

## ВЛИЯНИЕ БРОМЕЛИНА НА ИНФИЦИРОВАННОСТЬ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ *BETULA PENDULA* ROTH. НА СТАДИИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

С. М. Панкова<sup>1,2</sup>, О. А. Федорова<sup>3</sup>, Т. А. Гродецкая<sup>3</sup>, П. М. Евлаков<sup>3</sup>, М. Г. Холявка<sup>1,4\*</sup>,  
М. А. Наквасина<sup>1</sup>, О. В. Путинцева<sup>1</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

**Аннотация.** Клональное микроразмножение является перспективным методом для получения растений, устойчивых к вирусным, бактериальным, грибковым заражениям. Данный метод включает пять этапов, в которых достаточно сложной и одновременно значимой является стадия введения эксплантов в культуру *in vitro*, так как от отбора растительного материала зависит успешность получения стерильной культуры в состоянии роста. Для сохранения роста и развития эксплантов необходимо поддерживать стерильные условия при культивировании. В лабораторной практике для поддержания стерильных условий повсеместно применяются антибиотики, но они могут оказывать негативное влияние на рост и развитие растений. Для устранения такого эффекта можно использовать ферменты – протеазы, что будет способствовать снижению инфекционной нагрузки без влияния на ростовые процессы растений. Для снижения количества инфицированных эксплантов березы повислой *Betula pendula* Roth. сорт Углическая-1 (УГ-1) нами изучены перспективы использования цистеиновой протеазы бромелина, выделенного из *Ananas comosus*. В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали апикальные и пазушные меристемы молодых побегов березы повислой *Betula pendula*. Стерильные побеги разрезали в асептических условиях и высаживали на агаризованную питательную среду WPM с добавлением растворов бромелина в различных концентрациях. В течение 21 суток оценивали количество стерильных и жизнеспособных эксплантов.

Выявлено снижение количества инфицированных побегов в 1.5-2.4 раза при добавлении в питательную среду бромелина в концентрациях 78-148 мкг/л. При этом бромелин более эффективен при грибных поражениях эксплантов, чем при их заражении бактериями. Уровень жизнеспособности побегов березы повислой *Betula pendula* во всех вариантах эксперимента составлял 100 %, что указывает на отсутствие токсического действия энзима на растения. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование бромелина в качестве стерилизующего агента при культивировании *in vitro* клонов березы повислой.

**Ключевые слова:** микрклональное размножение, эксплант, бромелин

В настоящее время интенсивно развивается направление лесной биотехнологии, одной из главных задач которой является увеличение продуктивности лесов. Основным эффективным способом повышения плодovitости зеленых насаждений является создание посадок с быстрорастущими и устойчивыми к различного рода болезням видами древесных пород, что может

помочь в сокращении времени выращивания лесов и увеличении выхода зеленой биомассы с единицы площади. Для решения этой задачи используется метод культуры изолированных органов и тканей - клональное микроразмножение растений [1]. Главным достоинством данного способа служит перспектива получения генетически однородных пород деревьев, которые будут устойчивыми к бактериальным, вирусным заболеваниям и возможность круглогодичного продуцирования посадочного материала.

© Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Наквасина М. А., Путинцева О. В., Артюхов В. Г., 2023

Метод клонального микроразмножения включает несколько этапов: 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 [2, 3]. Применение данного способа для промышленного разведения форм многолетних древесных растений позволяет повысить качественный состав лесопарка благодаря получению многочисленных клонов растений, устойчивых к заболеваниям и стрессовым факторам, способствует ускорению воспроизводства древесных ресурсов [4].

Значимым этапом в методе клонального микроразмножения является введение эксплантов в культуру *in vitro*, так как от отбора растительного материала зависит успешность получения стерильной культуры в состоянии роста. На данном этапе, который длится около месяца, из исходных эксплантов получают стерильные микропобеги, которые затем переводятся на стадию мультипликации. Наличие контаминирующих микроорганизмов в значительной степени определяется качеством процесса стерилизации [5]. Эпифитная и эндофитная микрофлора, находящиеся на поверхности и внутри растения, могут расти и развиваться на питательных средах, на которых культивируются растения *in vitro*, вызывая в частых случаях гибель микропобегов. Поэтому важно подобрать стерилизующие агенты и их концентрации, которые не повреждали бы сами растения и обеспечивали их максимальную стерильность. Одним из возможных способов получения стерильных сред является добавление антибиотиков. Однако, наряду с бактерицидным действием, они могут ингибировать рост и развитие эксплантов [6-8]. В связи с этим в настоящее время возрастает роль ферментов в качестве агентов в борьбе с фитопатогенами, в том числе, бактериального и грибкового происхождения [9, 10]. Например, для борьбы с облигатными паразитами растений рода *Meloidogyne* используются протеазы (цистеиновые, металлопротеазы, сериновые) [11, 12].

Бромелин (КФ 3.4.22.4) – это сульфгидрильная растительная протеаза, обнаруженная у представителей семейства *Bromeliaceae*. Наиболее высокую каталитическую активность фермент проявляет при pH 6-8, изоэлектрическая точка составляет 9.5 единиц pH. Температурный оптимум – 62° С [13-16]. Молекула фермента состоит из двух доменов, разделенных бороздкой, содержащей активный центр из Cys26 и His159 и два

дисульфидных мостика (Cys23-Cys63 и Cys57-Cys96) [17, 18]. Бромелин обладает противогрибковыми свойствами, которые могут быть использованы для борьбы с фитопатогенами [19].

Таким образом, для сохранения генофонда и разведения древесных пород целесообразно использовать возможности современной биотехнологии, в частности метод микроклонального размножения растений. Однако требуется совершенствование технологии микроклонирования с применением новых перспективных стерилизующих агентов, таких как цистеиновые протеазы, в частности бромелин. Поэтому целью работы явилось изучение влияния бромелина на инфицированность и жизнеспособность эксплантов березы повислой *Betula pendula* УГ-1 на стадии введения в культуру *in vitro*.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

**Метод определения количества инфицированных эксплантов березы повислой.** В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали апикальные и пазушные меристемы молодых побегов березы повислой *Betula pendula* Roth. сорт Углянческая-1 (№ УГ-1). Стерилизацию побегов проводили согласно общепринятой методике [20]. 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, дополненную 0.3 мг/л 6-БАП (6-бензиламинопурин), 0.3 мг/л ГК (гибберелловая кислота), а также исследуемыми растворами бромелина из *Ananas comosus* (Sigma, США) в различных концентрациях. На каждый вариант опыта было взято по 10 эксплантов растений, повторность 3-х кратная (30 растений на каждый вариант). Для контрольной группы эксплантов использовали среду без добавления испытуемых растворов бромелина. Условия климатического режима: 16-ти часовой фотопериод при освещенности 2-3 клк, температуре 24-26 °С. На протяжении 21 суток фиксировали число стерильных эксплантов, а также число эксплантов, сформировавших основной побег (жизнеспособных эксплантов).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время для проведения микроклонального размножения приобретают значимость плантационные культуры березы с коротким периодом ротации. Нами была проведена серия экспериментов по включению в состав питательной среды фермента бромелина для снижения анти-

Количество (в %) инфицированных и жизнеспособных эксплантов березы повислой *Betula pendula* УГ-1

Наименование раствора	% инфицированных эксплантов суммарно с грибным и бактериальным поражениями	% эксплантов с грибным поражением	% эксплантов с бактериальным поражением	% жизнеспособных эксплантов
Бромелин, 78 мкг/л	23.3±3.3	16.7±6.7	6.7±3.3	100
Бромелин, 148 мкг/л	36.7±3.3	23.3±3.3	13.3±6.7	100
Контроль без бромелина	56.6±12.0	43.3±12.0	13.6±6.7	100

бактериальной и противогрибковой зараженности эксплантов. Результаты проведенного исследования показали, что при добавлении в состав питательной среды фермента на стадии создания асептической культуры уменьшается количество инфицированных эксплантов березы повислой УГ-1. В присутствии бромелина в концентрации 78-148 мкг/л в питательной среде число инфицированных побегов с грибным заражением варьировало от 16.7 до 23.3% (контроль без бромелина – 43.3 %) и с бактериальным заражением – от 6.7 до 13.3 % (контроль 13.6 %). Суммарно с учетом обоих типов заражений количество инфицированных растений колебалось от 23.3 до 36.7 % (контроль – 56.5 %) в зависимости от концентрации бромелина (табл. 1). Из этих данных следует, что в отличие от фицина [21] и папаина [22], которые активно разрушают бактериальные пленки, бромелин более эффективен при грибных поражениях эксплантов, чем при их инфицировании бактериями. Добавление энзима в состав питательной среды не сказалось на уровне жизнеспособности эксплантов, что доказывает отсутствие его токсического действия на растения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы выявлено, что при добавлении в питательную среду бромелина в концентрации 78 мкг/л происходит снижение количества инфицированных эксплантов в 2.6 раза при грибном заражении, в 2 раза при бактериальных инфекциях и в 2.4 раза, если учитывать суммарно оба типа инфицирования. При содержании бромелина в среде 148 мкг/л выявлено уменьшение числа инфицированных эксплантов с грибным заражением в 1.8 раза, с обоими типами инфицирования – в 1.5 раза. Таким образом, нами показана возможность применения бромелина в качестве стерилизующего агента для эксплантов березы повислой УГ-1 на стадии введения в культуру *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ханов Н.А. // Лесохозяйственная информация. 2016. № 1. С. 60-64.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999, 160 с.
3. Дитченко Т.И., Спиридович Е. В., Желдакова Р. А. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. Минск: БГУ, 2007, 107 с.
4. Сиволапов А.И., Табацкая Т.М., Сиволапов В.А. // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. 2007. № 5. С. 113-115.
5. Сиротин А.А., Зеленкова В.Н., Шкуропат М.Н., Кортюкова Е.А. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 7–2. С. 230–232
6. Беседина Е.Н., Бунцевич Л.Л. // Научный журнал КубГАУ. 2015. №111. С. 1716–1734.
7. Концевая И.И. Усачева Л.Н. // Вучонья записки Брэсцкага ДУ імя А.С. Пушкіна, Зборнік навуковых прац. 2010. Выпуск 6. С. 65–74.
8. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с
9. Genady E., Qaid E.A., Fahmy A. // Int. J. Pharm. Res. Allied Sci. 2016. V. 5(1), pp. 196–202
10. 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. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2021. № 4. С. 38-44.
11. 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. Antão C.M., Malcata F.X. // Plant Physiol. Biochem. PPV. 2005. Vol. 43, pp. 637–650.
14. Arshad Z.I.M., Amid A, Yusof F., Jaswir I., Ahmad K., Loke S.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98, pp. 7283–7297.

15. Novaes L.C.d.L., Jozala A.F., Lopes A.M., Santos-Ebinuma V.C., Mazzola P.G., Junior A.P., // *Biotechnology Progress*. 2016. Vol 32, pp.5-13.
16. Sarkar S., Ahmed M., Mozumder N.H.M.R., Saeid A. // *Process Engineering Journal*. 2017. Vol. 1, pp. 52-58.
17. Ataide J.A., Gérios E.F., Mazzola P.G. // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2018. Vol. 254. pp. 48–55. doi:10.1016/j.cis.2018.03.006
18. Холявка М.Г., Панкова С.М., Артюхов В.Г. // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020. № 4. С. 91-95.
19. López-García B., Hernández M., Segundo B.S. // *Letters in Applied Microbiology*, 2012. Vol. 55, pp. 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03258.x>
20. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. *Технология микрклонального размножения растений*. Киев: Наукова думка, 1992, 232 с
21. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiriev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Baltina T.V., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Pankova S.M., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized ficin // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 164. P. 4205-4217.
22. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19. № 4. P. 197.

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»*

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

*Наквасина М. А., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии*  
E-mail: [nakvasina\\_ma@mail.ru](mailto:nakvasina_ma@mail.ru)

*Путинцева О.В., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии*  
E-mail: [o.v.putintseva@gmail.com](mailto:o.v.putintseva@gmail.com)

*Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, Orcid ID 0000-0002-1390-4119*  
E-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

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

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова»*  
*Федорова О. А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК*

*Voronezh State University*

*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*

*Nakvasina M. A, DSci., Professor of Biophysics and biotechnology department*  
E-mail: [nakvasina\\_ma@mail.ru](mailto:nakvasina_ma@mail.ru)

*Putintseva O. V., DSci., Professor of Biophysics and biotechnology department*  
E-mail: [o.v.putintseva@gmail.com](mailto:o.v.putintseva@gmail.com)

*Holyavka M. G., DSci., Professor of Biophysics and biotechnology department, Professor of Physics Department of Physics, Sevastopol State University, Orcid ID 0000-0002-1390-4119*  
E-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

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

*Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozova*

*Fedorova O. A., PhD., Researcher, Laboratory of PCR Analysis, Research Institute ITLK*

Панкова С. М., Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Холявка М. Г., Наквасина М. А.,  
Путинцева О. В., Артюхов В. Г.

Гродецкая Т. А., научный сотрудник лабора-  
тории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

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

Евлаков П. М., к.б.н., главный научный со-  
трудник лаборатории анализа ПЦР НИИ ИТЛК

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

## INFLUENCE OF BROMELAIN ON THE INFECTION AND VIABILITY OF *BETULA PENDULA* ROTH. EXPLANTS AT THE STAGE OF INTRODUCTION INTO CULTURE *IN VITRO*

S. M. Pankova<sup>1,2</sup>, O. A. Fedorova<sup>3</sup>, T. A. Grodetskaya<sup>3</sup>, P. M. Evlakov<sup>3</sup>,  
M. G. Holyavka<sup>1,4\*</sup>, M. A. Nakvasina<sup>1</sup>, O. V. Putintseva<sup>1</sup>, V. G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University

<sup>2</sup>Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

<sup>3</sup>Voronezh State Forestry University named after G.F. Morozova

<sup>4</sup>Sevastopol State University

**Abstract.** Clonal micropropagation is a promising method for creating of plant which are resistant to viral, bacterial, and fungal infections. This method includes five stages, in which the stage of introducing explants into *in vitro* culture is rather complicated and at the same time significant, since the success of obtaining a sterile culture in a state of growth depends on the selection of plant material. To preserve the growth and development of explants, it is necessary to maintain sterile conditions during cultivation. In laboratory practice, antibiotics are commonly used to maintain sterile conditions, but they can have a negative effect on plant growth and development. To eliminate this effect, protease enzymes can be used, which will help reduce the infectious load without affecting the growth processes of plants. To reduce the number of infected explants of *Betula pendula* Roth. grade Uglyanchesкая-1 (UG-1), we studied the prospects for using the cysteine protease bromelain isolated from *Ananas comosus*. Apical and axillary meristems of young shoots of *Betula pendula* were used as explants for introduction into *in vitro* culture. Sterile shoots were cut under aseptic conditions and planted on WPM agar nutrient medium supplemented with bromelain solutions at various concentrations. Within 21 days, the number of sterile and viable explants was estimated. A decrease in the number of infected shoots by 1.5-2.4 times was revealed when bromelain was added to the nutrient medium at concentrations of 78-148 µg/l. At the same time, bromelain is more effective against fungal infections of explants than when they are infected with bacteria. The level of viability of shoots of *Betula pendula* in all variants of the experiment was 100%, which indicates the absence of the toxic effect of the enzyme on plants. The results obtained allow us to recommend the use of bromelain as a sterilizing agent in the *in vitro* cultivation of silver birch clones.

**Keywords:** micropropagation, explant, bromelain

### REFERENCES

1. Khanov N.A. J. of Forestry information, 2016, No. 1, pp. 60-64.
2. Butenko R.G. Biologiya kletok vysshih rastenij *in vitro* i biotekhnologii na ih osnove. M.: FBKPRESS, 1999, p. 160.
3. Ditchenko T.I., Spiridovich E. V., ZHeldakova R. A. Kul'tura kletok, tkanej i organov rastenij: kurs lekcij. Minsk: BGU, 2007, p.107.
4. Sivolapov A.I., Tabatskaya T.M., Sivolapov V.A. J. of Bulletin of the Moscow State Forest University - Forest Bulletin, 2007, No. 5, pp. 113-115.
5. Sirotin A.A., Zelenkova V.N., Shkuropat M.N., Kortuykova E.A. Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy, 2016, No. 7-2, pp. 230-232.
6. Besedina E.N., Bunceovich L.L. Nauchnyj zhurnal KubGAU, 2015, No. 111, pp. 1716-1734.
7. Koncevaya I.I. Usacheva L.N. Vuchonyya zapiski Bresckaga DU imya A.S. Pushkina, Zbornik navukovyh prac, 2010, Vol. 6, pp. 65-74.
8. Mitrofanova I.V. Somaticheskij embriogenez i organogenez kak osnova biotekhnologii polucheniya i sohraneniya mnogoletnih sadovyh kul'tur. Kiev: Agrarna nauka, 2011, p. 344.

9. Genady E., Qaid E.A., Fahmy A. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.* 2016. Vol. 5(1). pp. 196-202.
10. Olshannikova S.S., Redko Yu.A., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Pankova S.M., Fedorova O.A., Grodetskaya T.A., Evlakov P.M., Kholyavka M. G., Artyukhov V.G. *J. of Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2021, No. 4, pp. 38-44.
11. 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. Antão C.M., Malcata F.X., *Plant Physiol. Biochem. PPB.* 2005, Vol. 43, pp. 637-650. DOI:10.1016/j.plaphy.2005.05.001.
14. Arshad Z.I.M., Amid A, Yusof F., Jaswir I., Ahmad K., Loke S.P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, Vol. 98, pp. 7283-7297. DOI:10.1007/s00253-014-5889-y.
15. Novaes L.C.d.L., Jozala A.F., Lopes A.M., Santos-Ebinuma V.C., Mazzola P.G., Junior A.P., *BiotechnologyProgress*, 2016, Vol 32, pp.5-13. DOI: 10.1002/btpr.2190.
16. Sarkar S., Ahmed M., Mozumder N.H.M.R., Saeid A., *Process Engineering Journal*, 2017, Vol. 1, pp. 52-58. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/321034752>.
17. Ataide J.A., Gérios E.F., Mazzola P.G., *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018, Vol. 254, pp. 48-55. DOI:10.1016/j.cis.2018.03.006.
18. Holyavka M.G., Pankova S.M., Artyukhov V.G. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2020, No. 4, pp. 91-95.
19. López-García B., Hernández M., Segundo B.S. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, Vol. 55, pp. 62-67. DOI:10.1111/j.1472-765X.2012.03258.x
20. Kalinin F.L., Kushnir G.P., Sarnackaya V.V. *Tekhnologiya mikroklonal'nogo razmnozheniya rastenij.* Kiev: Naukova dumka, 1992. p. 232.
21. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiryev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Baltina T.V., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Pankova S.M., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized ficin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, Vol. 164, pp. 4205-4217.
22. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain, *Marine Drugs*. 2021, Vol. 19, № 4, pp. 197.