

УДК 581.143.6:57.

## Потемнение растительных тканей при культивировании *in vitro* и способы его предотвращения

© 2020 Э. А. БАЙМУХАМЕТОВА<sup>1,\*</sup>, Б. Р. КУЛУЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054

\*e-mail: elvina.baimuhametova@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.08.2019 г.

После доработки 07.11.2019 г.

Принята к публикации 26.03.2020 г.

При культивировании растительных тканей *in vitro* часто возникает проблема их потемнения с последующим некрозом, одной из причин которого является окисление выделяющихся в питательную среду фенольных соединений – продуктов вторичного метаболизма, продуцирующихся в ответ на поранение. Этот процесс является одной из главных причин снижения эффективности каллусообразования, соматического эмбриогенеза, регенерации и генетической трансформации растений в условиях *in vitro*, более того часто приводит к гибели культуры. Для решения современных задач геномной и клеточной инженерии широкого круга видов растений необходима разработка способов предотвращения или уменьшения негативного влияния потемнения, обусловленного окислительными превращениями фенольных соединений в токсичные для клеток хиноны в культурах *in vitro*. Данный обзор посвящен описанию основных существующих на сегодняшний день методов предотвращения потемнения культур растительных тканей, вызванных окислением фенольных соединений. Для этих целей в биотехнологии растений чаще всего используют различные химические вещества, обладающие антиоксидантными и адсорбирующими свойствами, которые добавляют в питательные среды, однако универсальных подходов для решения этой проблемы нет. Выбор способа борьбы с потемнением зависит, прежде всего, от видовой и сортовой принадлежности растения, однако некоторые средства, такие как аскорбиновая кислота, активированный уголь, нитрат серебра можно отнести к универсальным и довольно эффективным средствам для борьбы с потемнением эксплантов *in vitro*.

**Ключевые слова:** фенольные соединения, окислительные превращения, потемнение культуры тканей, полифенолоксидазы, *in vitro*, микроклональное размножение растений

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-2-26-42

Одной из часто возникающих проблем при введении растительных тканей и клеток в культуру *in vitro* является потемнение (покоричневение) тканей и питательной среды, которое оказывает крайне негативное влияние на ход эксперимента, часто приводя к гибели растений. Такое потемнение связывают с окислением фенольных соединений, которые у растений представлены большим разнообразием [59, 66, 77, 83]. Данное явление характерно в несколько большей степени для растений тропических и субтропических климатических зон.

Фенольные соединения растений являются органическими компонентами, содержащими в своей структуре ароматическое кольцо и один или более гидроксильных радикалов [18]. На сегодняшний день известно более 8000 фенольных соединений, структура которых варьирует от простых молекул, таких как фенольные кислоты, до высокополимерных соединений, например, танинов [19, 20] (Табл 1). Являясь продуктами вторичного метаболизма, они играют важную физиологическую и структурную роль в процессах роста и развития растений, обеспечивают защиту

Список сокращений: АИР – 2-аминоиндан-2-фосфоновая кислота, 2,4-Д – 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота, ПВП – поливинилпирролидон, ПФО – полифенолоксидазы, ФАЛ – L-фенилаланин-аммиак-лиаза.

**Разнообразие растительных фенольных соединений**  
**Plant phenolic compounds diversity**

Структура	Представители
Фенольные соединения, содержащие одно ароматическое кольцо	
$C_6$ – ряд	Простые фенолы, бензохиноны
$C_6 - C_1$ – ряд	Фенольные кислоты
$C_6 - C_2$ – ряд	Ацетофеноны, фенолуксусные кислоты
$C_6 - C_3$ – ряд	Оксикоричные кислоты, кумарины
$C_6 - C_4$ – ряд	Нафтохиноны
Фенольные соединения, содержащие два ароматических кольца	
$C_6 - C_1 - C_6$ – ряд	Бензофеноны, ксантоны
$C_6 - C_2 - C_6$ – ряд	Стильбены, антрахиноны
$C_6 - C_3 - C_6$ – ряд	Флавоноиды
Полимерные фенольные соединения	
$(C_6 - C_3)_n$	Лигнины
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Негидролизуемые танины
	Гидролизуемые танины
	Меланины

растений от патогенов и вредителей, участвуют в регуляции окислительно-восстановительных реакций, в защите растений от избыточной солнечной радиации. Кроме того, они являются аттрактантами и репеллентами для насекомых, участвуют в процессах дыхания [2]. Важную роль фенольные соединения играют в защите клеточных компонентов от активных форм кислорода, что проявляется благодаря их способности связывать свободные радикалы, а также образовывать хелатные комплексы с атомами металлов [30, 74]. Их антиоксидантные свойства в основном зависят от количества и взаимного расположения гидроксильных и карбоксильных функциональных групп в структуре молекулы.

Значимость данных компонентов в процессе жизнедеятельности растений подтверждается тем фактом, что около 20% всего ассимилированного растением углерода поступает в шикиматный метаболический путь биосинтеза фенольных соединений [75].

Несмотря на разнообразие жизненно важных функций фенольных соединений в растительных клетках их окисление, часто сопровождающее процессы культивирования тканей *in vitro*, приводит к резкому угнетению роста клеток, снижению эффективности генетической трансформации, а также к сокращению процента регенерировавших побегов и корней. Кроме того, усиленное образование полимерных фенольных соединений в каллусах может также приводить к снижению содержания в клетках каллуса хлорофилла и каротиноидов [33, 51]. Также в темне-

ющих каллусах наблюдаются изменения в соотношении насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Поэтому одной из актуальных задач современной биотехнологии растений является поиск эффективных методов снижения негативного влияния окисленных фенольных соединений при *in vitro* культивировании растений. Исходя из этого, основной целью данной обзорной статьи является описание существующих на сегодняшний день методов предотвращения потемнения культур растительных тканей, вызванных окислением этих фенольных соединений.

Большинство растительных фенольных соединений являются производными транс-коричной кислоты, которая образуется в результате реакции дезаминирования аминокислоты L-фенилаланина (рис. 1) – продукта шикиматного метаболического пути, ферментом L-фенилаланин-аммиак-лиазой (ФАЛ, КФ 4.3.1.24). Данная реакция является связующей между основным и вторичным метаболизмом. Установлено, что активность ФАЛ обычно возрастает в процессе окисления фенольных соединений [32, 47]. Поэтому методы, применяемые для снижения степени потемнения эксплантов, часто основаны именно на ингибировании активности ФАЛ [51, 84].

Результатом воздействия различных стрессовых факторов на растительные ткани является активация фермента ФАЛ, катализирующего синтез фенольных соединений, которые затем окисляются под действием медьсодержащих ферментов – полифенолоксидаз ПФО (о-дифенолоксидаза КФ 1.10.3.1, тирозиназа КФ 1.14.18.1, лакказа

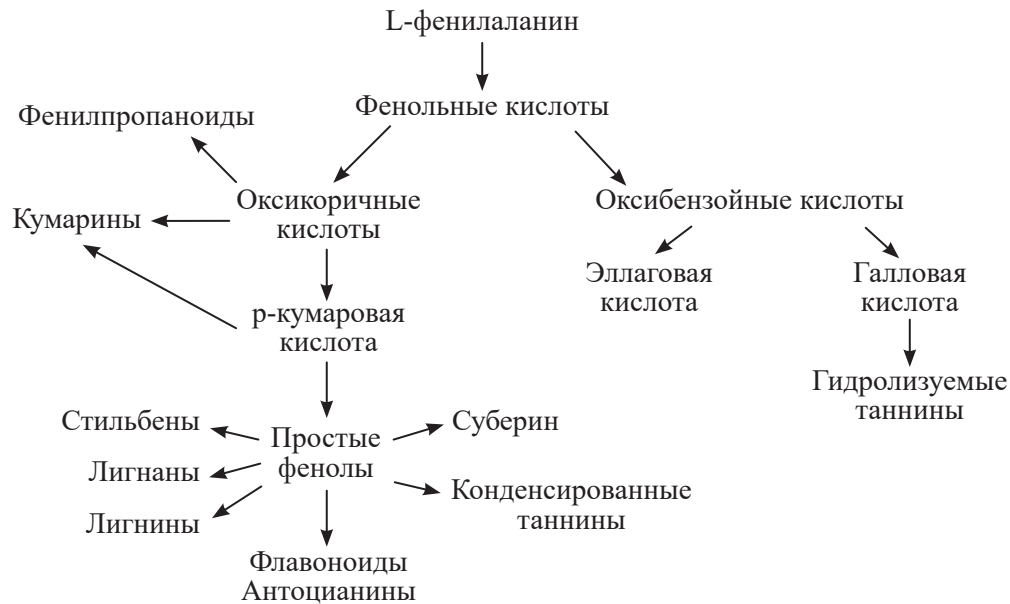


Рис. 1. Упрощенная схема биосинтеза фенольных соединений.

Fig. 1. Simplified scheme of phenolic compounds biosynthesis.

КФ 1.10.3.2) и пероксидаз (КФ 1.11.1.7) до высокорективных токсичных для растения соединений [8, 29].

Процесс потемнения тканей условно можно разделить на три этапа: ферментативное гидроксилирование, ферментативное окисление и, наконец, полимеризация [94]. Первый этап происходит под контролем тирозиназ и лакказ – ферментов, катализирующих реакцию гидроксилирования монофенолов с образованием дифенолов. Образовавшиеся дифенолы далее подвергаются окислению с помощью медьсодержащего фермента о-дифенолоксидазы. Локализованный преимущественно в тилакоидах хлоропластов, пероксисомах и митохондриях, а также в цитоплазме стареющих тканей, этот фермент в результате повреждения мембран переходит в активную форму, способную окислять высвобождающиеся фенольные соединения [97]. О-дифенолоксидазы являются основными ферментами, в большей степени влияющими на окисление фенольных соединений с образованием полимеров, имеющих темный цвет. Небольшой вклад в процесс окисления вносят также пероксидазы, которые являются первой линией защиты растений при воздействии различных загрязнений, повреждений, инфекций и т.п. Наряду с ПФО окислять фенольные компоненты сначала до хинонов, затем до конденсированных танинов, и, в конечном итоге, до окрашенных полимерных фенольных соединений способны пероксидазы, однако их вклад в окислительное потемнение растительных тканей менее значителен, чем у ПФО [92].

В результате реакции окисления фенольных соединений образуются о-хиноны – высокорективные химические соединения, способные взаимодействовать как между собой, так и с другими соединениями клетки, такими как аминокислоты или белки, образуя высокомолекулярные соединения – меланины, окрашивающие поврежденные поверхности чаще всего в коричневый (рис. 2), но также

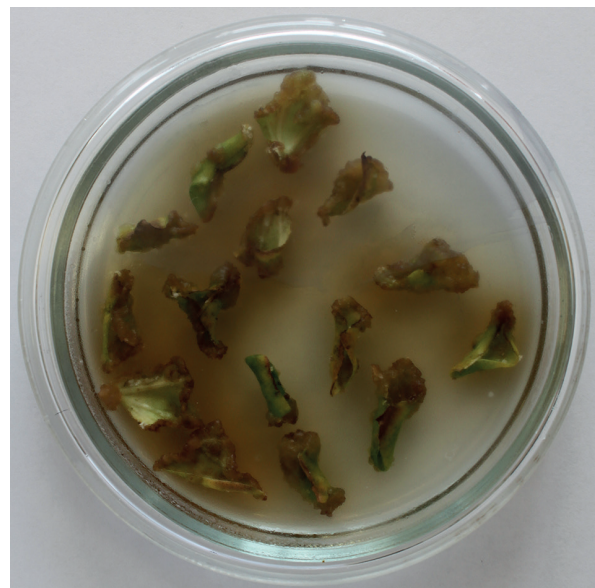


Рис. 2. Потемнение эксплантов хлопчатника *Gossypium hirsutum* сорта Юлдуз на питательной среде МС (фото автора).

Fig. 2. *Gossypium hirsutum* var. Yulduz explant browning on MS medium (photo made by the author).

и в красный, черный цвета [82, 93]. Данный этап происходит без участия каких-либо ферментов.

Кроме того, вследствие действия указанных выше ферментов в клетках происходят изменения в структуре белков, их аминокислотном составе, в степени накопления крахмала в клетках и т.д., что в конечном итоге приводит к гибели клеток и растительных тканей.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что снизить степень потемнения культуры тканей при *in vitro* манипуляциях можно следующими способами:

- воздействуя на активность ферментов, участвующих в синтезе и окислении фенольных соединений;
- ингибируя экспрессию генов этих ферментов;
- воздействуя на субстраты этих ферментов;
- воздействуя на продукты реакции – хиноны.

#### **Факторы, влияющие на биосинтез и окисление фенольных компонентов**

Для решения проблем с окислением фенольных соединений в культурах *in vitro* необходимо знать, при каких условиях происходит активация биосинтеза или накопления этих соединений. Одной из основных причин повышения уровня содержания фенольных соединений является воздействие стрессовых факторов среды. Растениям постоянно приходится сталкиваться с отрицательным воздействием патогенных микроорганизмов, насекомых, многочисленных абиотических факторов среды. В ответ на повреждения, вызываемые как биотическим, так и абиотическим воздействием, в клетках происходит активация множества сигнальных систем, направленных на нейтрализацию их негативного воздействия. Огромную роль в данном процессе играют фенольные соединения.

Активация синтеза и накопления фенольных соединений происходит под действием различных климатических факторов и стрессоров: низкие температуры, недостаток питательных веществ, различные поранения и др. [10, 23]. Так, повреждение эксплантов латука *Lactuca sativa* L. приводит к появлению в клетках специфического сигнала, индуцирующего метаболический путь, ответственный за повышенную продукцию фенольных соединений, таких как хлорогеновая, изохлорогеновая, а также цикориевая и кафтаровая кислоты [42]. Чрезмерная аккумуляция данных фенольных кислот и их последующее окисление, в конечном счете, приводит к потемнению эксплантов и некрозу растительных тканей [88]. Аналогичный процесс наблюдается и в клетках винограда *Vitis vinifera* L., где в ответ на грибо-

вую инфекцию *Botrytis cinerea* Pers. в ягодах происходит синтез полифенола ресвератрола [5].

Большое влияние оказывает также фактор освещенности. Под воздействием высокоинтенсивного освещения в клетках происходит интенсификация продукции фенольных соединений. Эксперименты, проведенные с хлоропластами, выделенными из листьев ивы *Salix* L., показали, что синтез фенолкарбоновых кислот и флавоноидов в них резко возрастает на свету [43]. Похожие результаты были получены в опытах на тепличных томатах, в которых было установлено, что содержание фенольных соединений в летних плодах гораздо выше, чем в весенних [11, 89]. Известно также, что под воздействием высокоинтенсивного освещения наблюдается активация синтеза фенольных соединений антоцианов, формирующих окраску ягод винограда [12].

Низкие температуры способны оказывать как стимулирующий, так и ингибирующий эффект на биосинтез фенольных компонентов. Например, в рапсе *Brassica napus* L. при низких положительных температурах происходит активация фенилпропаноидного биосинтетического пути метаболизма, в то время как в клетках баклажана *Solanum melongena* L., наблюдается обратный эффект – происходит замедление синтеза антоцианов [11].

Установлено, что большое влияние на степень синтеза и накопления фенольных соединений оказывают атомы тяжелых металлов. Например, никель и алюминий стимулируют продукцию фенольных соединений в клетках пшеницы *Triticum aestivum* L. и кукурузы *Zea mays* L. соответственно [22, 96]. Накопление ионов  $\text{Cr}^{4+}$  в клетках зверобоя *Hypericum perforatum* L. отражается в повышении синтеза гиперидина на 25-28%, а под воздействием ионов кадмия в клетках *L. sativa* происходит активация фермента ФАЛ, участвующего в процессе биосинтеза фенольных соединений, что отражается в повышении содержания антоцианов [14, 47].

На степень продукции фенольных соединений также влияют вид, физиологический возраст, размеры растения, а также сезон года, в который был получен эксплант или каллус [15, 48, 76]. Так, древесные растения склонны к повышенной продукции фенольных соединений, а именно танинов, по сравнению с травянистыми и кустарниковыми формами. Кроме того, чем старше растение, из которого были получены каллусы, тем активнее в нем синтезируются и окисляются фенольные соединения. Например, клетки старых побегов фисташки *Pistacia vera* L. аккумулировали большие количества фенольных соединений, нежели чем молодые клетки [52]. Большое значение

имеет тип экспланта. Так, было обнаружено, что экспланты оливы *Olea europaea* L., взятые с кончиков побегов без узлов, темнеют значительно, чем узловые экспланты [76]. Важную роль также играет место выращивания растений. Например, растения тропических зон выращивания склонны к более активному синтезу фенольных соединений. Такой же тенденцией обладают и высотные растения [27]. Установлено, что синтез данных веществ коррелирует с составом почв, интенсивностью солнечного света, режимом предпосевных обработок и орошения [41, 71, 95].

**Методы борьбы с потемнением культур растительных тканей *in vitro***

Основным методом снижения степени окисления фенольных соединений является метод модификации питательных сред путем добавления в них различных химических соединений, которые условно можно разделить на две группы: 1) антиоксиданты, препятствующие окислению фенольных компонентов; 2) адсорбенты, связывающие фенольные соединения, делая их, таким образом, менее токсичными (табл. 2) [73]. В свою

Таблица 2

**Эксперименты по предотвращению потемнения тканей различных растительных культур**  
Experiments to prevent darkening of tissues of various plant crops

Культура	Соединение	Результаты	Ссылка
<i>Aristolochia indica</i>	Активированный уголь 30 мг/л	Сокращение потемнения эксплантов	[83]
<i>Artemisia annua</i>	Ингибитор ПФО АИР 1, 10, 100 мкМ	Прекращение потемнения эксплантов, ускорение роста на цитокинин-содержащих средах	[40]
<i>Bambusa oldhamii</i>	Аскорбиновая кислота, цистеин, койевая кислота, тиомочевина (0,3; 1, 3, 10, и 30 мМ), ПВП (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1, 3 и 10 мМ)	ПВП не повлиял на степень потемнения эксплантов	[35]
<i>Betula pubescens</i>	Ингибитор ПФО АИР 0, 5, 15, 30 мкМ	Подавление синтеза фенольных кислот	[66]
<i>Brachylaena huillensis</i>	0-250 мг/л аскорбиновой кислоты	200 мг/л и 250 мг/л аскорбиновая кислота снижала интенсивность потемнения эксплантов на 77% и 75% соответственно	[62]
<i>Brassica oleracea</i>	Активированный уголь (0, 1, 2, 3 г/л), ПВП (1, 2, 3, 4 г/л), аскорбиновая кислота (200, 400, 600, 800 мг/л), сахароза (10, 20, 30, 40 г/л)	Эффективным оказалось использование 200 г/л сахарозы и 200 г/л аскорбиновой кислоты, которые подавляли коричневение эксплантов растений	[56]
<i>Camellia sinensis</i>	Ингибитор ФАЛ АИР	2 мкл АИР оказывали ингибирующий эффект, подавляя активность ФАЛ и препятствуя коричневению эксплантов	[7]
	Были исследованы девять вариантов сред с разными концентрациями сахарозы (5 г/л, 30 г/л) и разными антиоксидантами – ПВП (5 г/л), глутамин (0,1 г/л), лимонная кислота (0,1 г/л), дитиотреитол (0,15 г/л)	Наиболее эффективной была питательная среда, содержащая 30 г/л сахарозы, 0,1 г/л L-глутамин, 5 г/л ПВП. Дитиотреитол наоборот способствовал синтезу и дальнейшему окислению фенольных соединений и коричневению культуры каллусов	[73]
<i>Cicer arietinum</i>	Цистеин 200 мг/л	Сокращение потемнения эксплантов	[79]
<i>Elaeis Guineensis</i>	5 г/л активированного угля, 500 мкМ 2,4-Д, ПВП 5 г/л, Цистеин 500 мг/л	Все компоненты подавляли потемнение каллусов	[86]
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Активированный уголь (100, 500, 1000 мг/л), аскорбиновая кислота и цистеин (50, 100, 150 мг/л)	Цистеин не оказал значимого влияния на потемнение каллусов. Наилучший результат показали активированный уголь 500 мг/л и аскорбиновая кислота 100 мг/л	[37]
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	0,1 мМ цистеин, 0,1 мМ аскорбиновая кислота	Снижение потемнения на 52,2% и 55,8% соответственно в суспензионной культуре клеток	[54]
<i>Gossypium hirsutum</i>	Pluronic F-68 (0,1–0,6 %) Нитрат серебра (0,5–3 мг/л)	Эффективно подавлял коричневение эксплантов нитрат серебра 2 мг/л	[49]

Таблица 1 (Продолжение)

Культура	Соединение	Результаты	Ссылка
<i>Hevea brasiliensis</i>	Нитрат серебра 1 мг/л	Предотвращение потемнения эксплантов	[21]
<i>Lactuca sativa</i>	Тепловой шок в течение 90 сек при 50 °С через 0, 12, 24, 36, 48 ч после поранения. Тепловой шок в течение 90 сек при 50 °С за 0, 2, 6, 12, 24, 36 ч до поранения	Наиболее эффективен тепловой шок за 6 ч до поранения	[59]
<i>Litchi chinensis</i>	Ополаскивание плодов в горячей воде (98 °С) на 30 сек и затем в 0, 2, 5, 10% растворе щавелевой, лимонной и аскорбиновой кислот	Наиболее эффективно замачивание в горячей воде с последующей обработкой 10% щавелевой кислотой	[77]
<i>Malus domestica</i>	0,25% аскорбиновая, 0,5% лимонная кислота, активированный уголь 3 г/л	Наблюдалось снижение степени потемнения эксплантов	[13]
	1% раствор аскорбиновой кислоты– 1 мин; горячая вода 50 °С 2 мин	Обработка аскорбиновой кислотой свежих ломтиков приводило к ингибированию ПФО и пероксидаз	[38]
	0,01 мМ фитиновая кислота	Добавление фитиновой кислоты к яблочному соку способствовало ингибированию ПФО на 99,2%	[24]
	Мезопористые кремниевые материалы модифицированные сульфгидрильными группами UVM-7, MCM-41 nano, MCM-41 micro, Aerosil	Наиболее эффективным было использование UVM-7-SH 3 мг/мл, который подавлял окислительное коричневение в модельной системе и в яблочном соке	[61]
<i>Medinilla formosana</i>	Различные концентрации ПВП, аскорбиновой кислоты, активированного угля, глутатиона и β-меркаптоэтанола	Наиболее эффективной оказалась комбинация β-меркаптоэтанола 0,5 мМ и активированного угля 0,2 г/л, подавлявшая коричневение эксплантов завязи	[96]
<i>Musa acuminata</i>	Предобработка эксплантов в 1,2 г/л; добавление 50-200 мг/л аскорбиновой кислоты непосредственно в среду	Предобработка в 1,2 г/л аскорбиновой кислоты и добавление 100 мг/л непосредственно в среду способствовало выживаемости эксплантов до 64,3% и 53,3% соответственно	[63]
	10% активированный уголь, ПВП 10 мл 0,005%, 0,01%, 0,02% раствора аскорбиновой кислоты добавляли на поверхность	Наиболее эффективно подавляла коричневение эксплантов аскорбиновая кислота	[46]
<i>Oryza sativa</i>	Нитрат серебра 5 мг/л, аскорбиновая кислота 20 мг/л, цистеин 40 мг/л	Происходило сокращение степени потемнения эксплантов	[26]
<i>Passiflora edulis</i>	Аскорбиновая кислота 100 мг/л, Нитрат серебра 2 мг/л, Активированный уголь 1 г/л, ПВП 1 г/л	Лучшие результаты были получены при добавлении нитрата серебра, подавлявшего коричневение эксплантов и каллусов	[36]
<i>Persea americana</i>	паеонол-β-циклодекстрин 0, 1, 4 мМ	Ингибирование активности ПФО, выделенной из плодов	[31]
<i>Phalaenopsis Blume</i>	Выдерживание в 1-75 мг/л гиббериллиновой кислоте в течение 5-40 мин	Наиболее эффективным было выдерживание эксплантов в течение 20 мин в растворе гиббериллиновой кислоты 25 мг/л	[100]
<i>Phoenix dactylifera</i>	K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> и Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 0, 0,5, 1,0; 2,0; 4,0 и 8,0 мг/л	Лучший результат был получен на среде с 4 мг/л K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , подавлявшем коричневение растительных эксплантов	[28]
<i>Pinus virginiana</i>	путресцин (1,5 мМ), спермидин (1,5 мМ), спермин (1,5 мМ)	Использование компонентов было эффективно как отдельно, так и в комбинации и предотвращало гибель каллусов	[85]

Таблица 1 (Окончание)

<i>Psidium guajava</i>	ПВП (100мг/л), активированный уголь (200 мг/л), комбинация лимонная : аскорбиновая кислоты 75:50 мг/л	Наиболее эффективным оказалось добавление к соку 75:50 мг/л лимонной : аскорбиновой кислот	[97]
<i>Quercus robur</i> <i>Q. petraea</i>	Экспланты замачивались в растворе аскорбиновой кислоты (100 мг/л), лимонной кислоты (100 мг/л), гидрохлорид (10 мг/л), ПВП (5 г/л) на 30-60 мин	Лучший результат был получен при использовании 100 мг/л аскорбиновой кислоты	[90]
<i>Rosa centifolia</i>	Аскорбиновая кислота (100 мг/л), активированный уголь (3 г/л), лимонная кислота (100 мг/л), аспарагин, глутамин, пролин (3, 6, 9 мг/л),	Наблюдался минимальный процент потемнения эксплантов, в качестве которых использовались пазушные почки, при использовании активированного угля 3 г/л (20%)	[6]
<i>Rumex aquaticus</i>	ПВП (2, 5, 7, 10 г/л), Тиосульфат натрия (100, 150, 200, 250, 300 мг/л)	Оптимальными для культивирования эксплантов были концентрации 10 г/л ПВП, 250 мг/л тиосульфата натрия	[1]
<i>Solanum tuberosum</i>	Искусственные микроРНК	Происходило ингибирование экспрессии генов <i>StuPPO1</i> и <i>StuPPO4</i> , что приводило к сокращению коричневления свежих срезов клубней	[17]
<i>Sorghum bicolor</i>	Активированный уголь 1-5 мг/л	Выживаемость каллусов и эксплантов достигала 80%, в то время как без адсорбента она составляла лишь 29%	[64]
<i>Taxus mairei</i>	Активированный уголь 1, 2 г/л и нитрат серебра 50, 100, 150 мг/л Аскорбиновая кислота 100 мг/л	Наиболее эффективной для предотвращения коричневления эксплантов была комбинация активированного угля 1 г/л и нитрата серебра 100 мг/л	[16]
<i>Theobroma cacao</i>	Аскорбиновая кислота (20, 100, 180 мг/л), нитрат серебра (7, 14, 21 мг/л), цистеин (8, 16, 24 мг/л), ПВП (150, 300, 450 мг/л)	Наилучший результат оказало добавление нитрата серебра в среду для культивирования эксплантов	[60]
<i>Vicia faba</i>	Активированный уголь 10 г/л, 200 мг/л цистеина, 0,02 г/л нитрата серебра, 1 мг/л аскорбиновой кислоты	Лучшие результаты были получены при использовании аскорбиновой кислоты и активированного угля, эффективно подавлявших коричневление эксплантов	[3]
	Аскорбиновая кислота (50 мг/л), лимонная кислота (50 мг/л), глутатион 100 мг/л. Также изучалось их действие в комбинации с ацетосирингоном и цистеином.	Лучшим антиоксидантом выступила лимонная кислота. Глутатион вызывал гидратирование каллусов. Аскорбиновая кислота подавляла каллусогенез	[45]
<i>Vitis vinifera</i>	0, 0,1; 0,5 и 1,0 % активированный уголь 0,5% ПВП на 0, 7, 14 день культивирования.	Активированный уголь в концентрации 0,5; 1% подавлял коричневление, но при этом снижал количество образующихся микрокаллусов. ПВП не препятствовал коричневлению культуры тканей	[73]
	Глутатион 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%	0,04% глутатион ингибировал активность ПФО в соке на 99,4%	[82]

очередь, антиоксиданты подразделяют на: подкислители (лимонная, щавелевая, винная, ортофосфорная), которые снижают потемнение, понижая рН питательной среды, что приводит к снижению активности ферментов, участвующих в окислении фенольных соединений; восстановители (аскорбиновая кислота, эриторбовая кислота, аскорбил-2-фосфат, аскорбил трифосфат, цистеин), действие которых основано на восстановлении хинонов обратно до дифенолов или на вос-

становлении  $Cu^{2+}$  в активном центре ПФО до  $Cu^+$ . Также отдельно можно выделить хелатирующие агенты (лимонная, щавелевая, этилендиамин, трауксусная кислоты, пирофосфат натрия), взаимодействующие с медью в активном центре ферментов; комплексообразователи (циклодекстрин, цистеин), связывающие либо субстраты ПФО, либо продукты реакции; аналоги субстратов ферментов (4-гексилрезорцинол, койевая и коричная кислоты) и вещества, ингибирующие ПФО путем

протеолиза (фицин, бромелаин, папаин) [88, 93]. Однако следует учитывать, что дополнение питательных сред для *in vitro* культивирования различными химикатами (адсорбентами и антиоксидантами) может отрицательно сказаться на эффективности трансформации и негативно повлиять на регенерацию побегов [73].

Значительного успеха в борьбе с потемнением культур тканей и питательной среды удается достичь путем использования аскорбиновой кислоты, которая способна выступать в качестве антиоксиданта, препятствуя окислению образовавшихся в клетках фенольных соединений (табл. 2). Механизм действия аскорбиновой кислоты разнообразен. Взаимодействуя с о-хинонами, аскорбиновая кислота способна формировать стабильные соединения, тем самым ингибируя процесс ферментативного окисления фенольных компонентов [39]. Кроме того, аскорбиновая кислота при высоких концентрациях (>1,5%) способна восстанавливать хиноны до исходных субстратов – дифенолов, а при низких – действовать как конкурентный ингибитор ПФО [8]. Так, добавление аскорбиновой кислоты в питательную среду в концентрации 1 мг/л способствует резкому снижению количества выделяющихся полимерных фенольных соединений и приводит к активной регенерации побегов боба садового (*Vicia faba* L.) [3]. Опыты по контролю коричневления эксплантов банана *Cavendish banana* cv. Formosa па показали эффективность использования 0,01% аскорбиновой кислоты, в то время как добавление ПВП40 и активированного угля – существенно не повлияло на выделение фенольных соединений [46]. ПВП – высокомолекулярный водорастворимый полимер, способный связывать фенольные соединения, образуя с ними водородные связи и, тем самым, препятствуя их дальнейшему окислению. Чаще всего при культивировании растительных тканей используют ПВП с молекулярной массой 40000. Похожие результаты были получены и в экспериментах по снижению потемнения тканей дубов *Quercus robur* L. и *Q. petraea* (Matt.) Liebl. Добавление аскорбиновой кислоты оказало наиболее сильный и пролонгированный эффект. Действие лимонной кислоты было почти на том же уровне, однако выживаемость тканей в дальнейшем снижалась. Использование цистеина и ПВП в данных экспериментах не оказало значительного влияния на синтез и окисление фенольных соединений [90]. Эти эксперименты также показали, что аскорбиновая кислота способна не только предотвращать коричневление эксплантов, но и останавливать этот процесс в уже потемневших тканях.

Совместное использование в качестве антиоксидантов аскорбиновой и лимонной кислоты снижало степень потемнения эксплантов, однако также препятствовало образованию побегов у *V. faba*, в то время как использование лишь лимонной кислоты (50 мг/л) значительно снижало степень некроза эксплантов, не препятствуя при этом регенерации растений. Глутатион, также использованный в данном исследовании, оказал негативное влияние, вызвав чрезмерное гидратирование эксплантов [45].

Обнадеживающие результаты были получены при совместном использовании нитрата серебра, L-цистеина и аскорбиновой кислоты, добавление которых в среду для культивирования в концентрации 5:40:20 мг/л снижало некроз меристематических эксплантов риса *Oryza sativa* L. на 80%. Культивирование эксплантов на среде, содержащей лишь нитрат серебра в концентрации 5 мг/л, способствовало повышению уровня выживаемости эксплантов до 71%. L-цистеин в концентрации 40 мг/л и аскорбиновая кислота 20 мг/л повышали количество жизнеспособных эксплантов до 61% и 42% соответственно [26].

L-цистеин, который часто используют в качестве средства против потемнения, способен так же как и аскорбиновая кислота, ингибировать окислительное потемнение различными способами (превращение хинонов в их предшественников, подавление активности ПФО, взаимодействие с хинонами с образованием неокрашенных соединений) [8, 53]. Известно, что L-цистеин оказывает сильное действие на о-дифенолоксидазу, подавляя ее активность по типу неконкурентного обратимого ингибирования. Так, добавление 200 мг/л L-цистеина в среду для культивирования семядольных узлов нута *Cicer arietinum* L. способствовало их успешной трансформации и регенерации [79]. Однако, в аналогичных экспериментах по микрклональному размножению растений *V. faba* L., где в питательную среду добавляли L-цистеин в той же концентрации, фенольные соединения продолжали активно выделяться и окисляться, что в итоге приводило к гибели эксплантов [3]. В экспериментах по генетической трансформации сои *Glycine max* (L.) Merr. с помощью агробактерий *Agrobacterium tumefaciens*, было показано, что добавление в среду для сокультивации L-цистеина в концентрациях 400-1000 мг/л способствовало повышению эффективности трансформации [67, 68].

Для продления срока жизни растительных тканей, которые выращивают методом поверхностного культивирования, может быть также использован тиосульфат натрия, который в экспериментах



по культивированию *in vitro* изолированных тканей и органов шавеля *Rumex aquaticus* L. совместно с ПВП оказывал антиоксидантное воздействие, препятствуя окислению выделяющихся в среду фенольных компонентов (табл. 2) [1].

В качестве агента против потемнения растительных тканей может быть использован L-глутамин (табл. 2). В экспериментах Alagarsamy et al. [7] добавление L-глутамина в концентрации 300 мг/л в среду для культивирования эксплантов чая *Camellia sinensis* (L.) Kuntze способствовало каллусогенезу и снижало степень потемнения эксплантов и питательной среды. В другом исследовании добавление в среду для сокультивирования эксплантов с агробактериями 2 г/л L-глутамина противодействовало бактерицидному эффекту фенольных соединений и значительно способствовало переносу Т-ДНК в экспланты пачули *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth [69]. Похожие результаты были получены при культивировании каллусов *C. sinensis* на питательной среде, содержащей 0,1 г/л L-глутамина. В то же время присутствие в питательной среде 0,15 г/л дитиотреитола приводило к усиленной экссудации и окислению фенольных соединений в тканях каллуса [73]. Противоположный результат был получен при добавлении 0,04% дитиотреитола в среду для культивирования стрелиции *Strelitzia reginae* Aiton – потемнение питательной среды и культуры резко сокращалось [34].

Механизм благоприятного действия аминокислот на культуры тканей растений *in vitro* остается до конца не ясным. Предполагается, что они способны вступать в химические реакции с хинонами, формируя аминокатехины, тем самым препятствуя их дальнейшему окислению [50]. Также они выступают в качестве источника восстановленного азота, который легко метаболизируется растительными клетками и стимулирует быстрый клеточный рост и пролиферацию [70].

Восстановлению нормальных каллусных культур из коричневых тканей способствует добавление в питательную среду полиаминов – спермидина и спермина, а также диамина – путресцина. Использование путресцина (1,5 мМ), спермидина (1,5 мМ), а также комбинаций 1,5 мМ путресцина + 1,5 мМ спермидина и 1,5 мМ путресцина + 1,5 мМ спермина способствовало росту активности антиоксидантных ферментов – аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы и супероксиддисмутазы в клетках сосны *Pinus virginiana* Mill. Помимо этого, наблюдался ускоренный рост каллуса и активное формирование побегов [85].

Очень часто в культуре растительных тканей для преодоления окисления фенольных сое-

динений используются различные адсорбирующие вещества. Наиболее широко используемым компонентом, связывающим токсичные соединения, является активированный уголь, показавший свою эффективность для борьбы с потемнением множества различных растительных культур (табл. 2). Так, добавление в среду для индукции соматического эмбриогенеза масличной пальмы *Elaeis guineensis* Jacq. 5 г/л активированного угля и 500 мкМ 2,4-Д способствовало снижению степени коричневения каллуса и усиливало его рост и пролиферацию [86]. Негативное влияние фенольных соединений на рост корней *Aristolochia indica* L. предотвращалось благодаря использованию активированного угля в концентрации 30 мг/л [83]. Также, использование активированного угля (1 мг/л) оказалось эффективным для снижения степени потемнения эксплантов *V. faba*. Кроме того, это также способствовало регенерации побегов и увеличению их длины [4].

Добиться повышения выживаемости зародышей сорго *Sorghum bicolor* (L.) Moench до 80% удалось путем их выращивания на питательной среде, содержащей активированный уголь (1-5 г/л), в то время как на обычной среде выживаемость составляла лишь 30%. Подобные результаты были получены при культивировании эксплантов и каллусов множества растений, что говорит о высокой эффективности активированного угля в качестве адсорбента фенольных соединений [64]. Однако, в опытах по формированию микрокаллуса из протопластов винограда *V. vinifera* L. активированный уголь препятствовал коричневению культуры, но при этом отрицательно влиял на результат культивирования [74].

Основным ограничением в использовании активированного угля является его способность адсорбировать не только токсичные вещества, но и необходимые растению гормоны, витамины и катионы металлов, что может оказать негативное влияние на растительную культуру и препятствовать регенерации растений [25, 72, 91].

Комбинация активированного угля (1 г/л) и нитрата серебра (100 мг/л) оказалась способной снижать потемнение эксплантов тиса *Taxus mairei* (Lemée & Lévl.) Hu ex Liu, увеличивая выживаемость культуры [16]. Сам нитрат серебра в ряде опытов показал свою высокую эффективность для преодоления потемнения культур тканей. В опытах по *in vitro* культивированию гевеи *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Mull. Arg. было показано, что это соединение стимулирует каллусообразование, благодаря чему формируются хорошие желтые каллусы, и увеличивается их средний вес (табл. 2) [21]. Доступность, растворимость в

воде, специфичность и стабильность нитрата серебра делают его весьма полезным и мощным инструментом для регулирования роста растений и морфогенеза *in vitro*. Здоровые, зеленые побеги хлопчатника *Gossypium hirsutum* L были получены при использовании 2 мг/л нитрата серебра, который подавлял синтез фенольных соединений в культуре тканей. В этих экспериментах также изучалась возможность использования полуксамера Pluronic F-68 для стимуляции регенерации *in vitro* и адсорбции полимерных фенольных соединений. Наиболее оптимальной для данной культуры оказалась концентрация полуксамера равная 0,3%, при которой происходило увеличение числа побегов на эксплант, хотя секреция фенольных соединений оставалась на том же уровне [49]. Снижения степени потемнения каллусов какао *Theobroma cacao* L. в 2-3 раза по сравнению с контролем удалось добиться при добавлении в среду нитрата серебра 7-21 мг/л [60]. Аналогичные результаты были получены при использовании нитрата серебра в концентрации 2 мг/л. Данного количества оказалось достаточно для сохранения жизнеспособности эксплантов пассифлоры *Passiflora edulis* Sims, к тому же побеги на них появлялись гораздо эффективнее по сравнению с контролем [36].

Интересным компонентом для борьбы с потемнением растительных тканей является кремний. Добавление  $K_2SiO_3$  в среду для индукции соматического эмбриогенеза финика *Phoenix dactylifera* L. не только способствовало снижению потемнения растительной культуры, но и стимулировало процессы каллусогенеза и образования соматических эмбрионов [28].

Однако наиболее перспективным способом снижения степени потемнения растительных культур вследствие накопления фенольных соединений на сегодняшний день является использование специфических ингибиторов ключевых ферментов фенилпропаноидного метаболического пути – ФАЛ, полифенолоксидаз и пероксидаз (табл. 2).

Свою эффективность показали растворы  $CaCl_2$  (0,3 М), 2,4-Д (1 мМ) и уксусной кислоты (0,5 М), в которые в экспериментах Tomas-Barbagan, Gil [87] помещались на 5 мин экспланты *L. sativa* (табл. 2). Полученные результаты позволили авторам сделать вывод, что использование уксусной кислоты приводит к резкому снижению активности ФАЛ, вследствие чего происходит сокращение синтеза фенольных компонентов. Механизм действия  $CaCl_2$ , вероятно, заключается либо в его способности непосредственно снижать активность о-дифенолоксидазы, либо в его протекторных, по отношению к клеточным мем-

бранам, свойствах, благодаря которым, латентные, связанные с мембранами ПФО не выходят в раствор и не полимеризуют фенольные соединения. Активность ФАЛ снижалась примерно на 60% под действием 2,4-Д, но синтез фенольных соединений при этом лишь резко снижался, а не подавлялся полностью [87]. Вместо  $CaCl_2$  может быть также использован NaCl, оказывающий схожее действие – подавление активности другого фермента – тирозиназы [55].

Одним из эффективных ингибиторов ферментов, широко используемых на сегодняшний день в биотехнологии растений, является 2-аминоиндан-2-фосфоновая кислота (АИР). Являясь структурным аналогом фенилаланина, АИР конкурентно ингибирует ФАЛ, тем самым препятствуя синтезу множества фенольных соединений [101]. Так, АИР в концентрациях 5, 15, 30 мкМ подавляла активность фермента в экспериментах с проростками березы *Betula pubescens* Ehrh. В этих экспериментах было показано, что содержание АИР в среде способствует подавлению синтеза фенольных соединений определенных классов. Например, ингибитор в указанных концентрациях в течение 18 дней препятствовал синтезу фенольных кислот, флаван-3-олов и конденсированных танинов, при этом, абсолютно не подавляя синтез гликозидов и флавоноидов. Это говорит о том, что в клетках существуют различные изоформы фермента ФАЛ, не все из которых подвержены ингибиторному воздействию АИР [66]. Аналогичный эффект наблюдался при использовании АИР в концентрации 2 мкМ – происходило эффективное ингибирование синтеза эпигаллокатехина, что способствовало активному росту и индукции каллусогенеза *C. sinensis* [7]. В экспериментах Jones, Saxena [40] АИР в концентрации 100 мкМ резко подавляла активность ФАЛ в клетках каллуса полыни *Artemisia annua* L, что также приводило к сокращению степени их коричневения [40].

Подавить активность фермента можно при помощи воздействия теплового шока. Тепловой шок, длительностью 90 сек, примененный как до, так и после поранения, способствовал резкому снижению степени коричневения тканей *L. sativa* и возвращению их зеленого цвета. Максимального эффекта удалось добиться, подвергая ткани действию температуры равной 50 °С за 6 ч до поранения [59]. В других экспериментах наиболее эффективным оказалось применение теплового шока (45 °С, 90 сек) через 2-4 ч после поранения тканей. Авторы установили, что при предварительном нагревании происходит повышение экспрессии белков теплового шока, вместо активации ферментов фенилпропаноидного пути

метаболизма, что может быть использовано в качестве нового способа сокращения коричневления растительных тканей [78].

Понизить степень потемнения тканей растений может также гибберелловая кислота, способная блокировать синтез фенольных соединений, преимущественно биосинтез флавоноидов, воздействуя на степень экспрессии ФАЛ. Были проведены опыты, в которых было показано, что гибберелловая кислота при концентрации 25 мг/л способна препятствовать гибели эксплантов орхидеи *Phalaenopsis* Blume, вследствие накопления и окисления фенольных соединений. Однако, при более высоких концентрациях (30 мг/л) происходит резкое угнетение индукции каллусогенеза [100].

Ряд опытов показал, что коричный альдегид может эффективно ингибировать активность ФАЛ, блокируя фенилпропаноидный метаболический путь [32].

Другим важным ферментом ответственным за потемнение растительных тканей является тирозиназа – фермент, встречающийся как в клетках растений, так и в клетках животных, катализирующий два первых этапа меланогенеза млекопитающих [58]. Наиболее интенсивно изучающимся ингибитором тирозиназы является койевая кислота. Благодаря своей способности связывать атомы меди в активном центре фермента, койевая кислота проявляет конкурентный ингибиторный эффект на монофенолоксидазную активность тирозиназы.

Другими перспективными ингибиторами медленного связывания тирозиназы являются трополон и субстратный аналог тирозина – мимозин, а также бензилиденацетон, бензилацетон и 4-фенил-2-бутанол [16, 58].

Интересной представляется возможность использования в качестве ингибитора пероксидаз и тирозиназы омепразола, который широко применяется в медицине для снижения кислотности желудочного сока. Так использование омепразола в опытах по сокращению коричневления *Malus domestica* Borkh. приводило к ингибированию активности ПФО и пероксидаз, тем самым предотвращая их дальнейшее окисление и, следовательно, коричневление растительных тканей. Примечательно, что степень ингибирования фермента напрямую коррелировала с концентрацией данного ингибитора [57].

Понизить активность фермента о-дифенолоксидазы на 99,4% в виноградном соке удалось также путем использования глутатиона [24, 97, 98]. Похожие результаты были получены при использовании глутатиона для контроля потемнения тканей личи *Litchi chinensis* Sonn. Аналогичный эффект оказывало добавление фитиновой кислоты

в яблочный сок, что приводило к ингибированию активности ПФО на 99,2% [24].

Перспективным представляется использование в качестве ингибиторов ПФО комплекса паеонол-β-циклодекстрин. Так, в экспериментах Fuentes et al. [31] данное вещество подавляло активность выделенной из авокадо *Persea americana* ПФО. Паеонол, вещество, выделяемое из пиона *Paeonia suffruticosa* Andrews, является структурным аналогом субстрата тирозиназ, поэтому комплекс паеонол-β-циклодекстрин, где β-циклодекстрин используется для повышения растворимости паеонола в воде, может быть использован для конкурентного ингибирования данного фермента.

Эффективными ингибиторами тирозиназ также являются кремниевые мезопористые материалы, модифицированные различными функциональными группами. Мезопористые материалы – вещества, диаметр пор которых варьирует от 2 до 50 нм. Так, UVM-7-SH – кремнеземный материал, модифицированный сульфгидрильными группами – способен полностью ингибировать активность фермента в яблочном соке в течение девяти дней после пятиминутного контакта при концентрации 3 мг/мл. При этом результат сохраняется даже после полного удаления материала (табл. 2) [61].

Интересным и весьма перспективным способом блокирования активности целевых ферментов является ингибирование экспрессии генов ПФО с помощью искусственных микроРНК путем индукции РНК-интерференции. Так, было обнаружено, что в клетках картофеля *Solanum tuberosum* L. фермент ПФО кодируется 9 генами *StuPPO1-9*, основной вклад в окислительное коричневление вносят гены *StuPPO1-4*. Посттранскрипционный сайленсинг генов *StuPPO1* и *StuPPO4* с помощью микроРНК в большей степени влиял на сокращение окислительного коричневления [17].

Все эти перечисленные выше способы борьбы с потемнением растительных тканей чаще всего комбинируются с частыми пересадками культуры на свежие питательные среды, хотя это может также оказать и противоположный эффект, вызвав у растений еще больший стресс [9]. Кроме того, установлено, что экспланты растущие в условиях затемнения (дефицита света) проявляют меньший уровень накопления фенольных соединений, по сравнению с культивируемыми на свету эксплантами [67]. Понизить степень коричневления также может изменение концентрации компонентов питательной среды и регуляторов роста.

Таким образом, существует множество различных способов и соединений, используемых для борьбы с окислительным коричневлением

растительных тканей, таких как предобработка эксплантов антиоксидантами, добавление различных адсорбентов и антиоксидантов непосредственно в питательную среду. Кроме того, данные методы сочетаются с частой пересадкой эксплантов на свежие среды, а также с выращиванием культур в условиях уменьшенного освещения или темноты.

Из таблицы 2 видно, что наиболее широко применяемыми соединениями, используемыми для предотвращения коричневления тканей, являются аскорбиновая кислота, активированный уголь, нитрат серебра и ПВП в различных концентрациях. Чаще всего, при возникновении проблемы потемнения, предпочтение отдается аскорбиновой кислоте, а также другим антиоксидантам (лимонная кислота, L-цистеин и др.). К сожалению, использование антиоксидантов не является универсальным способом для борьбы с потемнением. В случае их неэффективности, целесообразным может быть использование адсорбирующих веществ (активированный уголь, кремнеземные материалы). Однако ввиду того, что эта группа веществ может адсорбировать фитогормоны, витамины и другие важные компоненты, может возникать необходимость в изменении состава питательных сред в сторону увеличения содержания регуляторов роста. В целом, анализ таблицы 2 показывает, что универсальных подходов для борьбы с потемнением тканей *in vitro* не существует. Для каждого вида растения и иногда даже для каждого сорта растения такие методы должны подбираться эмпирическим путем. Если же вид растения был ранее не изучен, то можно лишь дать общую рекомендацию – начинать борьбу с коричневлением эксплантов с добавления в среду аскорбиновой кислоты, во вторую очередь можно использовать активированный уголь, нитрат серебра и, наконец, подключать поочередно другие соединения.

Фенольные соединения – продукты вторичного метаболизма, широко распространенные в растениях и выполняющие множество важных функций. К сожалению, в процессе культивирования растений и их частей в стерильных условиях часто происходит потемнение культуры тканей и питательной среды в результате химических реакций превращения простых фенольных соединений в полимерные. Это представляет собой большую проблему при *in vitro* культивировании растений, их тканей и клеток, так как часто приводит к гибели последних. Для решения данной проблемы чаще всего применяется способ частых пересадок культуры на свежие питательные среды, однако это может спровоцировать еще больший стресс у растения и отразиться в дополнительной

активации фенилпропаноидного пути метаболизма. Поэтому для предотвращения окислительного потемнения тканей все чаще используется метод внесения в питательные среды дополнительных компонентов химической природы. Часть из них направлена на ингибирование ферментов, участвующих в синтезе и окислении фенольных соединений (аскорбиновая кислота, L-цистеин, АПР и т.д.), другие же действуют в качестве адсорбирующих полимерные фенольные соединения веществ. Для этих целей часто применяется активированный уголь, используемый при культивировании многих видов растений. Хорошими адсорбирующими свойствами обладают также синтетические материалы на основе кремния, нашедшие широкое распространение в ряде работ зарубежных исследователей. Главным ограничением в применении перечисленных веществ является их способность активно адсорбировать не только фенольные соединения, но и дополнительные компоненты среды – гормоны и витамины.

Использование антиоксидантов, таких как аскорбиновая, лимонная, винная кислоты, L-цистеин, глутатион и т.п. является весьма перспективным способом предотвращения окислительного потемнения тканей. Эффективность антиоксидантов обуславливается их способностью, как непосредственно взаимодействовать с веществами фенольной природы, так и ингибировать активность ферментов, катализирующих их синтез и окисление. Кроме того, данные вещества могут обладать еще и стимулирующей каллусогенез и регенерацию растений активностью.

Перспективным направлением в борьбе с коричневлением является создание растений с «выключенными» методами геномного редактирования генами основных ферментов фенилпропаноидного метаболического пути. Однако следует учитывать, что данные ферменты могут выполнять ряд важнейших функций в жизнедеятельности растительных организмов, и их ингибирование может привести к появлению негативных последствий. В таком случае более перспективным может оказаться использование малых интерферирующих РНК или микроРНК для посттранскрипционного сайленсинга, при котором не будет происходить полного блокирования экспрессии генов ПФО.

К сожалению, на сегодняшний день не существует единого протокола для преодоления потемнения растительных тканей и питательной среды, тем более эффективного для всех видов растений. Более того, многие вещества, активно справляющиеся с описанной проблемой при выращивании одной культуры, могут негативно влиять на

каллусогенез и регенерацию других культур, что непременно следует учитывать при выборе метода борьбы с потемнением растительных тканей. Поэтому целесообразно для каждого вида, сорта растений, а иногда и для типа эксплантов эмпирическим путем подбирать условия культивирования с целью предотвращения окислительного потемнения тканей *in vitro*.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119021190011-0, а также при финансовой поддержке гранта Президента РФ для молодых российских ученых – докторов наук МД-2304.2020.4

## ЛИТЕРАТУРА

1. Скапцов М.В., Балабова Д.В., Куцев М.Г. Оптимизация сред для культивирования растений *in vitro* на примере шавеля водного *Rumex aquaticus* L. *Сельскохозяйственная биология*, 2014, 1, 32–35. doi: 10.15389/agrobiol.2014.1.32rus
2. Филиппова Г.Г., Смолич И.И. Основы биохимии растений. Курс лекций. Мн.: БГУ, 2004, 107 – 120.
3. Abdelwahd R., Hakam N., Labhili M., Udupa S. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(8), 997–1002.
4. Abohatem M.A., Bakil Y., Baaziz M, Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of Date palm. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 203–214. doi: 10.1007/978-1-4939-7156-5-17
5. Adrian M., Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., et al. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(12), 6103–6105. doi: 10.1021/jf0009910
6. Akhtar G., Jaskani M.J., Sajjad Y., Akram A. Effect of antioxidants, amino acids and plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Rosa centifolia*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2016, 14(1), 51–55. doi: 10.15171/ijb.1152
7. Alagarsamy K., Shamala L.F., Wei S. Influence of media supplements on inhibition of oxidative browning and bacterial endophytes of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *3 Biotech*, 2018, 8(8), 356. doi: 10.1007/s13205-018-1378-9
8. Ali H.M., El-Gizawy A.M., El-Bassiouny R.E., Saleh M.A. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. *Journal of food science and technology*, 2015, 52(6), 3651–3659. doi: 10.1007/s13197-0-1437-0
9. Bagheri A., Marashi H., Moshtaghi N., Balandary A. Investigation into seasonal effect and browning inhibitor on callus regeneration of seedless barberry (*Berberis vulgaris* var. *asperma*). *Plants Tissue Culture and Biotechnology*, 2011, 21(2), 161–168. doi: 10.3329/ptcb.v21i2.10239
10. Bazghaleh N., Prashar P., Purves R.V., Vandenberg A. Polyphenolic composition of lentil roots in response to infection by *Aphanomyces euteiches*. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9, 1–12. doi: 10.3389/fpls.2018.01131
11. Biesiadav A., Tomczak A. Biotic and abiotic factors affecting the content of the chosen antioxidant compounds in vegetables. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 2012, 76, 55–78. doi: 10.2478/v10032-012-0004-3
12. Blancquaert E.H., Oberholster A., Ricardo-da-Silva J.M., Deloire A.J. Effects of abiotic factors on phenolic compounds in the grape berry. A review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 2019, 40(1), 92–105. doi: 10.21548/40-1-3060
13. Boudabous M., Mars M., Marzougui N., Ferchichi A. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through *in vitro* culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica*, 2010, 157(3), 513–524. doi: 10.1080/12538078.2010.10516227
14. Bruni R., Sacchetti G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. *Hypericaceae/Guttiferae*). *Molecules*, 2009, 14(2), 682–725. doi: 10.3390/molecules14020682
15. Chandra R., Mishra M., Bajpai A. Biotechnological interventions for improvement of guava (*Psidium guajava* L.). *Acta horticultrae*, 2007, 735(735), 117–125. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.735.15
16. Chang S.H., Ho C.K., Chen Z.Z., Tsay J.Y. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(6), 496–502. doi: 10.1007/s002990100362
17. Chi M., Bhagwat B., Lane W.D. Reduced polyphenol oxidase gene expression and enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) with artificial microRNAs. *BMC plant biology*, 2014, 14, 62. doi: 10.1186/1471-2229-14-62
18. Chirinos R., Betalleluz-Pallardel I., Huaman, A., et al. HPLC-DAD characterization of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 2009, 113, 1243–1251. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.015
19. Coelho D.G., Fonseca K.S., Neto D.F., et al. Association of preharvest management with oxidative protection and enzymatic browning in minimally processed cassava. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(5). doi: 10.1111/jfbc.12840
20. Dai J., Mumper R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, 15(10), 7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313
21. Dew W., Te-chato S. The effect of explants plant growth regulators and silver nitrate on *in vitro* callus induction in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. *Journal of Agricultural Technology*, 2012, 8(6), 2127–2135. doi: 10.5897/AJB2014.13988
22. Diaz J., Bernal A., Pomar F., Merino F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 2001, 161(1), 179–188. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00410-1

23. Dixon R.A., Paiva N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 1995, 7, 1085–1097. doi: 10.2307/3870059
24. Du Y., Dou S., Wu S. Efficacy of phytic acid as an inhibitor of enzymatic and non-enzymatic browning in apple juice. *Food Chemistry*, 2012, 135(2), 580–582. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.131
25. Ebert A., Taylor F., Blake J. Changes of 6-benzylamino-purine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 33, 157–162. doi: 10.1007/BF01983229
26. Enriquez-Obregon G.A., Prieto-Samsonov D.L., Riva G.A., et al. *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 59(3), 159–168. doi: 10.1023/A:1006307527449
27. Ewane C.A., Lepoivre P., Bellaire L., Lassois L. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2012, 16(3), 393–404.
28. Fadl A.E., Reda E. Effect of silicon on somatic embryogenesis and shoot regeneration of dry date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv bartamuda. *Egyptian Journal of Desert Research*, 2014, 64, 65–82. doi: 10.21608/ejdr.2014.5810
29. Feng J.T., Zhi-yi Z., Jun Z., Na Y., Dmei W. Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. *Forestry Studies in China*, 2007, 9(4), 279–282. doi: 10.1007/s11632-007-0044-9
30. Ferreyra M.F., Rius S.P., Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3, 1–16. doi: 10.3389/fpls.2012.00222
31. Fuentes C.A., Sancho M.I., Melo G., et al. *In vitro* and *in vivo* inhibition of Hass avocado polyphenol oxidase enzymatic browning by paeonol, b-cyclodextrin, and paeonol:b-cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 127(6), 703–709. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.11.009
32. Fujita N., Tanaka E., Murata M. Cinnamaldehyde inhibits phenylalanine ammonia-lyase and enzymatic browning of cut lettuce. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2006, 70(3), 672–676. doi: 10.1271/bbb.70.672
33. He Y., Guo X., Li R., Niu B., et al. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009, 98, 11–17. doi: 10.1007/s11240-009-9533-y
34. Hosni A.M. Increasing the potential of *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae* Aiton. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 2001, 9(2), 839–852.
35. Huang L.C., Lee Y.L., Huang B.L. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2002, 38(4), 358–365. doi: 10.1079/IVP2002298
36. Huh Y.S., Lee J. K., Nam S.Y. Effect of plant growth regulators and antioxidants on *in vitro* plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Plant Biotechnology*, 2017, 44(3), 335–342. doi: 10.5010/JPB.2017.44.3.335
37. Jain S., Kharya M. D., Nayak S., Barik R. Effect of antioxidants on callus browning of *Glycyrrhiza glabra*. *Journal Of Natural Remedies*, 2008, 8(1), 44–47. doi: 10.18311/jnr/2008/294
38. Javdani Z., Ghasemnezhad M., Zare S. A comparison of heat treatment and ascorbic acid on controlling enzymatic browning of fresh-cuts apple fruit. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 2013, 5(3), 186–193.
39. Jiang G.H., Kim Y.M., Nam S.H., Yim S.H., Eun J.B. Enzymatic browning inhibition and antioxidant activity of pear juice from a new cultivar of asian pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Sinhwa) with different concentrations of ascorbic acid. *Food science and biotechnology*, 2016, 25(1), 153–158. doi: 10.1007/s10068-016-0023-9
40. Jones A.M., Saxena P.K. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. *PLoS ONE*, 2013, 8(10), 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0076802
41. Kalt W. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 2005, 70(1), 11–19. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09053.x
42. Ke D., Saltveit M.E. Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiology*, 1988, 88, 1136–1140. doi: 10.1104/pp.88.4.1136
43. Kefeli V.I., Kalevitch M.V. Natural growth inhibitors and phytohormones in plant and environment. Dordrecht, Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*, 2003, 96–105. doi: 10.1007/978-94-017-0315-4
44. Khosroushahi A.Y., Naderi-Manesh H., Simonsen H.T. Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. *Bioimpacts*, 2011, 1(1), 37–45. doi: 10.5681/bi.2011.006
45. Klenoticova H., Smykalova I., Svabova L., Griga M. Resolving browning during the establishment of explant cultures in *Vicia faba* L. for genetic transformation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2013, 61(5), 1279–1288. doi: 10.11118/actaun201361051279
46. Ko W.H., Su C.C., Chen C.L., Chao C.P. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of *Cavendish banana* cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009, 96(2), 137–141. doi: 10.1007/s11240-008-9469-7
47. Kosyk O.I., Khomenko I.M., Batsanova L.M., Taran N.Y. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin content in different varieties of lettuce under the cadmium influence. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2017, 89(2), 85–91. doi: 10.15407/ubj89.02.085

48. Krishna H., Sairam R.K., Singh S.K., Patel V.B., et al. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia Horticulturae*, 2008, 118(2), 132–138. doi: 10.1016/j.scienta.2008.05.040.
49. Kumar G.P., Sivakumar S., Sival G., et al. Silver nitrate promotes high-frequency multiple shoot regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by inhibiting ethylene production and phenolic secretion. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2016, 52(4), 408–418. doi: 10.1007/s11627-016-9782-5
50. Kumar N., Gulati A., Bhattacharya A. L-glutamine and L-glutamic acid facilitate successful *Agrobacterium* infection of recalcitrant tea cultivars. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2013, 170(7), 1649–1664. doi: 10.1007/s12010-013-0286-z
51. Laukkanen H., Rautiainen L., Taulavuori E., Hohtola A. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology*, 2000, 20(7), 467–475. doi:10.1093/treephys/20.7.467
52. Leng, P., Su S., Wei F., et al. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. *Acta horticulturae*, 2009, 829, 127–132. doi: 0.17660/ActaHortic.2009.829.17
53. Li L., Wu M., Zhao M. Enzymatic properties on browning of fresh-cut potato. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 2018, 397(1), 1–6. doi: 10.1088/1757-899X/397/1/012116
54. Li Y., Meng T., Wang Y., Zhang X. Study on enzymatic browning in suspension cultures of licorice cells. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016, 30(2), 277–283. doi: 10.1080/13102818.2015.1114906
55. Li Y., Wills R.B., Golding J.B., Huque R. Effect of halide salts on development of surface browning on fresh-cut ‘Granny Smith’ (*Malus domestica* Borkh) apple slices during storage at low temperature. *Journal of the science of food and agriculture*, 2015, 95(5), 945–952. doi: 10.1002/jsfa.6766
56. Liang S., He Y., Zheng H. Effects of sucrose and browning inhibitors on callus proliferation and anti-browning of Chinese Kale. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2019, 252, 1–18. doi: 10.1088/1755-1315/252/2/022018
57. Lin M.Z., Chai W.M., Ou-Yang C., et al. Antityrosinase mechanism of omeprazole and its application on the preservation of fresh-cut Fuji apple. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117, 538–545. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.172.
58. Liu X., Jia Y.L., Chen J.W., et al. Inhibition effects of benzylideneacetone, benzylacetone, and 4-phenyl-2-butanol on the activity of mushroom tyrosinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(3), 3275–279. doi: 10.1016/j.jbiomac.2014.08.014
59. Loaiza-Velarde J.G., Saltveit M.E. Heat shocks applied either before or after wounding reduce browning of lettuce leaf tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2001, 126(2), 227–234. doi: 10.21273/HORTSCI.35.3.484C
60. Modeste K.K., Eliane M.T., Daouda K., et al. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. *Australian Journal of Crop Science*, 2017, 11(1), 25–31. doi: 10.21475/ajcs.2017.11.01.pne174
61. Munoz-Pina S., Ros-Lis J.V., Arguelles A., et al. Full inhibition of enzymatic browning in the presence of thiol-functionalised silica nanomaterial. *Food Chemistry*, 2018, 241(15), 199–205. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.059
62. Ndakidemi C.F., Mneney E., Alois P., Ndakidemi A. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in *in vitro* culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. *American Journal of Plant Sciences*, 2014, 5(1), 187–191. doi: 10.4236/ajps.2014.51024
63. Ngomuo M., Mneney E., Ndakidemi P. Control of lethal browning by using ascorbic acid on shoot tip cultures of a local *Musa* spp. (Banana) cv. Mzuzu in Tanzania. *African Journal of Biotechnology*, 2014, 13(16), 1721–1725. doi: 10.5897/AJB2013.13251
64. Nguyen T.V., Thu T.T., Claeys M., Angenon G. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved *in vitro* regeneration system. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture*, 2007, 91(2), 155–164. doi: 10.1007/s11240-007-9228-1
65. Noda T., Limure K., Okamoto S., et al. Expression analysis of polyphenoloxidase isozymes by active staining method and tissue browning of head lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(8), 1484–1488. doi: 10.1080/09168451.2017.1336921
66. Nybakken L., Keski-Saari S., Falck M.A., Julkunen-Tiitto R. Restoration of secondary metabolism in birch seedlings relieved from PAL-inhibitor. *Trees*, 2007, 21(3), 273–281. doi: 10.1007/s00468-006-0120-0
67. Ochoa-Alejo N., Ramirez-Malagon R. *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2001, 37(6), 701–729. doi: 10.1007/s11627-001-0121-z
68. Patil Y.K., Thakur V.V., Choudhari N.B., et al. Influence of plant growth regulators on seed germination and regeneration of shoots and roots in Chili (*Capsicum annum* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, 7(2), 242–248. doi: 10.20546/ijcmas.2018.702.031
69. Paul A., Bakshi S., Sahoo D.P., Kalita M.C., Sahoo L. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth using leaf explants: bactericidal effect of leaf extracts and counteracting strategies. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2012, 166(8), 1871–1895. doi: 10.1007/s12010-012-9612-0

70. Perez Bernal M., Hernandez C., Barcelly M.T., et al. Quantitative transient GUS expression in J-104 rice calli through manipulation of *in vitro* culture conditions. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2009, 11(2), 75–84.
71. Pombo M.A., Rosli H.G., Martínez G.A., Civello P.M. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 59, 94–102. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.08.003
72. Pullman G.S., Bucalo K. Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forests*, 2014, 45(3), 353–377. doi: 10.1007/s11056-014-9407-y
73. Rana M.M., Han Z.X., Song D.P., et al. Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7), 1–18. doi: 10.3390/ijms17071132
74. Reustle G., Natter I. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis* sp.). *Vitis*, 1994, 33(3), 117–121.
75. Robards R., Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst*, 1997, 122, 11–34. doi: 10.1039/A606499J
76. Roussos P.A., Pontikis C.A. Oxidative browning in «Koroneiki» olive explants as influenced by oxidative enzyme activities and endogenous phenolic compounds. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2001, 76(4), 441–446. doi: 10.1080/14620316.2001.11511391
77. Saengnil K., Lueangprasert K., Uthaiutra J. Control of enzymatic browning of harvested 'hong huay' litchi fruit with hot water and oxalic acid dips. *ScienceAsia*, 2006, 32(4), 345–350. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2006.32.345
78. Saltveit M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 21(1), 61–69. doi: 10.1016/S0925-5214(00)00165-4
79. Sanyal I., Singh A.K., Kaushik M., et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cryIAC* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. *Plant Science*, 2005, 168(4), 1135–1146. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.12.015
80. Sedaghat N., Zahedi Y. Application of edible coating and acidic washing for extending the storage life of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food science and technology international*, 2012, 18(6), 523–530. doi: 10.1177/1082013211433075.
81. Selvarajan E., Veena R., Kumar N.M. Polyphenol oxidase, beyond enzyme browning. A review. Microbial bioprospecting for sustainable development. Springer Nature Singapore, Pte Ltd. J. Singh et al. (eds.) 2018, 203–222. doi: 10.1007/978-981-13-0053-0\_10
82. Shengjun W. Glutathione suppresses the enzymatic and non-enzymatic browning in grape juice. *Food Chemistry*, 2014, 160, 8–10. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.088
83. Shimelis D., Bantte K., Feyissa T. Effects of polyvinyl pyrrolidone and activated charcoal to control effect of phenolic oxidation on *in vitro* culture establishment stage of micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Advances in Crop Science and Technology*, 2015, 3(4). doi: 10.4172/2329-8863.1000184
84. Tabiyeh D.T., Bernard F., Shacker H. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae*, 2006, 726, 201. doi: 10.17660/ActaHortic.2006.726.31
85. Tang W., Newton R.J., Outhavong V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiologia plantarum*, 2004, 122(3), 386–395. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00406.x
86. Teixeira J.B., Siindahl M.R., Kirby E.G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(5), 247–250. doi: 10.1007/BF00233313
87. Tomas-Barberan F.A., Gil M.I., Castaner M., et al. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(3), 583–589. doi: 10.1021/jf960478f
88. Tomas-Barberan F.A., Loaiza-Velarde J., Bonfanti A., Saltveit M.E. Early wound- and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1997, 122, 399–404. doi: 10.21273/JASHS.122.3.399
89. Toor R.K., Sabage G.P., Lister C.E. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(1), 1–10. doi: 10.1016/j.jfca.2004.11.008
90. Toth K., Haapala T., Hohtola A. Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. *Biologia Plantarum*. 1994, 36 (4), 511–517. doi: 10.1007/BF02921170
91. Van Winkle S., Johnson S., Pullman G.S. The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(12), 1175–1182. doi: 10.1007/s00299-003-0637-2
92. Vissers A., Kiskini A., Hilgers R., et al. Enzymatic browning in sugar beet leaves (*Beta vulgaris* L.): influence of caffeic acid derivatives, oxidative coupling and coupled oxidation. *Journal of Agricultural and Food*, 2017, 65(24), 4911–4920. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01897
93. Walailak J. Potential application of ascorbic acid, citric acid and oxalic acid for browning inhibition in fresh-cut fruits and vegetables. *The SciTech Journal*, 2010, 7(1), 5–14. doi: 10.2004/wjst.v7i1.47
94. Walker J.R.L., Ferrar P.H. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1998, 15(1), 457–498. doi: 10.1080/02648725.1998.10647966



95. Wang D., Chen L., Ma Y., et al. Effect of UV-C treatment on the quality of fresh-cut lotus. *Food chemistry*, 2019, 278, 659–664. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.102
96. Wang Y., Feng D.D., Li X.B., Chen J.P. An effective route for the micropropagation of *Medinilla formosana* through ovary culture *in vitro*. *Annals of Forest Research*, 2015, 58(2), 235–243. doi: 10.15287/afr.2015.409
97. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*. 2002, 5(3), 218–223. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X
98. Wu S. Glutathione suppresses the enzymatic and non-enzymatic browning in grape juice. *Food chemistry*, 2014, 160, 8–10. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.088
99. Zamir R., Shah S.T., Ali N. Studies on *in vitro* surface sterilization and antioxidants on guava shoot tips and nodal explants. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 2004, 1(2), 12–16.
100. Zhang H., Liu X., Chen T., et al. Melatonin in apples and juice: inhibition of browning and microorganism growth in apple juice. *Molecules*, 2018, 23(3), 521. doi: 10.3390/molecules23030521
101. Zhou W., Tan R., Xu C. et al. Gibberellic acid inhibits browning, enzyme activity and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase in *Phalaenopsis* leaf explants. *Genes, genomes and genomics*, 2009, 3(1), 68–71.

## Darkening of Plant Tissues during *in vitro* Cultivation and Methods for its Prevention

E. A. BAIMUKHAMEDOVA<sup>1,\*</sup>, and B. R. KULUEV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Federal State Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

\**e-mail*: elvina.baimuhametova@yandex.ru

Received August 6, 2019

Revised November 7, 2019

Accepted March 26, 2020

**Abstract**—One of the most common problems in the plant *in vitro* propagation is the tissue browning and subsequent necrosis, resulting from the oxidation of phenolic compounds, secondary metabolites produced in response to injury and released into the nutrient medium. This process is one of the main reasons for the decrease in the efficiency of callus formation, somatic embryogenesis, regeneration and genetic transformation of plants *in vitro*. Moreover, oxidative browning often leads to culture death. Therefore, the current problems in genetic and cellular engineering of a wide range of plant species can be solved only by preventing or reducing the negative effects of browning of *in vitro* cultures caused by the oxidative transformations of phenolic compounds into quinones toxic to cells. This review is devoted to the description of the main existing methods to prevent these adverse transformations. Various chemicals with antioxidant and adsorbing properties are used in plant biotechnology for this purpose, but there are no general approaches to solve the problem. Although the choice of the method to minimize the negative effect of phenolic compound oxidation depends, first of all, on the species and variety of the plant, some agents, such as ascorbic acid, activated carbon, silver nitrate, can be considered as universal and quite effective in preventing oxidative darkening of explants *in vitro*.

**Key words**: phenolic compounds, oxidative browning, polyphenol oxidase, tissue browning, *in vitro*, microclonal plant propagation

**Funding** – The work was funded on the theme AAAA-A17-117102740098-8.

**doi**: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-26-42