

UDC 575.222 .7:581.1

Підвищення антиоксидантної активності та активності супероксиддисмутази у трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L.

О. Ю. Кваско, Н. А. Матвєєва

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, Україна, 03680

kvasko.olena@gmail.com

Мета. Визначення антиоксидантної активності (АОА) та активності супероксиддисмутази (СОД) у трансгенних рослинах цикорію з геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини та генами *prtIII* і *bar*. **Методи.** АОА вимірювали методом, заснованим на визначенні кінетики окиснення відновленої форми 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, активність СОД – за інтенсивністю інгібування тетразолу блакитного екстрактом рослин. **Результати.** АОА екстрактів трансформованих рослин перевищує активність контрольних (нетрансгенних) у 1,91–2,59 і 2,04–2,43 разу (гени *prtIII* і *bar* відповідно). Активність СОД виявилася вищою у трансгенних рослин і становить $2,03 \pm 0,46$ – $3,33 \pm 0,54$ (ген *prtIII*) і $2,25 \pm 0,46$ – $2,68 \pm 0,08$ (ген *bar*) ум. од/г сирої маси. **Висновки.** У трансгенних рослин *C. intybus* спостерігається підвищена активність антиоксидантної системи і СОД, що, вірогідно, є реакцією рослин на дію трансформації як стресового фактора. Стресовий стан трансгенних рослин цикорію може бути пов'язаний із перенесенням чужорідних генів до геному рослин.

Ключові слова: генетична трансформація, *Cichorium intybus*, антиоксидантна активність, активність супероксиддисмутази.

Вступ. Генетичну трансформацію застосовують для створення трансгенних рослин як із суто науковою метою (наприклад, дослідження функціонування генів), так і для одержання рослин, що синтезують нові сполуки. Проте останнім часом актуальними є питання щодо безпеки використання рослин із штучно модифікованим геномом [1, 2]. У результаті трансформації можуть змінюватися фізіологічні та біохімічні ознаки рослин [3].

Існують дані, що процес трансформації, зокрема *Agrobacterium*-опосередкованої, є стресом для рослин на кожному з її етапів [4]: культивування *in vitro*, поранення, контакт з мікроорганізмом, селекція, перенесення чужорідного гена до геному рослин, синтез відповідних білків, біологічна активність біл-

ка. Відомо, що однією з реакцій на дію стресових чинників може бути активація антиоксидантних систем захисту клітини, а саме: збільшення кількості низькомолекулярних антиоксидантів та активності ферментів (супероксиддисмутази (СОД), каталази, пероксидази тощо) [5, 6]. Зокрема, за впливу посухи, температурного стресу та ін. утворюються і накопичуються активні форми кисню, що призводить до оксидативного стресу. Такі зміни супроводжуються зростанням активності антиоксидантної системи [5]. Враховуючи вищевикладене, видається цікавим дослідити, чи відбуваються індуковані перенесенням гена (генів) зміни в активності антиоксидантної системи та її компонентів. Мета нашої роботи полягала у визначенні антиоксидантної активності (АОА) та активності СОД трансгенних рослин цикорію *C. intybus* L. з геном інтерферону- $\alpha 2b$

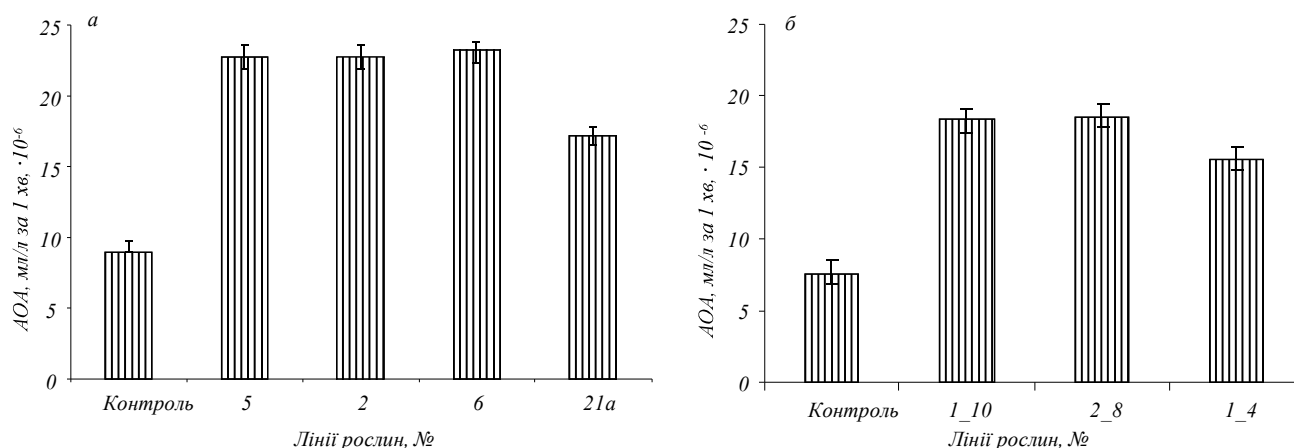


Рис. 1. Антиоксидантна активність трансгенних рослин цикорію з генами *ifn- α 2b* і *nptII* (а) та *ifn- α 2b-bar* (б)

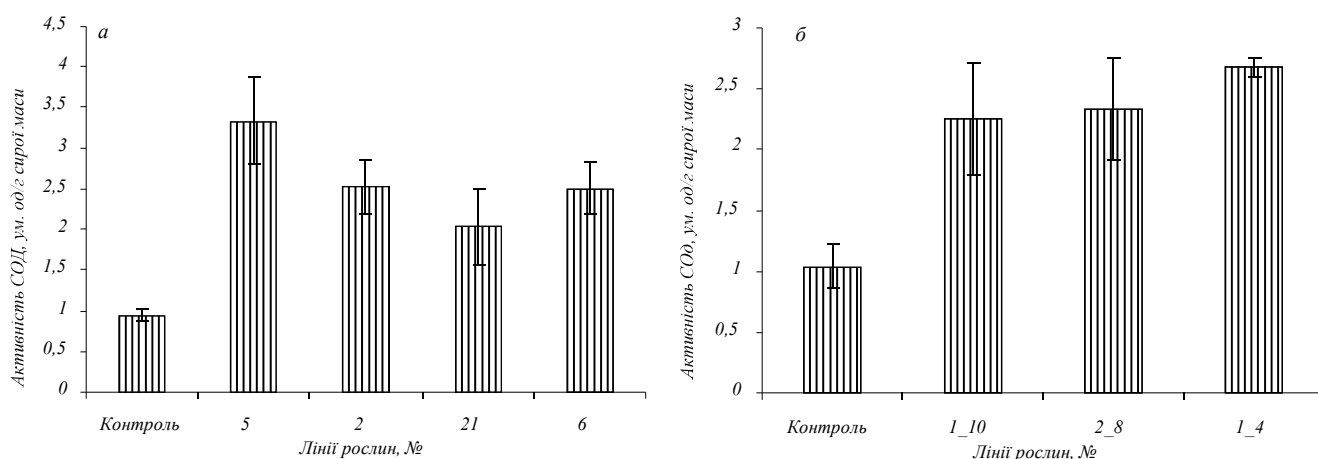


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази у трансгенних рослин цикорію з генами *ifn- α 2b* і *nptII* (а) та *ifn- α 2b-bar* (б)

(*ifn- α 2b*) людини та різними селективними генами *nptII* і *bar*.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження слугували трансгенні рослини *C. intybus* var. *foliosum* Негі з цільовим геном *ifn- α 2b* та селективними генами *nptII* (чотири лінії) і *bar* (три лінії), отримані нами раніше [9, 10]. Рослини-регенеранти культивували на середовищі Мурасиге і Скуга [11] зі зменшеною вдвічі концентрацією макроелементів протягом 30 діб. АОА рослин визначали методом [12] з модифікаціями, активність СОД – як описано в [13]. Результати експерименту обробляли статистично з використанням дисперсійного аналізу однофакторного досліджу.

Результати і обговорення. АОА екстрактів трансгенних рослин цикорію суттєво перевищувала таку нетрансформованих рослин (рис. 1, а, б). Так, АОА

екстрактів трансгенних ліній з генами *ifn- α 2b-nptII* становила $17,15 \pm 0,66$ – $23,20 \pm 0,60$ мл/л за 1 хв (контрольних – $8,97 \pm 0,79$), а екстрактів ліній рослин з генами *ifn- α 2b-bar* – $15,63 \pm 0,89$ – $18,6 \pm 0,84$ мл/л за 1 хв (контрольних – лише $7,67 \pm 0,84$). Дисперсійне відношення *F ϕ* (219,66 і 91,55 для рослин з генами *ifn- α 2b-nptII* і *ifn- α 2b-bar* відповідно) значно перевищувало критичну точку *Fst* (2,5 і 7,59 відповідно за 5 %-го рівня значущості). Таким чином, отримані відмінності є статистично достовірними на рівні надійної ймовірності $P_{0,95}$.

Активність СОД екстрактів з усіх рослин з генами *ifn- α 2b-nptII* виявилася вищою порівняно з контролем відповідно від $2,03 \pm 0,46$ до $3,33 \pm 0,54$ та $0,94 \pm 0,07$ ум. од./г сирої маси (рис. 2, а). Разом з тим, дисперсійне відношення *F ϕ* відповідало 0,89, що набагато менше за *Fst* (5,99 за 5 %-го рівня значущо-

сті). Отже, достовірність отриманих відмінностей в активності СОД не підтвержується. Поряд з цим, порівняння факторіальної і залишкової дисперсії свідчить про необхідність збільшення виборки для підтвердження достовірності наявних відмінностей.

Активність СОД екстрактів з рослин із геном *bar* дорівнює $2,25 \pm 0,46$ – $2,68 \pm 0,08$ ум. од/г сирової маси, що є в 2,17–2,58 рази більше, ніж активність у контролі (рис. 2, б). Дисперсійне відношення *F_ф* становить 12,25, що набагато більше за *F_{ст}* (7,59 при $P_{0,05}$). Відмінності в активності СОД трансгенних і контрольних рослин є статистично достовірними при зазначеному рівні значущості. Отже, трансгенні рослини цикорію відрізняються від контрольних підвищеним рівнем антиоксидантної активності та СОД.

Культивування *in vitro* можна вилучити з можливих причин змін АОА та активності СОД у трансгенних рослин цикорію, оскільки як трансгенні, так і контрольні рослини вирощували *in vitro* і вони пройшли етап регенерації. Контакт з бактеріями і селекція, скоріш за все, також не обумовлюють варіювання АОА та активності СОД у трансгенних рослин, тому що дослідження проводили через два роки після їхнього отримання. Зміни АОА та активності СОД відбуваються як у рослин з геном *nptII*, так і *bar*. Ймовірно, що тип селективного гена не є причиною змін.

Аналіз отриманих рослин на наявність трансгенів показав, що для всіх досліджуваних ліній перенесення як цільового, так і селективних генів спостерігається. Отже, підвищення АОА та активності СОД трансформованими рослинами може бути пов'язане з наявністю чужорідних генів. Транскрибування гена *ifn-α2b* виявлено лише в одній лінії рослин з геном *nptII* та в усіх рослинах з геном *bar*. Таким чином, немає підстав однозначно стверджувати, що транскрибування трансгенів є причиною зростання АОА та активності СОД у трансгенних рослин.

Рослини з підвищеним рівнем АОА та активності СОД мають більшу резистентність до оксидативних пошкоджень, спричинених дією стресових факторів – посухи, засолення тощо [14, 15]. Тому отримані трансгенні рослини цикорію з високим рівнем АОА можуть бути стійкішими до дії зазначених чинників і використані у біотехнології та селекції.

Висновки. Трансгенні рослини *C. intybus* мають підвищену активність антиоксидантної системи та ферменту супероксиддисмутази у порівнянні з контрольними нетрансформованими рослинами, що може бути реакцією рослинного організму на вплив трансформації як стресового фактора. Стресовий стан трансгенних рослин цикорію, ймовірно, пов'язаний із перенесенням чужорідних генів до геному рослин.

O. Yu. Kvasko, N. A. Matvieieva

Increasing of antioxidant and superoxide dismutase activity in chicory transgenic plants

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine
148, Akademika Zabolotnogo Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

Aim. Determination of the antioxidant activity (AOA) and superoxide dismutase (SOD) activity in transgenic chicory plants carrying the human interferon $\alpha 2b$ target and *nptII* or *bar* selective genes. **Methods.** AOA was measured by a method based on the determination of kinetics of the reduced 2,6-dichlorophenolindophenol oxidation. SOD activity was assayed using the system consisting of methionine, riboflavin, and nitroblue tetrazolium. **Results.** Antioxidant activity of transformed plants extracts was more than 1,91–2,59 and 2,04–2,43 times over the activity of control non-transgenic plants (at *nptII* and *bar* gene presence respectively). SOD activity was higher in transgenic plants than in the control, and was $2,03 \pm 0,46$ – $3,33 \pm 0,54$ U/g weight (*nptII* gene) and $2,25 \pm 0,46$ – $2,68 \pm 0,08$ U/g weight (*bar* gene). **Conclusions.** Transgenic *C. intybus* plants have higher antioxidant and superoxide dismutase activity compared to non-transgenic plants. The increasing of AOA and SOD activity is a response of plants to transformation stress factor and integration of foreign genes in plant genome.

Keywords: genetic transformation, *Cichorium intybus*, antioxidant activity, superoxide dismutase activity.

E. Ю. Кваско, Н. А. Матвеева

Повышение антиоксидантной активности и активности супероксиддисмутазы у трансгенных растений цикория *Cichorium intybus* L.

Резюме

Цель. Определение антиоксидантной активности (АОА) и активности супероксиддисмутазы (СОД) в трансгенных растениях цикория с геном интерферона $\alpha 2b$ человека и генами *nptII* и *bar*. **Методы.** АОА измеряли методом, основанным на определении кинетики окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия; активность СОД – по интенсивности ингибирования тетразолия голубого экстрактом растений. **Результаты.** АОА экстрактов трансформированных растений превышала активность контрольных (нетрансгенных) в 1,91–2,59 и 2,04–2,43 раза (гены *nptII* и *bar* соответственно). Активность СОД была выше у трансгенных растений и составляла $2,03 \pm 0,46$ – $3,33 \pm 0,54$ (ген *nptII*) и $2,25 \pm 0,46$ – $2,68 \pm 0,08$ (ген *bar*) усл. ед/г сырой массы. **Выводы.** Трансгенные растения *C. intybus* имеют повышенную активность антиоксидантной системы и СОД, что, ве-

роятно, является реакцией растений на трансформацию как стрессовый фактор. Стрессовое состояние трансгенных растений цикория, очевидно, связано с перенесением чужеродных генов в геном растений.

Ключевые слова: генетическая трансформация, *Cichorium intybus*, антиоксидантная активность, активность супероксид-дисмутазы.

REFERENCES

1. Haslberger A. G. Codex guidelines for GM foods include the analysis of unintended effects // Nat. Biotech.–2003.–**21**, N 7. – P. 739–741.
2. Prakash C. S. The genetically modified crop debate in the context of agricultural evolution // Plant Physiol.–2001.–**126**, N 1.– P. 8–15.
3. Shewmaker C. K., Sheehy J. A., Daley M., Colburn S., Ke D. Y. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects // Plant J.–1999.–**20**, N 4.– P. 401–412X.
4. Enikeev A. G., Kopytina T. V., Semenova L. A., Natyaganova A. V., Gamanetz L. V., Volkova O. D. Agrobacterial transformation as complex biotical stressing factor // J. Stress Physiol. Biochem.–2008.–**4**, N 1.–P. 11–19.
5. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci.–2002.–**7**, N 9.–P. 405–410.
6. Bowler C., Montagu M. V., Inze D. Superoxide dismutases and stress tolerance // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.–1992.–**43**.–P. 83–116.
7. Matvieieva N. A., Shachovsky A. M., Gerasymenko I. M., Kvasko O. Yu., Kuchuk N. V. Agrobacterium-mediated transformation of *Cichorium intybus* L. with interferon- α 2b gene // Biopolym. Cell.–2009.–**25**, N 2.–P. 120–125.
8. Kvasko O. Y., Matvieieva N. A., Shahovsky A. M., Kuchuk N. V. Obtaining of transgenic endive *Cichorium endivia* L. and chicory *C. intybus* L. plants // The Bull. Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukraine.–2012.–**10**, N 1.–P. 28–32.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.–1962.–**15**, N 3.–P. 473–497.
10. Semenov V. L., Yarosh A. M. A method of determining the anti-oxidative activity of biological matter // Ukr. Biokhim. Zh.–1985.–**57**, N 3.–P. 50–52.
11. Giannopolities C. N., Ries S. K. Superoxid dismutase. I. Occurrence in higher plants // Plant Physiol.–1977.–**59**, N 2.–P. 309–314.
12. Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* // Plant Cell Environ.–2003.–**26**, N 6.–P. 845–856.
13. Alonso R., Elvira S., Castillo F. J., Gimeno B. S. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis* // Plant Cell Environ.–2001.–**24**, N 9.–P. 905–916.

Received 12.01.13