируют растения *in vitro*, обеспечивают идеальные условия как для роста микрорастений, так и для микроорганизмов, культуры растительных тканей должны быть полностью освобождены от посторонней микрофлоры и поддерживаться в асептических условиях. Для освобождения эксплантов от микроорганизмов (бактерии, грибы) проводится обработка растительного материала дезинфицирующими химическими веществами, такими как растворы мертиолята, пероксида водорода, гипохлорита натрия и др. [5, 6] При этом для каждого вводимого в культуру тканей растения необходимо эмпирически подбирать определенные типы стерилизующих агентов и их концентрации, которые не повреждали бы сами растения и обеспечивали максимальную стерильность. Добиться 100%-ной эффективности при введении в культуру практически невозможно, но 50% и более можно считать удовлетворительным результатом. Ряд исследователей в последнее время все более активно используют антибиотики [7, 8]. Однако антибиотики, наряду с бактерицидным действием, могут быть токсичными для растительной ткани и ингибировать рост и развитие эксплантов [9]. В последнее время возрастает роль нано- и микрочастиц в качестве агентов в борьбе с фитопатогенами, в том числе, бактериального и грибкового происхождения [10, 11].

Средства биологической защиты растений постоянно совершенствуются, появляются новые перспективные способы биологического контроля фитопатогенов, один из которых – использование цистеиновых протеаз. Например, эффективным средством борьбы с седентарными нематодами рода *Meloidogyne* (obligатными паразитами растений) являются протеиназы, принадлежащие к разным классам (цистеиновые, металлопротеазы, сериновые) [12, 13]. Кроме того, доказано, что отсутствие экспрессии генов, кодирующих цистеиновые протеазы, приводит к снижению устойчивости растений к патогенам, что может ука-

зывать на их значительную роль в защите растительного организма от вредителей [14, 15].

Фицин (КФ 3.4.22.3) – протеолитический фермент, выделенный из растений рода *Ficus*, принадлежит к группе сульфгидрильных протеиназ, в активном центре содержит триаду аминокислот Cys, His и Asp [16]. Фицин обладает противовирусными свойствами, которые могут быть использованы в борьбе с вирусами растений [17, 18].

Целью нашей работы было создание комплексов фицина с микрочастицами хитозана (200 кДа) для использования в опытах для снижения количества инфицированных эксплантов березы пушистой *Betula pubescens*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования был выбран фицин из *Ficus carica* (Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), микрочастицы получали из кислоторастворимого средномолекулярного (200 кДа) хитозана (ЗАО «Биопрогресс», Россия).

Получение микрочастиц хитозана. 300 мг хитозана растворяли в 100 мл 0.3% раствора уксусной кислоты при механическом перемешивании, далее добавляли 3% раствор NaOH со скоростью 5 мл/мин при постоянном перемешивании до образования осадка белого цвета и значения pH выше 11. Раствор пропускали через фильтр (размер пор 0.45 мкм), фильтрат промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH раствора, на который затем воздействовали ультразвуком на дезинтеграторе Qsonica Sonicators (Япония) в течение 5 мин (20 кГц).

Размеры микрочастиц измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, США). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом 173 °С.

Получение комплекса фицина и микрочастиц хитозана. Комплексы фицина с микрочастицами хитозана получали следующим образом: раствор фермента в 0.05 М глициновом буфере (pH 10.0) смешивали в равных объемах с раствором микрочастиц хитозана и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Стабильность комплексов фермента и микрочастиц оценивали после инкубации в 0.05 М трис-HCl буфере (pH 7.5) при 37 °С в течение 7 суток с последующим измерением каталитической активности через определенные промежутки времени (0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч) по количеству окрашенного продукта реакции в результате расщепления субстрата азоказеина [19, 20].

Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

Метод определения протеолитической активности фицина. Определение протеолитической активности фицина проводили на субстрате азоказеине (Sigma) [21]. К 200 мкл комплекса фермента и микрочастиц хитозана добавляли 800 мкл азоказеина (0.5 % в 0.05 М трис-НСl буфере, рН 7.5) и инкубировали 2 часа при 37 °С. Далее добавляли 800 мкл трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (5 %), инкубировали 10 минут при 4 °С, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11700 g для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3 % NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 10 мм кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ, 50 мг образца и 200 мкл буфера (комплекс фермента и микрочастиц в контрольную пробу вносили последним, остальные операции для нее делали аналогично опытным пробам).

Единицей каталитической активности служило количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин. Протеолитическую активность (*A*) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D}{1000 \times 120 \times 200},$$

где *D* – оптическая плотность раствора при 410 нм, 120 – время инкубации в минутах, 200 – объем пробы, мкл, 1000 – коэффициент для пересчета в мкМ.

Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в восьмикратной повторности. Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при *p* < 0.05), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

Метод определения количества инфицированных эксплантов березы пушистой. В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали апикальные и пазушные меристемы молодых побегов березы пушистой *Betula pubescens* (№ 15-1). Стерилизацию побегов проводили согласно общепринятой методике [22]. Стерильные побеги разрезали в асептических условиях на сегменты величиной 1.5-2.0 см с одной пазушной почкой – экспланты, которые впоследствии были высажены на агаризованную питательную среду WPM с добавлением исследуемых растворов (микрочастиц хитозана, фермента (фицина), комплекса фицина и микрочастиц) в различных концентрациях. На каждый вариант опыта было взято по 6 эксплантов растений, повторность 3-х кратная

(18 растений на каждый вариант). Для контрольной группы эксплантов использовали среду без добавления испытуемых растворов. Условия климатического режима: 16-ти часовой фотопериод при освещенности 2-3 клк, температуре 24-26 °С. На протяжении 21 суток фиксировали число стерильных эксплантов и эксплантов, сформировавших основной побег (жизнеспособных эксплантов).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что при создании комплексов фицина с микрочастицами хитозана (200 кДа) активность биокатализатора по сравнению со свободным ферментом составила 75 %.

В ходе выполнения экспериментов по определению стабильности фицина при 37 °С в 0.05 М трис-НСl буфере (рН 7.5), свободного и в комплексе с микрочастицами хитозана, наблюдалось снижение активности образцов в течение семи дней. Фицин в растворе после 168 часов инкубации сохранял 8 % своей каталитической активности, комплексы с микрочастицами хитозана проявляли 21 % своей каталитической способности. Комплексы фицина с микрочастицами хитозана были более стабильны, чем свободный фермент, в промежуток времени 144-168 часов (рис. 1).

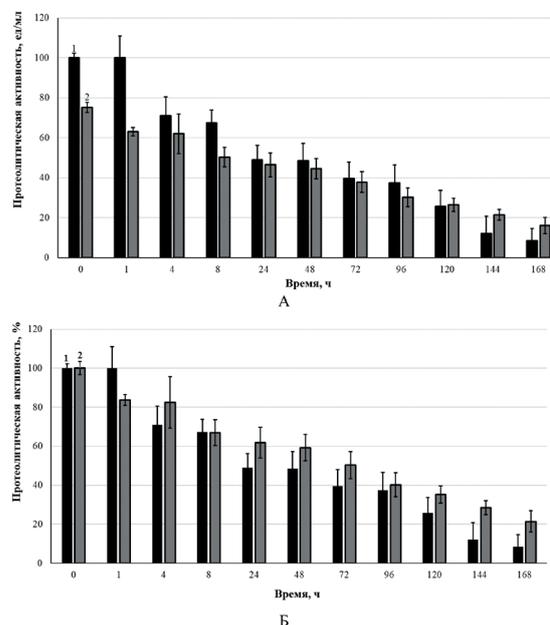


Рис. 1. Остаточная протеолитическая активность образцов (ед/мл раствора или суспензии) (А) и в % (Б) после инкубации образцов при 37 °С в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7.5: 1 – свободный фицин; 2 – фицин в комплексе с микрочастицами среднемолекулярного хитозана. За 100 % принята ферментативная активность образцов, наблюдаемая без их предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза

Далее нами была проведена серия экспериментов по использованию в составе питательной среды микрочастиц хитозана, фермента (фицина) и комплекса фермента и микрочастиц. Предполагалось, что данные компоненты, обладающие антибактериальной и антифунгальной активностью, будут способствовать снижению инфекционной нагрузки при введении в культуру *in vitro* древесных растений.

Результаты проведенных исследований показали, что введение в состав питательной среды испытуемых компонентов снижало количество инфицированных эксплантов березы пушистой. Наилучшие результаты были получены в варианте с комплексом фицина и микрочастиц хитозана – число инфицированных эксплантов колебалось от 38.9 до 61.6 % (контроль 77.8%) в зависимости от концентрации комплекса (табл. 1).

Использование комплекса фицина с микрочастицами хитозана позволило снизить инфицированность эксплантов на 50 % при концентрации 0.148 г/л в пересчете на содержание фермента, в то время как при концентрациях 0.077 и 0.008 г/л этот показатель составил ~ 33 и 16 % соответственно. Наиболее значимый результат по снижению количества инфицированных эксплантов был получен в вариантах опыта с использованием микрочастиц хитозана вне комплекса с ферментом и свободного фицина в концентрациях соответственно 0.222 и 0.148 г/л. Кроме того, добавление изучаемых компонентов не сказалось на жизнеспособности эксплантов, что свидетельствует об отсутствии их токсического действия на растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы нам удалось получить микрочастицы хитозана (200 кДа), а также комплексы этих микрочастиц с растительным ферментом фицином. Выявлено, что при создании комплексов фицина с микрочастицами хитозана ак-

тивность биокатализатора по сравнению со свободным ферментом составила 75 %. При определении стабильности комплексов микрочастиц хитозана и фицина наблюдалось снижение протеолитической активности препарата в течение семи суток.

Установлена возможность применения фицина, микрочастиц хитозана, а также комплексов этих микрочастиц с растительным ферментом фицином в качестве стерилизующих агентов в технологии клонального микроразмножения древесных растений. На примере березы пушистой *Betula pubescens* показано снижение количества инфицированных эксплантов при добавлении в питательную среду фицина (в концентрации 0.148 г/л), микрочастиц хитозана (в концентрации 0.222 г/л) и комплекса фицина и микрочастиц хитозана (в аналогичных концентрациях при пересчете одновременно на фермент и на хитозан) в 1.56, 1.56 и 2 раза соответственно.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект №21-74-20053

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999, 160 с.
2. Дитченко Т.И., Спиридович Е. В., Желдакова Р. А. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. Минск: БГУ, 2007, 107 с.
3. Сиротин А.А., Зеленкова В.Н., Шкуропат М.Н., Кортюкова Е.А. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 7–2. С. 230–232.
4. Шестибратов К.А. // Лесохозяйственная информация. 2008. №3-4. С. 22–23.
5. Самусь В.А., Семенас С.Э., Кухарчик Н.В., Зимущко А.А. // Плодоводство: науч. тр. / Институт плодоводства НАН Беларуси. Самохваловичи. 2006. Т. 18, ч. 2. С. 146–155.

Таблица 1

*Количество инфицированных и жизнеспособных эксплантов березы пушистой *Betula pubescens**

Компонент питательной среды	Итоговая концентрация изучаемого компонента в среде, г/л		Количество инфицированных эксплантов (%)	Число жизнеспособных эксплантов (%)
Фермент (фицин)	0.008		61.1±5.6	100
	0.077		55.6±11.1	100
	0.148		50.0±16.7	100
Микрочастицы хитозана	0.112		77.8±14.7	100
	0.155		61.1±5.6	100
	0.222		50.0±9.6	100
Комплекс фермента (фицина) и микрочастиц хитозана	по ферменту	по хитозану		
	0.008	0.112	61.1±14.7	100
	0.077	0.155	44.5±14.7	100
	0.148	0.222	38.9±5.6	100
Контроль			77.8±5.5	100

Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

6. Шорников Д.Г. Совершенствование технологии размножения редких садовых растений в культуре *in vitro* и оценка их потенциала 126 устойчивости к абиотическим стрессорам. дис. ... канд. с.-х. наук / Д. Г. Шорников. М., 2008, 192 с.

7. Беседина Е.Н., Бунцевич Л.Л. // Научный журнал КубГАУ. 2015. №111. С. 1716–1734.

8. Концевая И.И. Усачева Л.Н. // Вучонья записки Брэсцкага ДУ імя А.С. Пушкіна, Зборнік навуковых прац. 2010. Выпуск 6. С. 65–74.

9. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с.

10. Ghormade V., Deshpande M.V., Paknikar K.M. // *Biotechnology advances*. 2011. V. 29, pp. 792–803.

11. Genady E., Qaid E.A., Fahmy A. // *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.* 2016. V. 5(1), pp. 196–202.

12. Sanmartin M., Jaroszewski L., Raikhel N.V., Rojo E. // *Plant Physiol.* 2005. V. 137. №3, pp. 841–847.

12. Castagnone-Sereno P., Deleury E., Danchin E.G., Per-fus-Barbeoch L., Abad P. // *Genomics*. 2011. V. 97. № 1, pp. 29–36.

13. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. // *The Plant Journal*. 2004. V. 37(3), pp. 370–378.

14. Pechan T., Cohen A., Williams W.P., Luthe D.S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. Vol. 99(20), pp. 13319–13323.

15. Homaei A., Stevanato R., Etemadipour R., Hemmati R. // *J. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017. V. 10, pp. 360–366.

16. Mahmoud S.Y.M., Gad-Rab S.M.F., Hussein N., Shoreit A.A.M. // *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2010. V.5 (3), pp. 198–205.

17. Poltronieri P. // *International Journal of Plant Research*. 2017. V.7 (1), pp. 21–28.

18. Королева В.А., Холявка М.Г., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г. // *Биофармацевтический журнал*. 2018. Т. 10(4). С. 36–40.

19. Garcia-Carreño F.L. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1992. V. 103, pp. 575–578.

20. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584(21), pp. 4419–4425. doi:10.1016/j.febslet.2010.09.049

21. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. *Технология микрклонального размножения растений*. Киев: Наукова думка, 1992, 232 с.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Ольшанникова С. С., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии

Редько Ю. А., студент кафедры биофизики и биотехнологии

Лавлинская М. С., к.х.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Сорокин А. В., аспирант кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Voronezh State University

Olshannikova S. S., Post-graduate student, Department of Biophysics and Biotechnology

Redko Y. A., student, Department of Biophysics and Biotechnology

Lavlinskaya M. S., PhD., Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies

Sorokin A. V., Post-graduate student of the Faculty of Chemistry, Department of Macromolecular Compounds and Colloidal Chemistry, Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies

Панкова С. М., младший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, ассистент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

Pankova S. M., Junior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Assistant of the Department of Normal Physiology, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Холявка М. Г., д.б.н., профессор медико-биологического факультета кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, Orcid ID 0000-0002-1390-4119

Holyavka M. G., PhD., DSci., Professor of the Faculty of Medicine and Biology, Department of Biophysics and Biotechnology, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Physics, Sevastopol State University, Orcid ID 0000-0002-1390-4119

E-mail: holyavka@rambler.ru

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов В. Г., проф., д.б.н., заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета,

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology,

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова»

Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozova

Федорова О. А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

Fedorova O. A., Ph.D., Researcher, Laboratory of PCR Analysis, Research Institute ITLK

Гродецкая Т. А., научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

Grodetskaya T. A., Researcher, PCR Analysis Laboratory, Research Institute ITLK

Евлаков П. М., к.б.н., главный научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

Evlakov P. M., PhD., Chief Researcher, PCR Analysis Laboratory, Research Institute ITLK

THE USE OF FICIN AND CHITOSAN MICROPARTICLES COMPLEXES IN THE TECHNOLOGY OF CLONAL MICROREPRODUCTION OF *BETULA PUBESCENS* FOR REDUCING THE NUMBER OF INFECTED EXPLANTS

S. S. Olshannikova¹, Y. A. Redko¹, M. S. Lavlinskaya^{1,2}, A. V. Sorokin^{1,2}, S. M. Pankova^{1,3}, O. A. Fedorova⁴, T. A. Grodetskaya⁴, P. M. Evlakov⁴, M. G. Holyavka^{1,5*}, V. G. Artyukhov¹

1 - Voronezh State University

2 - Voronezh State University of Engineering Technologies

3 - Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Russian Federation

4 - Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozova, Russian Federation

5 - Sevastopol State University, Sevastopol

Abstract. Maintaining sterile conditions during *in vitro* cultivation is necessary to save their growth and productivity. Antibiotics are actively used as sterilizing agents, however, they can strongly influence the growth and development of plants. The use of protease enzymes helps to reduce the infectious load without affecting the growth processes of plants. The prospects of using the plant enzyme ficin, chitosan (200 kDa) microparticles, and complexes of these microparticles with ficin to reduce the number of infected explants of *Betula pubescens* have been studied. Sterile explants of birch were planted on WPM agar nutrient medium supplemented with microparticles of chitosan, free ficin, and a complex of microparticles and an enzyme in different variants of the experiment. Within 21 days, the number of sterile and viable explants was assessed.

It was found that when creating complexes of ficin with microparticles of chitosan, the proteolytic activity of the biocatalyst was retained by 75 % in comparison with the free enzyme. The activity of free ficin

Ольшанникова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

was 8 % of the initial level (control) after 168 hours of incubation, while the activity of the protease in the complex with chitosan was 21 %, which indicates an increase in the stability of the enzyme in the complex.

The use of immobilized ficin at a concentration of ~ 0.15 g/L in terms of the enzyme and ~ 0.22 g/L in terms of the chitosan content made it possible to increase the number of sterile explants by 50 % relative to the control. Analysis of the effect of chitosan microparticles outside the complex and free ficin on the level of infection made it possible to establish respectively ~ 0.22 and 0.15 g/L as optimal concentrations for *in vitro* sterilization of clones of downy birch. The addition of chitosan microparticles and ficin separately and in the form of their complex to the cultivation medium did not affect the viability of the explants, and in all variants of the experiment it was 100 %. The results obtained allow us to recommend the use of ficin immobilized on microparticles of chitosan as a sterilizing agent for *in vitro* cultivation of *Betula pubescens* clones.

Keywords: ficin, chitosan microparticles, immobilization, complex, explants, sterilization, *Betula pubescens*

REFERENCES

1. Butenko R.G. Biologiya kletok vysshih rastenij *in vitro* i biotekhnologii na ih osnove. M.: FBK-PRESS, 1999. p. 160.
2. Ditchenko T.I., Spiridovich E. V., ZHeldakova R. A. Kul'tura kletok, tkanej i organov rastenij: kurs lekcij. Minsk: BGU, 2007. p.107.
3. Sirotin A.A., Zelenkova V.N., SHkuropat M.N., Koryukova E.A. Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 2016. No. 7-2. pp. 230-232.
4. SHestibratov K.A. Lesohozyajstvennaya informaciya. 2008. No. 3-4. pp. 22-23.
5. Samus' V.A., Semenas S.E., Kuharchik N.V., Zimushko A.A. Plodovodstvo: nauch. Institut plodovodstva NAN Belarusi. Samohvalovich. 2006. Vol.18, ch. 2. pp. 146-155.
6. SHornikov D.G. Sovershenstvovanie tekhnologii razmnozheniya redkih sadovyh rastenij v kul'ture *in vitro* i ocenka ih potentsiala 126 ustojchivosti k abioticheskim stressoram. dis. kand. s.-h. nauk D. G. SHornikov. M., 2008, p. 192.
7. Besedina E.N., Bunceovich L.L. Nauchnyj zhurnal KubGAU. 2015. No. 111. pp. 1716-1734.
8. Koncevaya I.I. Usacheva L.N. Vuchonyya zapiski Bresckaga DU imya A.S. Pushkina, Zbornik navukovyh prac. 2010. Vol. 6. pp. 65-74.
9. Mitrofanova I.V. Somaticheskij embriogenez i organogenez kak osnova biotekhnologii polucheniya i sohraneniya mnogoletnih sadovyh kul'tur. Kiev: Agrarna nauka, 2011. p. 344.
10. Ghormade V., Deshpande M.V., Paknikar K.M. Biotechnology advances. 2011. Vol. 29. pp. 792-803.
11. Genady E., Qaid E.A., Fahmy A. Int. J. Pharm. Res. Allied Sci. 2016. Vol. 5(1). pp. 196-202.
12. Sanmartin M., Jaroszewski L., Raikhel N.V., Rojo E. Plant Physiol. 2005. Vol. 137. No. 3. pp. 841-847.
12. Castagnone-Sereno P., Deleury E., Danchin E.G., Per-fus-Barbeoch L., Abad P. Genomics. 2011. Vol. 97. No. 1. pp. 29-36.
13. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. The Plant Journal. 2004. Vol. 37(3). pp. 370-378.
14. Pechan T., Cohen A., Williams W.P., Luthe D.S. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. Vol. 99(20). pp. 13319-13323.
15. Homaei A., Stevanato R., Etemadipour R., Hemmati R. J. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2017. Vol. 10. pp. 360-366.
16. Mahmoud S.Y.M., Gad-Rab S.M.F., Hussein N., Shoreit A.A.M. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 2010. Vol. 5 (3), pp. 198-205.
17. Poltronieri P. International Journal of Plant Research. 2017. Vol. 7 (1). pp. 21-28.
18. Koroleva V.A., Holyavka M.G., Ol'shannikova S.S., Artyukhov V.G. Biofarmaceuticheskij zhurnal. 2018. Vol. 10(4). pp. 36-40.
19. Garcia-Carreño F.L. Comp. Biochem. Physiol. 1992. Vol. 103, pp. 575-578.
20. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. FEBS Lett. 2010. Vol. 584(21), pp. 4419-4425. doi:10.1016/j.febslet.2010.09.049
21. Kalinin F.L., Kushnir G.P., Sarnackaya V.V. Tekhnologiya mikroklonal'nogo razmnozheniya rastenij. Kiev: Naukova dumka, 1992. p. 232.