

УДК 633.12:631.5:582:581.1

НАКОПИЧЕННЯ СПОЛУК ФЕНОЛЬНОЇ ПРИРОДИ В КУЛЬТУРІ ТРАНСФОРМОВАНИХ КОРЕНІВ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ ЕКСПЛАНТІВ ГРЕЧКИ ЗВИЧАЙНОЇ (*Fagopyrum esculentum* Moench)

О. В. Ситар^{1,2}А. М. Габр^{2,3}Н. Ю. Таран¹І. М. Сметанська^{2,4}¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна²Берлінський технічний університет, Німеччина³Національний дослідний центр, Каїр, Єгипет⁴Університет прикладних наук, Вайнцбах, Німеччина

E-mail: o_sytar@ukr.net

Отримано 28.05.2012

Досліджували параметри росту культури трансформованих коренів, вміст загальних фенолів та особливості синтезу фенольних сполук у культурах трансформованих коренів, що їх було одержано з різних джерел експлантів гречки *Fagopyrum esculentum* за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* штам А4. Використовували методи отримання трансформованої культури коренів та визначення загальних фенолів, газорідинної хроматографії, полімеразної ланцюгової реакції. Встановлено зростання вмісту загальних фенолів у трансформованих коренях гречки з різних джерел експлантів (корені, листки, стебла). У досліджуваних культурах ідентифіковано високий вміст хлорогенової, *p*-гідроксибензойної, *p*-анісової та кофейної кислот, що свідчить про можливість їх промислового одержання. Максимальний ріст культури трансформованих коренів дорівнював 21,2 г/л у культурі з коренями, 17,7 г/л — з листками та 14,6 г/л — зі стеблами на 3-й тиждень після перенесення. Вбудовування гена *rol B* до трансформованих коренів у рослин гречки за допомогою *Ri*-плазмід *Agrobacterium rhizogenes* було підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Ключові слова: *Fagopyrum esculentum* Moench, феноли, фенольні кислоти, *Agrobacterium rhizogenes*, культура трансформованих коренів.

Антиоксиданти відіграють важливу роль в захисті організму від дії оксидативного стресу, спричиненого вільними радикалами, які є активними молекулами, що містять один чи кілька неспарених електронів, а тому вони дуже нестійкі й ушкоджують інші молекули, вилучаючи з них електрони з метою досягнення стабілізації [1, 2]. На сьогодні в світі ведуть активний пошук джерел антиоксидантів рослинного походження, серед яких значне місце посідають сполуки фенольної природи.

Гречку звичайну (*Fagopyrum esculentum* Moench) визнано як харчовий і дієтичний продукт у багатьох країнах світу, оскільки вона містить, зокрема, багато фенолів [3], флавоноїдів, вітамін Е [4] та різні амінокислоти [5]. Рослини гречки мають вищий вміст загальних фенолів та більшу антиоксидантну активність порівняно з рослинами амаранту, пшениці й лободи [6]. Вони є найповнішим джерелом антиоксидантів серед зернових та псевдозернових культур [7, 8].

Основні фенольні речовини — це вторинні метаболіти: рутин, хлорогенова кислота та гіперозид, що характеризуються високою антиоксидантною активністю [9]. Накопичення хлорогенової кислоти, можливо, пов'язано із синтезом кверцетин-3-О-рутинозиду та ціанідин-3-галактозиду [10, 11]. Вміст рутину і кверцетину в гречці значною мірою залежить від умов культивування та сорту [12, 13]. Загалом рівень рутину та кверцетину в гречаній крупі становить близько 0,20 мг/г та 0,001 мг/г, відповідно. Вегетативна маса гречки містить більше рутину (0,84–4,41 мг/г) та кверцетину (0,009–0,029 мг/г) [13]. Гречка татарська є оптимальним джерелом рутину, оскільки її крупа має рівень рутину 80,94 мг/г. Крім рутину та кверцетину, в екстрактах гречаної крупы (*F. esculentum* Moench) було ідентифіковано чотири катехіни з високою антиоксидантною активністю: епікатехін, катехін 7-О- β -D-глюкопіранозид, епікатехін 3-О-*p*-гідроксибензоат та епікатехін 3-О-(3,4-ди-О-

метил)-галат. Вони характеризуються вищою порівняно з рутином антиоксидантною активністю [14, 15]. Поряд із цим на сьогодні в літературі є мало даних стосовно вмісту фенольних кислот, що також мають антиоксидантні властивості.

Відомо, що культура трансформованих коренів має сильно диференційовані тканини і сприяє стабільному та екстенсивному продукуванню вторинних метаболітів, тимчасом як інші культури клітин рослин є генетично та біохімічно нестійкими і синтезують корисні вторинні метаболіти переважно у невеликій кількості [16].

Трансформовані корені, інфіковані *Agrobacterium rhizogenes*, характеризуються високими темпами росту та генетичною стабільністю. Дослідження вмісту загальних фенолів і продукції фенольних кислот у культурі трансформованих коренів *F. esculentum* з коренями, стеблами, листками як джерелами експлантата для трансформації раніше не проводили. Культуру трансформованих коренів гречки (*F. esculentum* Moench) досліджували стосовно параметрів росту та певних шляхів трансформації [17–19], однак дані щодо вмісту сполук фенольної природи з екстрактів культури трансформованих коренів *F. esculentum* з різних джерел експлантів невідомі. Тому метою роботи було визначення параметрів росту культури трансформованих коренів, вмісту загальних фенолів та синтезу фенольних сполук у культурах трансформованих коренів, одержаних з різних джерел експлантів гречки за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* штам А4.

Матеріали і методи

Стерилізація насіння та умови проростання

Насіння гречки (сорт Антарія) було стерилізовано промиванням поверхні в проточній воді з милом протягом 20 хв в асептичних умовах за ламінарного потоку повітря в камері з промиванням 70%-м етанолом протягом 1 хв і замочуванням на 20 хв у 10%-му розчині гіпохлориту натрію. Після замочування насіння тричі промивали в стерильній дистильованій воді. П'ять насінин розміщували базально на агарному живильному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) [20] у чашках Петрі (100 x 15 мм). Середовище МС із сахарозою (30 г/л) та агаром (8 г/л), рН 5,8, стерилізували в автоклаві при 121 °С упродовж 25 хв. Насіння проростало в ростовій камері у стандартних

умовах за дії люмінесцентної лампи з потоком частинок розміром 35 мкмоль с⁻¹м⁻² та 16/8-годинним фотоперіодом при температурі 25 °С.

Культивування Agrobacterium rhizogenes

Культуру *Agrobacterium rhizogenes* штам А4 витримували на живильному середовищі МҮА (5,0 г/л дріжджового екстракту, 0,5 г/л казамінової кислоти, 8,0 г/л маніту, 2,0 г/л сульфату амонію, 5,0 г/л NaCl та 15 г/л агару) [21] протягом 48 год при 28 °С у темноті. Один клон вирощували упродовж 24 год у 20 мл рідкого середовища МҮА за 28 °С на роторному шейкері при 100 об/хв у темноті.

Культура трансформованих коренів

Стебла, листки та корені відділили від рослин, вирощених за умов *in vitro* (на 21-й день) і використовували як експланти для сумісного з *A. rhizogenes* культивування. Стебла (2 см), листки з черешками та корені (2–3 см завдовжки та 3 мм завширшки) відділили від загальної вегетативної маси рослини. Потім кожен експлант окремо помістили в бактеріальну суспензію на 5 хв. Експланти залишали на сухому стерильному фільтрувальному папері для видалення надлишку бактерій та інкубували в темноті за 28 °С в колбі Ерленмеєра на 200 мл з додаванням 50 мл розчину гормонів у середовищі МС із 30 г/л сахарози на роторному шейкері при 100 об/хв. Неінфіковані експланти (контроль) культивували за аналогічних умов. Після 24 год сумісного культивування експлантів тканини перемістили на нове гормональне середовище МС із 30 г/л та 500 мг/л цефотаксиму для знешкодження бактерій, а потім інкубували в темноті. Численні трансформовані корені було одержано шляхом культивування упродовж 2 тижнів. Трансформовані корені відокремили від експлантів тканин і перенесли в темноті за 25 °С на рідке середовище МС із гормонами. Після повторного перенесення на свіже середовище отримали швидкозрослі культури трансформованих коренів. Потім ізольовані корені (300 мг) перенесли на 50 мл рідкого середовища МС, що містило 30 г/л сахарози у флаконах на 200 мл. Культуру трансгенних коренів культивували при 25 °С на роторному шейкері (100 об/хв) у ростовій камері за стандартних 16/8 г умов фотоперіоду. Після трьох тижнів культивування культури трансгенних коренів було відібрано й визначено вміст загальних фенолів та фенольних кислот. Для кожної культури

аналізували шість колб і двічі повторювали експеримент.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Геномну ДНК різних трансгенних культур гречки було ідентифіковано методом ПЛР та виділено за допомогою набору для екстракції ДНК (мастер-Р-комплект геномного очищення ДНК, A1120, Promega, США). ПЛР проводили із застосуванням детектующого ампліфікатора ДТ-322. Геномну ДНК, використовувану як шаблон для ПЛР, було виділено з коренів шляхом вирізання фрагментів з інфікованих та неінфікованих рослин (контроль). Для дослідження активності гена *rolB* використовували праймери 5'-АСТАТАГСАААССССТССТГС-3' та 5'-ТТСАГГТТТАСТГСАГСАГГС-3, а також амплікон розміром 652 п.н. (GmbH, Ульм, Німеччина). Підсилення циклу було забезпечено процесом денатурації при 95 °С протягом 1 хв, відпалом — 55 °С, 1 хв, та синтезом — 72 °С, 1 хв. Після 30 повторів термічного циклу та кінцевої елонгації при 72 °С упродовж 5 хв продукти ампліфікації аналізували на 1,5% -му агарозному гелі.

Підготовка зразків для визначення вмісту сполук фенольної природи

Зразки отримували в два етапи. Спочатку 0,02 г сухого матеріалу переносили в епендорфи, додаючи 1 мл дистильованої води. Зразки нагрівали 15 хв при 95 °С. Потім рослинний матеріал центрифугували 5 хв (12 000 об/хв, 25 °С). Екстракт повторно переносили в новий епендорф. До супернатанта знову додавали 1 мл дистильованої води і нагрівали 10 хв при 95 °С. Супернатант центрифугували 5 хв (12 000 об/хв, 25 °С). Екстракт знову переносили в новий епендорф. Усі зразки було проаналізовано шість разів. Вміст загальних фенолів визначали з реагентом Фоліна [22].

Визначення складу фенольних кислот за допомогою високоефективної рідинної хроматографії

20 мг сухого рослинного матеріалу екстрагували 15 хв із 750 мкл 70% -го метанолу в ультразвуковій бані (Sonorex цифровий 10p, Bandelin) на льоду. Зразки центрифугували 5 хв при 6 000 об/хв. Супернатанти відбирали, а зразки повторно екстрагували двічі з 500 мкл 70% -го метанолу. На наступному етапі зразки доводили до 1 мл 40% -м ацетонітрилом. Для фільтрації зразків використовували фільтр 0,22 мкмоль, а потім

аналізували за допомогою високоефективної рідинної хроматографії системою Dionex P680A, що має насос, ASI-100 автоматизоване введення проби, колонку AcclaimPA C16 (3 мкм, 2,1×150 мм, Dionex) та PSA-100 фотодіод масиву детекторів (Dionex) і програмне забезпечення Chromeleon 6.8 (Dionex, США). Колонка працює при температурі 35 °С. Рухома фаза складалась із 0,1% фосфорної кислоти у високоочищеній воді, що використовується у високоефективній газорідинній хроматографії (елюент А), та 40% ацетонітрилу в цій воді (елюент Б) [23]. Багатоступінчастий градієнт застосовували для всіх розділень з початкового об'єму ін'єкції 40 мкл за швидкості потоку 0,4 мл/хв. Багатоступінчастий градієнт виглядав таким чином: 0–1 хв: 0,5% елюент В; 1–10 хв: 0,5–40% елюент В; 10–12 хв: 40% елюент В; 12–18 хв: 40–80% елюент В; 18–20 хв: 80% елюент В; 20–24 хв: 80–99% елюент В; 24–30 хв: 99–100% елюент В; 30–34 хв: 100–0,5% елюент В; 34–39 хв: 0,5% елюент В. Одночасний моніторинг було виконано за 290, 330 та 254 нм і швидкості потоку 0,4 мл/хв. Кількість фенольних кислот розраховували на основі піків при 290 нм проти стандартів і з порівнянням спектрів газорідинної хроматографії [24]. Ідентифікацію та якісне оцінювання фенольних кислот здійснювали, порівнюючи час пробігу та площі піків екстрактів щодо стандартів фенольних кислот (хлорогенова, кофейна, корична, кумарова, розмаринова та синапова).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Excel. Повторюваність дослідів була шестикратною. Достовірність різниці отриманих даних розраховано з використанням статистичного аналізу (ANOVA, SigmaStat 9,0).

Результати та обговорення

Культура трансформованих коренів

Культуру трансформованих коренів (*Fagopyrum esculentum* Moench) отримували з трьох різних джерел експлантів (корені, листки і стебла), що були інокульовані штамом A4 *Agrobacterium rhizogenes*. Після двох днів сумісного з *Agrobacterium rhizogenes* культивування експланти тканин було трансформовано для вирощування на гормональному середовищі МС, що містить 500 мг/л цефотаксиму для знешкодження *A. rhizogenes*. Видимі корені сформувались у різних експлантів після 5–7 днів на місці бактеріальної ін'єкції. Через 10–14 днів інкубування корені росли швидшими темпами.

Після чотирьох тижнів культивування трансформовані корені з різних експлантів вирізали з некротичних тканин експлантів та пересівали на свіже середовище МС. Ізольовані трансформовані корені з кожного джерела культивували в рідкому середовищі МС протягом трьох тижнів і досліджували їх ріст в шести колбах щотижня. Під час періоду культивування (рис. 1) суха маса коренів збільшувалася з початкового рівня 0,3 г/л до 21,2 г/л. Максимальний ріст 21,2, 17,7 та 14,6 г/л було ідентифіковано через три тижні в коренях, листках та стеблах відповідно.

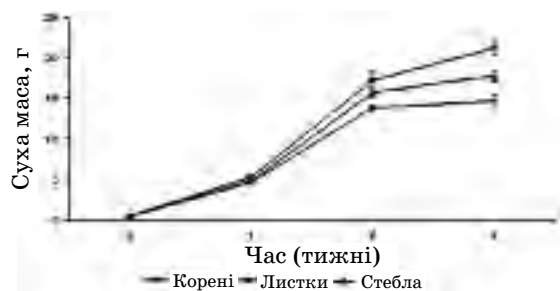


Рис. 1. Накопичення сухої маси в трансформованих коренях гречки різних джерел експлантів, вирощених на рідкому середовищі МС упродовж трьох тижнів

Полімеразна ланцюгова реакція

Відомо, що ген *rol B* Rі-плазміді *Agrobacterium rhizogenes* відповідає за індукцію трансформації коренів у рослин. Аби встановити включення *rol*-генів та виявити трансформацію, було проведено ПЛР за допомогою праймерів, специфічних (або комплементарних) гену *rol B* (рис. 2), яка підтвердила, що ген *rol B* був присутній у всіх трансформованих експлантах коренів, листків та стебел.

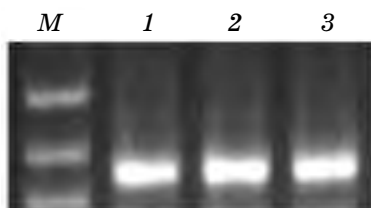


Рис. 2. Аналіз результатів ампліфікації фрагмента гена *rol B* з різних експлантів трансформованих коренів гречки звичайної *Fagopyrum esculentum* (Moench): М — маркер молекулярної маси (652 п.н.); 1 — стебло; 2 — листки; 3 — корені

Вміст загальних фенолів

Результати досліджень показали зростання вмісту загальних фенолів у трансформованих коренях гречки з різних джерел експлантів гречки звичайної. Найбільше зростання було відзначено для трансформованих коренів гречки з листків та коренів.

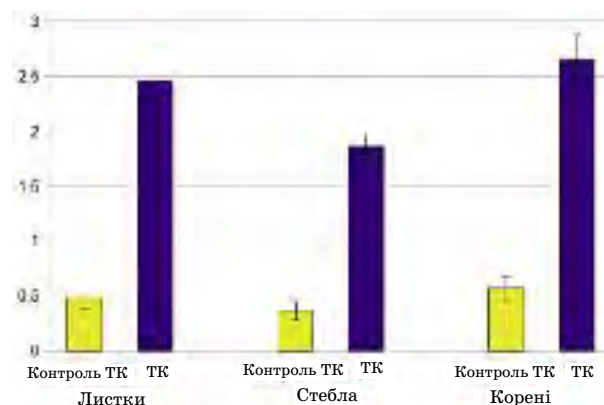


Рис. 3. Вміст загальних фенолів у трансформованих коренях гречки з різних джерел експлантів гречки звичайної *Fagopyrum esculentum* Moench: (мг/г сухої речовини), ТК — трансформовані корені

Попередніми дослідженнями було показано, що вміст загальних фенолів зростає у культурі трансформованих коренів шавлії (*Salvia miltiorrhiza*) [25]. Також він був вищий у культурі трансформованих коренів анісу *Pimpinella anisum* L. (з коренів як джерела експланту) [26]. Зростання продукції фенолів було відзначено у трансформованих коренів гречки звичайної, рівень продукції відрізнявся у різних морфологічних фенотипів гречки татарської *Fagopyrum tataricum* Gaertn [27].

Аналіз складу фенольних кислот

Трансформація коренів за допомогою *A. rhizogenes* характеризується високими темпами росту, генетичною стабільністю та зростанням рівня певних гормонів. Це культурі генетично трансформованих коренів, які можуть продукувати підвищений рівень вторинних метаболітів порівняно з рослинами, що ростуть за нормальних умов [28].

Ізольовані трансформовані корені гречки в рідкому середовищі відзначаються високою продуктивністю рутину, глікозидів та флавонолів [19]. Концентрація фенольних сполук у трансформованих коренях гречки татарської була в кілька разів вищою порівняно з контролем [29].

Відмінності в продуктивності фенольних сполук у культурі трансформованих коренів гречки було досліджено раніше [17, 18]. Культура трансформованих коренів гречки *Fagopyrum tataricum* після 21 доби культивування продукує (-)-епігалокатехін, хлорогенову та кавові кислоти, рутин [27].

Серед фенольних сполук особливе місце посідають фенольні кислоти, які містяться

в рослинах у вільній формі у вигляді глікозидів і можуть бути інтегровані в більші молекули у формі ефірів. Вони поширені як депсиди — міжмолекулярні ефіри, що складаються з однієї чи різних фенольних кислот, зокрема кавової, кумарової, ферулової, галової. Депсиди — це також хлорогенова, а також ізохлорогенова, елагова, літоспермова та розмаринова кислоти. Деякі фенольні кислоти мають виражені антиоксидантні властивості [30].

У культурі трансформованих коренів гречки з різних джерел експлантів (корені, листки та стебла) було ідентифіковано такі фенольні сполуки: *p*-гідроксибензойна кислота, хлорогенова кислота, ванілінова кислота, кавова, *p*-кумарова, гесперитинова, *p*-анісова та цинамова кислоти (таблиця). Також було виявлено високий вміст *p*-гідроксибензойної, гесперитинової та *p*-анісової кислот. Вміст фенольних кислот був різним у варіантах з різними джерелами експлантів у культурі трансформованих коренів. Так, для трансформованих коренів гречки з коренів були характерні більш високі показники акумуляції ідентифікованих фенольних кислот порівняно з культурами трансформованих коренів гречки з листків та стебел. Однак не для всіх культур трансформованих коренів гречки з різних джерел експлантів було виявлено високу інтенсивність синтезу певних фенольних кислот порівняно з контролем.

Показано, що *p*-гідроксибензойна кислота підвищує непроникність клітинної стінки, що призводить до збільшення опору інфекції в культурі трансформованих коренів дурману [31]. У трансформованих тканинах дурману було виділено бактеріальний ензим 4-гідроксицинамол-КоА гідратазу / ліази та показано його зв'язок з накопиченням *p*-гідроксибензойної кислоти в розчинній формі [32]. Це було також встановлено (390 мкг/г сухої маси) для культури трансформованих коренів *Daucus carota* після 7 діб інкубації. У нашій роботі в культурі трансформованих коренів гречки *F. esculentum* з коренями як джерелом експланта вміст розчинної *p*-гідроксибензойної кислоти збільшився на 12% порівняно з контролем і становив відповідно 0,455 мкг/г сухої маси.

Хлорогенова кислота є поширеним рослинним метаболітом, який активується захисною системою за певних форм стресу [33].

Аналіз метанольних екстрактів культури трансформованих коренів ехінацеї пурпурної за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії показав високий вміст хлорогенової кислоти (0,93 мкг/г сухої речовини) [34]. Також високий вміст хлорогенової кислоти було встановлено в екстрактах культури трансформованих коренів *Lactuca virosa* [35]. У культурі трансформованих коренів *F. esculentum* виявлено в 3 рази вищу кількість хлорогенової кислоти

Вміст фенольних кислот у трансформованих коренях з різних джерел експлантів гречки звичайної (*Fagopyrum esculentum* Moench) (мг/г сухої речовини)

Фенольні кислоти	Контроль	Культура трансформованих коренів гречки (корені)	Культура трансформованих коренів гречки (листки)	Культура трансформованих коренів гречки (стебла)
<i>p</i> -гідроксибензойна кислота	0,399+0,016	0,455+0,023*	0,441+0,018*	0,432+0,0193*
Кофеїнова кислота	0,013+ 0,002	0,025+0,003*	0,025+0,005*	0,023+0,019*
Хлорогенова кислота	0,035+0,007	0,115+0,008*	0,109+0,010*	0,103+0,006*
Ванілінова кислота	0,024+0,002	0,029+0,003*	0,025+0,002	0,025+0,002
<i>p</i> -кумарова кислота	0,013+0,002	0,020+0,007	0,018+0,004*	0,016+0,005
Гесперитинова кислота	0,11+0,002	0,116+0,002	0,110+0,004	0,109+0,003
<i>p</i> -анісова кислота	3,43+0,180	3,891+0,250*	3,752+0,198*	3,560+0,201
Цинамова кислота	0,035+0,006	0,042+0,014	0,034+0,008	0,038+0,007

Примітка: * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем.

порівняно з контролем. Максимальний вміст хлорогенової кислоти був у культурі трансформованих коренів з коренями як джерелом експлантів (0,115 мг⁻¹ г сухої маси). Вміст *p*-анісової кислоти збільшився на 12%, а кавової кислоти — вдвічі в культурі трансформованих коренів з коренями порівняно з контролем. Значне збільшення вмісту *p*-анісової та кавової кислот спостерігали у варіантах культури трансформованих коренів з джерелом експланту з листків та стебел, а також і в культурі трансформованих коренів, яку було отримано після щеплення зі стерильними молодими стеблами *Fagopyrum tataricum* з *Agrobacterium rhizogenes* R1000 [27]. Кавову кислоту було ідентифіковано в етанольних екстрактах культури трансформованих коренів *Salvia miltiorrhiza* як сполуку з протимікробною та протигрибковою активністю [36].

Вміст ванілінової, *p*-кумарової, гесперитинової та цинамової кислот як у культурі трансформованих коренів експлантів різних джерел (корені, листки та стебла), так і в контрольних варіантах був без суттєвих змін.

Таким чином, результати досліджень продемонстрували, що культура трансфор-

мованих коренів є альтернативним засобом одержання *p*-гідроксibenзойної, хлорогенової, кавової та *p*-анісової кислот з *F. esculentum*. З метою поліпшення вмісту вторинних метаболітів для продукування за умов *in vitro* важливим чинником є вибір оптимальних джерел експлантів з культури трансформованих коренів.

Доведено отримання культури трансформованих коренів із різних джерел експлантів (корені, листки та стебла) з гречки звичайної. У разі культивування в рідкому середовищі культури показали стабільний ріст та накопичення біомаси. Окрім того, культура трансформованих коренів синтезує фенольні кислоти і характеризується підвищеним вмістом загальних фенолів. У досліджуваних культурах було ідентифіковано високий вміст хлорогенової, *p*-гідроксibenзойної, *p*-анісової та кофейної кислот. Ці культури є альтернативним засобом одержання фенольних кислот з *F. esculentum*. Молекулярний аналіз ПЛР підтвердив факт вбудовування гена *rol B* у трансформовані корені гречки R-плазмідями *Agrobacterium rhizogenes*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ali S. S., Kasoju N., Luthra A. et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants // Food Res. Int. — 2008. — V. 41. — P. 1–5.
2. Darley-Usmar V., Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system // Pharm. Res. — 1996. — V. 13. — P. 649–662.
3. Hagels H., Lapke C., Schilcher H., Riedel E. Comparison of the distribution on free amino acids and phenolics compounds in *Fagopyrum esculentum* Moench // Pharm. Pharmacol. Lett. — 1997. — V. 7. — P. 113–115.
4. Sedej I., Mandi C. A., Saka C. M. et al. Comparison of antioxidant components and activity of buckwheat and wheat flours // Cereal Chem. — 2010. — V. 87. — P. 387–392.
5. Golisz A., Lata B., Gawronski S., Fujii Y. Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat // Weed Biol. Manag. — 2007. — V. 7. — P. 164–171.
6. Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arend E. K., Gallagher E. Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking // Food Chem. — 2010. — V. 119. — P. 770–778.
7. Gallardo C., Jimenez L., Garcia-Conesa M. T. Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity of selected grain fractions // Ibid. — 2006. — V. 99. — P. 455–463.
8. Gorinstein S., Lojek A., Cizhacek M., Pawelzik E. et al. Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals // Intern. J. Food Sci. Technol. — 2008. — V. 43, N 4. — P. 629–637.
9. Azuma K., Nakayama M., Koshioka M. et al. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. // J. Agric. Food Chem. — 1999. — V. 47. — P. 3963–3966.
10. Lancaster J. E. Regulation of skin color in apples // Crit. Rev. Plant Sci. — 1992. — V. 10. — P. 487–502.
11. Mohamed A. A., Patricia S. W., Anthon D. J. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples // Sci. Hortic. — 2001. — V. 88. — P. 289–298.

12. Oomah B. D., Mazza G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat // J. Agric. Food Chem. — 1996. — V. 44. — P. 1746–1750.
13. Steadman K. J., Burgoon M. S., Lewis B. A. et al. Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions // Ibid. — 2001. — V. 81. — P. 1094–1100.
14. Watanabe M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats // Ibid. — 1998. — V. 46, N 3. — P. 839–845.
15. Erlund I., Kosonen T., Alfthan G. et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers // Eur. J. Clin. Pharmacol. — 2000. — V. 56. — P. 545–553.
16. Zhi-Bi H., Min D. Hairy roots and its application in plant genetic engineering // J. Integr. Plant Biol. — 2006. — V. 48. — P. 121–127.
17. Trotin F., Moumou Y., Vasseur J. Flavanol production by *Fagopyrum esculentum* hairy and normal root cultures // Phytochemistry. — 1993. — V. 32. — P. 929–931.
18. Lee S. Y., Cho S. I., Park M. H. et al. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) // Prep. Biochem. Biotechnol. — 2007. — V. 37. — P. 239–246.
19. Kim Y. K., Xu H., Park W. T. et al. Genetic transformation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) with *Agrobacterium rhizogenes* and production of rutin in transformed root cultures // Austral. J. Crop Sci. — 2010. — V. 4, N 7. — P. 485–490.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plantarum. — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
21. Petit A., Tempe J. Isolation of *Agrobacterium* Ti-plasmid regulatory mutants // Mol. Gen. Genet. — 1978. — V. 167. — P. 147–155.
22. Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // Am. J. Enol. — 1965. — V. 16. — P. 144–158.
23. Cai Z., Kastell A., Mewis I. et al. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* // Plant Cell Tiss. Organ Cult. — 2012. — V. 108. — P. 401–409.
24. Mewis I., Smetanska I., Muller C., Ulrichs C. Specific polyphenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Appl // Biochem. Biotechnol. — 2011. — V. 164, N 2. — P. 148–161.
25. Yan Q., Shi V., Ng J., Yong Wu J. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots // Plant Sci. — 2006. — V. 170, N 4. — P. 853–858.
26. Andarwulan N., Shetty K. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.) // J. Agric. Food Chem. — 1999. — V. 47, N 4. — P. 1776–1780.
27. Park N., Xiao H. Li., Uddin M. R., Un Park S. G. Phenolic compound production by different morphological phenotypes in hairy root cultures of *Fagopyrum tataricum* Gaertn // Arch. Biol. Sci. Belgrade. — 2011. — V. 63, N 1. — P. 193–198.
28. Srivastava S., Srivastava A. K. Hairy root culture for mass — production of high — value secondary metabolites // Crit. Rev. Biotechnol. — 2007. — V. 27, N 1. — P. 29–43.
29. Kim Y. K., Li X., Xu H. et al. Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) // J. Crop. Sci. Biotechnol. — 2009. — V. 12, N 1. — P. 53–57.
30. Sroka Z. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics // Z. Naturforsch. — 2005. — V. 60 C. — P. 833–843.
31. Horváth E., Pál M., Szalai G., Páldi E., Janda T. Exogenous 4 — hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants // Biologia Plantarum. — 2007. — V. 51, N 3. — P. 480–487.
32. Mitra A., Mayer M. J., Mellon F. A. et al. 4-Hydroxycinnamoyl-CoA- hydratase/lyase, an enzyme of phenylpropanoid cleavage from *Pseudomonas*, causes formation of C6-C1 glucose conjugates when expressed in hairy roots of *Datura stramonium* // Planta. — 2002. — V. 15. — P. 79–89.
33. Grace S. C., Logan B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. — 2000. — V. 355. — P. 1499–1510.
34. Liu C.-Z., Abbasi B. H., Gao M. et al. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea* // J. Agric. Food Chem. — 2006. — V. 54, N 22. — P. 8456–8460.
35. Stojakowska A., Malarz J., Szewczyk A., Kisiel W. Caffeic acid derivatives from a hairy root culture of *Lactuca virosa* // Acta Physiol. Plant. — 2012. — V. 34. — P. 291–298.
36. Zhao J., Lou J., Mou Y. et al. Diterpenoid tanshinones and phenolic acids from cultured hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* bunge and their antimicrobial activities // Molecules. — 2011. — V. 16. — P. 2259–2267.

**НАКОПЛЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ
ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В КУЛЬТУРЕ
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ
РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ
ЭКСПЛАНТОВ ГРЕЧКИ ОБЫКНОВАННОЙ
(*Fagopyrum esculentum* Moench)**

О. В. Ситар^{1,2}
А. М. Габр^{2,3}
Н. Ю. Таран¹
И. Н. Сметанская²

¹Киевский национальный университет имени
Тараса Шевченко, Украина;

²Берлинский технический университет,
Берлин, Германия

³Национальный исследовательский центр,
Каир, Египет

⁴Университет прикладных наук, Вайнцбах,
Германия

E-mail: o_sytar@ukr.net

Исследовали параметры роста культуры трансформированных корней, содержание общих фенолов и особенности синтеза фенольных соединений в культурах трансформированных корней, полученных из разных источников эксплантов гречки с помощью *Agrobacterium rhizogenes* штамм А4. Использовали методы получения трансформированной культуры корней, определения общих фенолов, газожидкостной хроматографии, полимеразной цепной реакции. Установлено повышение содержания общих фенолов в трансформированных корнях гречки из разных источников эксплантов. В исследуемых культурах было идентифицировано высокое содержание хлорогеновой, *p*-гидроксibenзойной, *p*-анисовой и кофейной кислот, что свидетельствует о возможности их промышленного получения. Максимальный рост культуры трансформированных корней был равен 21,2 г/л в культуре с корнями, 17,7 г/л — с листьями и 14,6 г/л — со стеблями на 3-ю неделю после трансплантации. Встраивание гена *rol B* в трансформированные корни растений гречки с помощью Ri-плазмид *Agrobacterium rhizogenes* подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: *Fagopyrum esculentum* Moench, фенолы, фенольные кислоты, *Agrobacterium rhizogenes*, культура трансформированных корней.

**THE PHENOLS ACCUMULATION
IN TRANSFORMED ROOT CULTURES
OF DIFFERENT EXPLANTS SOURCES
OF COMMON BUCKWHEAT
(*Fagopyrum esculentum* Moench)**

O. V. Sytar^{1,2}
A. M. Gabr^{2,3}
N. Yu. Taran¹
I. M. Smetanska^{2,4}

¹Taras Shevchenko National University
of Kyiv, Ukraine;

²Berlin University of Technology,
Germany

³National Research Center,
Cairo, Egypt

⁴University of Applied Science Weidenbach,
Germany

E-mail: o_sytar@ukr.net

The growth parameters of transformed root cultures, total phenolic content and phenolic acids composition has been studied in root cultures, which were obtained from various explants of buckwheat by *Agrobacterium rhizogenes* strains A4. The methods of obtaining of the transformed root cultures, total phenol estimation, gas-liquid chromatography and polymerase chain reaction has been used. Elevated levels of total phenols in transformed roots of buckwheat from different sources of explants have been found. The high content of chlorogenic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-anisic and caffeic acids has been discovered in the root cultures, which can be used for their industrial production. Maximal root growth was equal 21.2 g/l of dry weight in the roots as source for root culture, 17.7 g/l with leaves and 14.6 g/l with stems at 3 week after placement. Molecular analysis by polymerase chain reaction amplification was confirmed that the *rol B* gene (652 bp) which transferred into hairy roots from Ri-plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* is responsible for induction of root from plant species.

Key words: *Fagopyrum esculentum* Moench., phenols, phenolic acids, *Agrobacterium rhizogenes*, roots.