

## ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 575.827:604.6:582.683.2

### АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ЛИСТКІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО РІПАКУ (*BRASSICA NAPUS* L.) ЗІ СТІЙКІСТЮ ДО ГЕРБІЦИДІВ НА ОСНОВІ ГЛІФОСАТУ І ГЛЮФОЗИНАТУ

© 2015 р. Л. О. Сахно, К. В. Листван, М. В. Кучук

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії  
Національної академії наук України  
(Київ, Україна)*

З метою виявлення можливих біохімічних особливостей гербіцид-стійких рослин ярого ріпаку (*Brassica napus* L.), які мають в своєму ядерному геномі одночасно синтетичний ген *epsps* (надає рослинам стійкості до гліфосату) і ген *bar* (відповідає за стійкість до фосфінотрицину, або глюфозинату), вивчено вміст сумарного розчинного білка, загальну антирадикальну активність тканин листків і активність супероксиддисмутази. Для первинних трансформантів показано достовірне зменшення загальної антирадикальної активності порівняно з нетрансформованими рослинами, вміст сумарного розчинного білка і активність супероксиддисмутази залишалися без змін. Виявлено, що за умов вирощування рослин в асептичних умовах на середовищах без гербіцидів антиоксидантна активність екстрактів листків нетрансформованих рослин достовірно не відрізнялася від активності екстрактів гербіцид-стійких рослин першого і другого покоління. Додавання розчинів гербіцидів Баста (фосфінотрицин) або Ураган Форте (гліфосат) до середовища культивування не впливало на антиоксидантну активність листків біотехнологічних рослин ріпаку.

**Ключові слова:** *Brassica napus*, антиоксидантна активність, гліфосат, глюфозинат, супероксиддисмутаза, сумарний розчинний білок

Стійкий до гербіцидів ріпак (*Brassica napus*, так званий аргентинський ріпак) зареєстрований в Австралії, Канаді, Чилі, Китаї, Європейському Союзі, Японії, Мексиці, Новій Зеландії, Філіппінах, Сінгапурі, Південній Африці, Південній Кореї, США. У Канаді вирощують також трансгенні рослини *Brassica rapa* (раніше *campestris*) (так званий польський ріпак) (<https://isaaa.org/resources/publications/pocketk/10/default.asp>). У 2014 році площа під гербіцид-стійким ріпаком у світі сягала 9 млн. га, що становило 25% площ, зайнятих цією культурою (<http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16>).

Дослідженням з отримання більш ефективних гербіцид-стійких рослин приділяється

*Адреса для кореспонденції:* Сахно Людмила Олександрівна, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
вул. Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна;  
e-mail: [sakhno@icbge.org.ua](mailto:sakhno@icbge.org.ua)

значна увага провідними лабораторіями світу. Існує тенденція до створення нових сортів гербіцид-стійких сільськогосподарських культур з резистентністю до кількох гербіцидів одночасно (Vencill et al., 2012). Отримано рослини ріпаку зі стійкістю до гліфосату і триазинів (Triazine tolerant Roundup Ready canola, Monsanto) (<http://roundupreadycanola.com.au/wp-content/uploads/2014/03/What-is-Triazine-Tolerant-Roundup-Ready-canola1>). Вирощування біотехнологічного ріпаку з одночасною експресією генів стійкості до гербіцидів різних груп може бути більш ефективним порівняно з рослинами, у яких активним є один з таких генів, за рахунок можливості чергування гербіцидів, що робить менш ймовірним виникнення спонтанно стійких дикорослих рослин.

Нині продовжуються дискусії щодо властивостей біотехнологічних рослин та їх потенційної загрози для навколишнього середовища і людини. Виконано багато досліджень з харак-

## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ЛИСТКІВ

теристики фізіологічних та біохімічних особливостей трансгенних рослин із різними гетерологічними генами, показано їх переваги, особливо при культивуванні за несприятливих умов (Reguera et al., 2012; Bhargava, Sawant, 2013; Sakhno, 2013). Антиоксидантна активність тканин характеризує їх здатність протидіяти надмірній кількості активних форм кисню (супероксидний аніон-радикал, гідроксильний радикал, синглетний кисень, пероксид водню), які утворюються внаслідок процесів фотосинтезу, дихання, фотодихання, а також при роботі спеціалізованих ферментативних систем (насамперед, НАДФН-оксидази плазмалеми), особливо за екстремальних умов – високої інсоляції, підвищеної або низької температури, посухи, вимокання, засолення, ураження патогенами (De Gara et al., 2003; Колупаєв, Обозний, 2013). Антиоксидантна активність забезпечується відповідною системою рослин, яка представлена системою ферментів (супероксиддисмутази, пероксидази, каталази) і низкою низькомолекулярних сполук (пролін, глутатіон, токоферолі, аскорбінова кислота, жирні кислоти, поліфеноли (антоціани, флавоноїди, ароматичні оксикислоти). Антиоксиданти захищають клітинні структури рослин від пошкодження їх вільними радикалами (Jaleel et al., 2009). Підвищення антиоксидантної активності позитивно впливає на здатність рослин протистояти стресовим факторам різної природи (Kim et al., 2009; Rai et al., 2012).

Антиоксидантна активність інтенсивно вивчається у різних сільськогосподарських культур (Al-Saikhan et al., 1995; Сареєка et al., 2005; Wojdyło et al., 2007) і рослин, що використовуються у медицині (Kähkönen et al., 1999; Aquil et al., 2006; Dudonné et al., 2009). У трансгенних рослин цей показник досліджували переважно при їх отриманні в результаті генетичної трансформації генами, експресія яких могла б вплинути на антиоксидантний статус (Li et al., 2010; Rai et al., 2012). Дослідження однієї з її складових – активності супероксиддисмутази (СОД) – у гербіцид-стійких рослин ріпаку про-

водили у насінні (Xu et al., 2011). Вивчення цих характеристик, притаманних тканинам листків, дозволить більш детально охарактеризувати створені нами трансгенні рослини ріпаку і виявити можливі біохімічні відмінності від вихідних, нетрансформованих рослин.

У попередніх експериментах на основі районованих в Україні сортів нами отримано нові трансформанти ріпаку, одночасно стійкі до гербіцидів, діючими речовинами яких є гліфосат і глюфозинат (Сахно та ін., 2011, Taranenko et al., 2015). Це було досягнуто в результаті генетичної трансформації з використанням конструкції, що поєднувала синтетичний ген *epsps* і ген *bar*. Показано успадкування введених генів і підтверджено, що їх експресія не впливала на накопичення біомаси і вміст сумарного розчинного білка у отриманих рослин в умовах закритого ґрунту (Сахно та ін., 2015). Виявлено, що активність одного з ферментів антиоксидантної системи рослин – СОД – за умов без стресу подібна у вихідних, нетрансформованих рослин і рослин ріпаку, одночасно стійких до гербіцидів двох різних груп (Sakhno, Slyvets, 2014). Однак загальна антирадикальна активність і активність СОД за умов стресів у отриманих рослин досі не вивчалися. Метою нашого дослідження було охарактеризувати трансгенні рослини ріпаку за антиоксидантною активністю за умов культивування *in vitro* за відсутності і наявності гербіцидів у середовищі культивування.

## МЕТОДИКА

**Рослинний матеріал.** Як контроль використовували культивовані в асептичних умовах (температура +23°C, освітлення 4000-5000 лк при 14/10 год (світло/темрява) фотоперіоді) рослини промислового сорту ярого ріпаку Ексголд. Біотехнологічні рослини ріпаку з трансгенами *bar* і *epsps* були отримані у результаті генетичної трансформації, опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens* з вектором pCB133 (рис. 1), за розробленою нами раніше методикою (Сахно и др., 2008). Аналізували найкращі



**Рис. 1.** Схема вектора pCB133. RB, LB – межі Т-ДНК, Tnos – термінатор гена нопалін синтази, Pnos – промотор гена нопалін синтази, P35S – промотор гена вірусу мозаїки цвітної капусти, Tocs – термінатор гена октопін синтази, TP – транзитний пептид, *epsps* – ген 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат синтази, *bar* – ген фосфінотрицин ацетилтрансферази.

за стійкістю до гліфосату в умовах теплиці лінії: первинний трансформант (T<sub>0</sub>15/133/2) і рослини двох наступних поколінь (T<sub>1</sub>15/133/2/9 і T<sub>2</sub>15/133/2/9), відібрані після самозапилення в умовах теплиці. Лінія T<sub>2</sub>15/133/2/9 охарактеризована як гомозиготна за введеними генами (Сахно та ін., 2015).

Рослини культивували у посудинах Magenta™ Вох на агаризованому безгормональному середовищі MS (Murashige, Skoog, 1962). На початку експерименту рослини черенкували і висаджували верхівкові та пазушні бруньки з одним розвиненим листочком. Пагони лінії T<sub>2</sub>15/133/2/9 і нетрансформовані сорту Ексголд культивувались, окрім цього, разом і на середовищах з додаванням фосфінотрицину (10 мг/л) або гліфосату (2 мг/л). Стерильні розчини гербіцидів додавали до середовищ після автоклавування. Біохімічні показники (загальну антирадикальну активність, вміст сумарного розчинного білка, активність СОД) оцінювали за чотири тижні.

**Біохімічні аналізи.** Рослинний матеріал (100 мг) розтирали з 1 мл 50 мМ Tris-HCl буферу (4°C, рН 8,0) в пробірках на кульовому млині Retsch MM 400 (Німеччина) протягом 3 хв за частоти струшувань 25 об/сек, потім центрифугували при 13000 g (4°C) протягом 15 хв і рідину над осадом використовували для аналізів загальної антирадикальної активності, вмісту сумарного розчинного білка і активності СОД.

Для визначення загальної антирадикальної активності використовували DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил радикал) (Blois, 1958). Вимірювали інтенсивність забарвлення спиртового розчину даного стабільного радикала, що має пурпурово-синє забарвлення, до і після додавання досліджуваних екстрактів. В результаті реакції спиртового розчину радикала і розчину з радикал-поглинаючою активністю радикал відновлюється, при цьому інтенсивність забарвлення суміші зменшується пропорційно до зменшення концентрації вільного радикала. Використовували розчин DPPH у 96% етиловому спирті (концентрація радикала – 10<sup>-4</sup> М); реакцію проводили у 96-лункових мікропланшетах. У кожен лунку планшета додавали розчин радикала та відповідні розведення досліджуваних екстрактів. Об'єм екстрактів, що додавався, становив 20, 10, 5, 2,5, 1,25 та 0,625 мкл; кінцевий об'єм реакційної суміші в лунці – 100 мкл. Реакційну суміш витримували при кімнатній температурі у темряві протягом 30 хв, після чого вимірювали оптичну густину суміші за довжини хвилі 550 нм. Крім цього, ви-

мірювали власну оптичну густину розчинів екстрактів відповідної концентрації у спирті (без додавання DPPH). Як позитивний контроль використовували водний розчин аскорбінової кислоти (10 мг/мл).

Кількісно поглинання вільного радикала виражали як відсоток інгібування і обчислювали за формулою:

$$A_k - A_e / A_k \cdot 100,$$

де:  $A_k$  – оптична щільність контрольного розчину,  $A_e$  – оптична щільність розчину досліджуваного екстракту.

На основі розрахованих відсотків інгібування було побудовано графік залежності величин інгібування забарвлення DPPH від об'єму екстракту. За графіком встановлено об'єм екстракту, що спричиняв 50% інгібування забарвлення вільного радикала (EC<sub>50</sub>).

Активність СОД визначали, використовуючи метод фотохімічного окиснення нітросинього тетразолію (Beyer, Fridovich, 1987). Реакцію з нітросинім тетразолієм проводили в пробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш складалася з 540 мкл 50 мМ Tris-HCl буферу (рН 8,0), 130 мкл 65 мМ метіоніну, 47 мкл 630 мкМ нітросинього тетразолію, 10 мкл рослинного екстракту, 12,5 мкл 1 мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, інші три освітлювали протягом 5 хв в термостаті за температури 23°C лампой білого світла (люмінісцентна лампа T5/G5, модель ELI-230A-T5-8W).

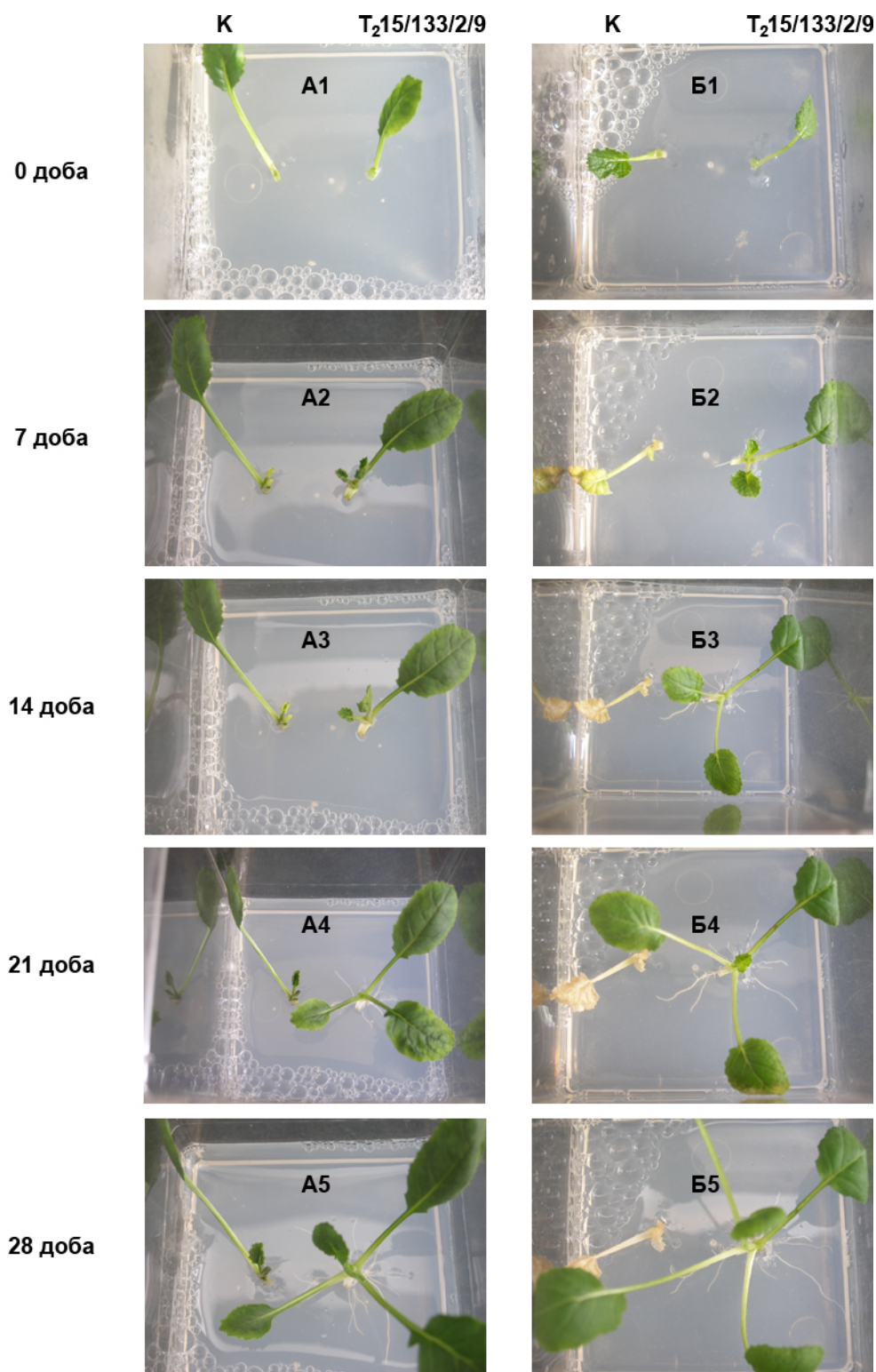
Вміст сумарного розчинного білка (СРБ) в листках рослин оцінювали за методом Бредфорд (Bradford, 1976). Вимірювання проводили на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35 за довжини хвилі 595 нм. Як внутрішній стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

**Статистичний аналіз** проводили за допомогою *t*-критерію Ст'юдента (Лакин, 1990). Експерименти повторювали тричі, у кожному повторі для тестування однієї лінії брали три рослини.

## **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Вихідні і біотехнологічні лінії з трансгенами *epsps* і *bar*, розмножені живцюванням, вирощували на агаризованих середовищах з додаванням гербіцидів або без них. Для біохімічних аналізів брали листки рослин, які культивували протягом 28 діб. На рис. 2 наведені фото, які ілюструють етапи росту контрольних

## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ЛИСТКІВ



**Рис. 2.** Ріст біотехнологічних рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar* на середовищах з гліфосатом (2 мг/л) і фосфінотрицином (10 мг/л).

A1-A5 і B1-B5 – доба росту (0 – початок експерименту; 7, 14, 21 і 28 доба);

К – контрольна нетрансформована рослина сорту Ексголд; T<sub>2</sub>15/133/2/9 – трансгенна лінія другого покоління.

і трансгенних рослин. Показано, що при вирощуванні на середовищах з додаванням фосфометилгліцину (2 мг/л, діюча речовина гербіциду Ураган Форте) контрольні живці не росли:

за чотири тижні адвентивна брунька (рис. 2, A1) сформувала лише один листочок діаметром приблизно 2 мм, корені не утворилися (рис. 2, A5). За тих же умов адвентивна брунька транс-

Таблиця 1. Вміст сумарного розчинного білка у листках асептично вирощених 4-тижневих рослин ріпаку

Назва лінії	СРБ, мг/г сирі маси		
	Без гербіцидів	РРТ	Гліфосат
Bn15*	24,15±1,3	н.в.	н.в.
T <sub>2</sub> 15/133/2/9	23,86±1,5	23,74±1,2	23,96±1,4
T <sub>1</sub> 15/133/2/9	24,2±0,9	н.в.	н.в.
T <sub>0</sub> 15/133/2	23,85±1,1	н.в.	н.в.

Примітка: \* – сорт Ексколд, контроль; н.в. – не визначали.

генної лінії другого покоління T<sub>2</sub>15/133/2/9 (рис. 2, A1) перетворилася на рослину з добре розвинутою кореневою системою, яка мала три сформовані листочки і один, що розвивається (рис. 2, A5).

Ріст контрольних і біотехнологічних рослин ріпаку з трансгенами *epsps* і *bar* на середовищах з додаванням фосфінотрицину (10 мг/л, діюча речовина гербіциду Basta) підтвердив стійкість трансгенних рослин до даного гербіциду. Дія фосфінотрицину на контрольні рослини виявилась більш жорсткою порівняно з дією гліфосату (рис. 2). Вже за тиждень вихідна рослина жовтіла і гинула, в той час як на середовищі з гліфосатом сформований попередньо листочок контрольної лінії, що був висаджений разом з адвентивною брунькою, залишався зеленим протягом всіх 28 днів експерименту. Біотехнологічна лінія за чотири тижні росту на середовищі з додаванням фосфінотрицину сформувала кореневу систему і п'ять листочків (рис. 2, B5).

Вміст сумарного розчинного білка може слугувати одним із критеріїв оцінки фізіологічного стану рослини як за нормальних умов, так і при дії стресів. Так, показано, що рослини сорту кунжуту (*Sesamum indicum* L.), які відрізнялись за вмістом СРБ за фізіологічних умов, по-різному реагували на посуху (Fazelli et al., 2007). Зниження вмісту СРБ було менш значним у стійкішого до посухи сорту, який мав підвищений вміст СРБ за нормальних умов. В той же час у листках томату (*Lycopersicon esculentum*) і соняшнику (*Helianthus annuus* L.) водний дефіцит спричинював підвищення вмісту СРБ (Mäkelä et al., 2000; Iqbal et al., 2011).

Визначення вмісту СРБ в екстрактах з листків досліджуваних рослин показало, що достовірні відмінності між вихідними, нетрансформованими рослинами і біотехнологічними лініями різних поколінь трансформантів, що росли за фізіологічних умов (середовище MS), відсутні (табл. 1). Лінія другого покоління T<sub>2</sub>15/133/2/9 мала однаковий вміст СРБ при ку-

льтивуванні на середовищах без гербіцидів та із додаванням у селективних концентраціях як фосфінотрицину, так і гліфосату.

Подібні результати були отримані нами при вивченні толерантності трансгенних рослин ріпаку з геном інтерферону альфа-2b до осмотичного стресу (Slyvets, Sakhno, 2014). Під час росту на агаризованих середовищах з додаванням 50 мМ манітолу СРБ у трансгенних рослин залишався без змін, у контрольних – спостерігали зниження його вмісту до 20 %. Не було виявлено відмінностей за вмістом СРБ у біотехнологічних і нетрансформованих рослин в умовах без стресу.

Визначення загальної антирадикальної активності екстрактів з листків досліджуваних рослин виявило, що достовірні відмінності між нетрансформованими рослинами і біотехнологічними лініями різних поколінь трансформантів відсутні (табл. 2). Винятком були рослини первинних трансформантів (лінія T<sub>0</sub>15/133/2), у яких загальна антирадикальна активність була достовірно нижчою на 44,5%. Це можна пояснити дисбалансом антиоксидантного статусу через гемізиготний стан введених генів стійкості до гербіцидів. У наступних поколіннях цей дисбаланс нівелювався, ймовірно, за рахунок переходу введених генів у гомологічний стан. Слід зазначити, що вирощування рослин лінії другого покоління T<sub>2</sub>15/133/2/9 в стресових умовах, при додаванні до середовищ гербіцидів двох різних груп, не змінювало загальної антирадикальної активності листових екстрактів. Це свідчить про відсутність реакції на стрес у досліджуваних рослин за рахунок експресії відповідних гетерологічних генів.

У отриманих нами раніше біотехнологічних рослин ріпаку з трансгеном *sup11A1*, що кодує цитохромоксидазу P450<sub>SCC</sub> тваринного походження, було виявлено підвищення антиоксидантної активності на 38-130% (Сахно и др., 2010). Однак визначали її іншим методом, використовуючи реакцію окиснення 2,6-діхлорфеноліндофеноляту натрію (Семенов,

## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ЛИСТКІВ

**Таблиця 2. Активність СОД і загальна антирадикальна активність тканин листків ріпаку**

Назва лінії	Середовище	DPPH, EC <sub>50</sub> , мкл екстракту/лунку	Активність СОД, од./мг білка
Bn15*	MS	11,0±1,9	23,5±1,1
T <sub>2</sub> 15/133/2/9	MS	10,5±2,4	21,9±1,6
T <sub>2</sub> 15/133/2/9	MS+ PPT	12,0±2,0	22,4±0,9
T <sub>2</sub> 15/133/2/9	MS+гліфосат	11,5±1,7	23,4±2,0
T <sub>1</sub> 15/133/2/9	MS	12,5±3,6	22,8±1,4
T <sub>0</sub> 15/133/2	MS	15,9±2,7**	23,7±1,8

**Примітка.** \* – сорт Ексголд, контроль; \*\* – відмінності від контролю достовірні при  $p < 0,05$ .

Ярош, 1985). Рослини ріпаку з трансгеном *sup11A1*, як і рослини тютюну з тим же трансгеном, суттєво відрізнялись від вихідних форм за біомасою, вмістом сумарного розчинного білка, темпами росту і розвитку (Спивак и др., 2009; Сахно и др., 2010). Крім того, рослини ріпаку з трансгеном *sup11A1* виявили більшу адаптивну пластичність до дії підвищених температур (Sakhno et al., 2014) і осмотичного стресу (Tregub, Sakhno, 2012). Рослини тютюну і ріпаку з трансгеном *sup11A1* мали в своєму ядерному геномі ще один гетерологічний ген – *bar*, що кодує фосфінотрицинацетил трансферазу. Порівняння загальної антиоксидантної активності цих рослин і аналізованих у даній роботі дозволяють зробити висновок, що відмінності між двома групами трансгенних рослин зумовлені експресією гена *sup11A1*, а експресія гена *bar* не впливає на загальну антирадикальну активність рослинних тканин.

Активність СОД – показник стабільності окиснювально-відновних процесів рослинного організму. Вона змінюється при проходженні різних етапів онтогенезу (Gupta et al., 1993; Diaz-Vivancos et al., 2010; Matamoros et al., 2010), може бути різною в різних органах однієї і тієї ж рослини (Martins et al., 2011). Суттєвий вплив на активність СОД мають різні стресові фактори (Molina-Rueda et al., 2013). Існують відмінності за активністю СОД серед сортів однієї культури (Fazelli et al., 2007; Sakhno, Slyvets, 2014). Показано, що ті з них, у яких за сприятливих умов активність СОД вища, виявляються стійкішими до впливу стресів (Jiang et al., 2013, Sakhno et al., 2014).

Визначення активності СОД екстрактів з листків досліджуваних рослин показало, що вона подібна у вихідних і біотехнологічних рослин різних поколінь (табл. 2). Показники СОД у лінії T<sub>2</sub>15/133/2/9, яка росла на середовищі MS без додавання гербіцидів, не відрізнялися від таких при рості на середовищах з фосфінотрицином (10 мг/л) або гліфосатом (2 мг/л). На-

сіння біотехнологічних рослин ріпаку, що вирощуються у світі (подія GT73 – стійкість до гліфосату, ген *epsps*, і події MS1/RF1 та MS8/RF3 – стійкість до глюфозинату, ген *bar*) було тестовано на активність антиоксидантних ферментів (Xu et al., 2011). Показано зниження активності СОД на 22% у рослин GT73 і на 25% у рослин MS1/RF1. У рослин MS8/RF3 змін активності СОД у насінні порівняно з нетрансформованим контролем виявлено не було.

Серед отриманих нами раніше рослин ріпаку є дві групи рослин, активність СОД у яких підвищена за фізіологічно нормальних умов – це рослини з геном інтерферону людини і цитохрому P450<sub>SCC</sub> (Sakhno, Slyvets, 2014). У різних лабораторіях світу отримано значний пул рослин з такою відмінністю за рахунок експресії генів, які впливають як на активність антиоксидантних ферментів, включаючи СОД, так і на вміст низькомолекулярних антиоксидантів (Zhang et al., 2008; Wan et al., 2009; Sakhno, 2013). Переважна більшість трансгенних рослин має подібну до вихідних, нетрансформованих рослин активність СОД.

Таким чином, показано, що не спостерігалось достовірних відмінностей за вмістом сумарного розчинного білка, загальною антирадикальною активністю тканин листків і активністю супероксиддисмутази у гербіцид-стійких рослин ярого ріпаку, які експресують одночасно синтетичний ген *epsps* і ген *bar*, у порівнянні з нетрансформованими рослинами за умов вирощування *in vitro*. Винятком були рослини первинних трансформантів, у яких загальна антирадикальна активність була достовірно нижчою, а активність СОД і вміст СРБ не відрізнялися від контролю.

## ЛІТЕРАТУРА

Колупаєв Ю.С., Обозний О.І. Активні форми кисню і антиоксидантна система при перехресній адаптації рослин до дії абіотичних стресорів // Вісн.

- Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 3 (30) – С. 18-31.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк. – 1990. – 352 с.
- Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Стабільна експресія беспроторного гена *bar* в трансформованих рослинах рапса // Цитологія і генетика. – 2008. – Т. 42, №1. – С. 21-28.
- Сахно Л.А., Моргун Б.В., Кваско Е.Ю., Кучук Н.В. Створення трансформованих рослин рапса, експресуючих ген *суп11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> животного походження // Biotechnol. Acta. – 2010. – В. 3, № 5. – С. 74-82.
- Сахно Л.О. Комарницький І.К., Майстров П.Д., Кучук М.В. Створення рослин рапсу, стійких до гербіцидів на основі гліфосату, за рахунок введення синтетичного гена *epsps* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наук. праць / За ред. В.А. Кунаха. – К.: Логос. – 2011. – Т. 11. – С. 388-393.
- Сахно Л.О., Комарницький І.К., Кучук М.В. Стійкість до гліфосату і глюфозинату в поколіннях T<sub>1</sub>–T<sub>2</sub> біотехнологічних рослин рапсу (*Brassica napus* L.) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2015. – Т. 13, № 1. – С.3-10.
- Семенов В. Л., Ярош А. М. Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. біохім. журн. – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50-52.
- Стивак С.Г., Бердичевец І.Н., Ярмолинский Д.Г., Манешина Т.В., Шпаковский Г.В., Картель Н.А. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК *СУР11А1* цитохрома P450<sub>SCC</sub> // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1217-1224.
- Al-Saikhan M.S., Howard L.R., Miller J.C. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.) // J. Food Sci. – 1995. – V. 60, № 2. – P.341-347.
- Aquil F., Ahmad I., Mehmood Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants // Turk. J. Biol. – 2006. – V. 30, № 3. – P.177-183.
- Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions // Anal. Biochem. – 1987. – V. 161, № 2. – P. 559-566.
- Bhargava S., Sawant K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression // Plant Breed. – 2013. – V. 132, № 1. – P. 21-32.
- Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical // Nature. – 1958. – V. 181. – P. 1199-1200.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V.72, № 2. – P.248-254.
- Capeccka E., Mareczek A., Leja M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species // Food Chem. – 2005. – V. 93, № 2. – P. 223-226.
- De Gara L., de Pinto M.C., Tommasi F. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction // Plant Physiol. Biochem. – 2003. – V. 41. – P. 863-870.
- Diaz-Vivancos P., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M.J., Hernandez J.A. Characterization of the antioxidant system during the vegetative development of pea plants// Biol. Plant. – 2010. – V. 54, № 1. – P. 76-82.
- Dudonné S., Vitrac X., Coutière P., Woillez M., Mérlillon J.-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays // J. Agric. Food Chem. – 2009. – V. 57. – P. 1768-1774.
- Fazelli F, Ghorbanli M, Niknam V. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars // Biol. Plant. – 2007. – V. 51. – P. 98-103.
- Gupta S.A., Webb R.P., Holaday A.S., Allen R.D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants) // Plant Physiol. – 1993. – V. 103. – P.1067-1073.
- Iqbal N, Ashraf Y, Ashraf M. Modulation of endogenous levels of some key organic metabolites by exogenous application of glycine betaine in drought stressed plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Plant Growth Regul. – 2011. – V. 63, № 1. – P. 7-12.
- Jaleel C.A., Riadh K., Gopi R., Manivannan P., Inès J., Al-Juburi H.J., Chang-Xing Z., Hong-Bo S., Panneerselvam R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints // Acta Physiol. Plant. – 2009. – V. 31, № 3. – P.427-436.
- Jiang J., Su M., Chen Y., Gao N., Jiao C., Sun Z., Li F., Wang C. Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment // Biologia. – 2013. – V. 68, № 2. – P. 231-240.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds // J. Agric. Food Chem. – 1999. – V. 47, № 10. – P. 3954-3962.
- Kim Y.-H., Lim S., Yang K.-S. Expression of Arabidopsis NDPK2 increases antioxidant enzyme activities and enhances tolerance to multiple environmental stresses in transgenic sweetpotato plants// Mol. Breed. – 2009. – V. 24, № 3. – P. 233-244.



## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ЛИСТКІВ

- Li X., Gao M.-J., Pan H.-Yu., Cui De-J., Gruber M.Y. Purple canola: *Arabidopsis PAPI* increases antioxidants and phenolics in *Brassica napus* leaves // J. Agric. Food Chem. – 2010. – V. 58, № 3. – P. 1639-1645.
- Mäkelä P., Kärkkäinen J., Somersalo S. Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity // Biol Plant. – 2000. – V. 43, № 3. – P.471-475.
- Martins L.L., Mourato M.P., Cardoso A.I., Pinto A.P., Mota A.M., Gonçalves M.L.S., de Varennes A. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts // Acta Physiol. Plant. – 2011. – V. 33, № 4. – P. 1375-1383.
- Matamoros M.A., Loscos J., Dietz K.-J., Aparicio-Tejo P.M., Becana M. Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits // J. Exp. Bot. – 2010. – V. 61, № 1. – P. 87-97.
- Molina-Rueda J.J., Tsai C.J., Kirby E.G. The Populus superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a) // PLOS ONE. – 2013. – V. 8. – Iss. 2. – e56421.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
- Rai A.C., Singh M., Shah K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – V. 61. – P. 108-114.
- Reguera M., Peleg Z, Blumwald E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – V. 1819. – P. 186-194.
- Sakhno L.O. Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering // Biopolym. Cell. – 2013. – V. 29, № 6. – P. 443-453.
- Sakhno L.O., Slyvets M.S. Superoxide dismutase activity in transgenic canola // Цитология и генетика. – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 12-17.
- Sakhno L.O., Slyvets M.S., Kuchuk M.V. Сур11А1 canola plants under heat stress conditions // Цитология и генетика. – 2014. – Т. 48, № 5. – С. 12-17.
- Slyvets M., Sakhno L. Human interferon alpha 2b positively affects canola growth in both aseptic non-stressed and water deficit conditions // Int. J. Biosci. Nanosci. – 2014. – V. 1, № 5. – P. 104-118.
- Taranenko A.M., Sakhno L.O., Morgun B.V., Kuchuk M.V. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registered glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants // Biotechnol. Acta. – 2015. – V. 8, № 2. – P. 52-57.
- Trehub M.S., Sakhno L.O. Transgenic *Brassica napus* plants expressing cytochrome P450<sub>SCC</sub> *сур11А1* gene under *in vitro* osmotic stress conditions // Int. Conf. «Biotechnology and Plant Breeding. Perspective Towards Food Security and Sustainability», September 10-12, 2012. – Radzikow, Poland, 2012. – P. 156.
- Vencill W.K., Nichols R.L., Webster T.M., Soteris J. K., Mallory-Smith C., Burgos N.R., Johnson W.G., McClelland M.R. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops // Weed Science. – 2012. – Spec. Iss. – P. 2-30.
- Wan X, Tan J, Lu S., Chuyu Lin C., Hu Y., Guo Z. Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // Physiol. Plant. – 2009. – V. 136, № 1. – P.30-44.
- Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerz R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs // Food Chem. – 2007. – V. 105, № 3. – P. 940-949.
- Xu W., Guo F., Zhou X., Shang Y., Yuan Y., Zhang F., Huang K. Unintended effects were investigated in antioxidant activity between genetically modified organisms and their nontransgenic control // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – V. 10, № 46. – P. 9272-9279.
- Zhang Y, Yang J, Cai J., Guo Z. Over-expressing *SgNCED1* in tobacco increases ABA level, antioxidant enzyme activities and stress tolerance // J. Plant Growth Regul. – 2008. – V. 27, № 2. – P.151-158.

Надійшла до редакції  
15.06.2015 р.



**САХНО, ЛИСТВАН, КУЧУК**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LEAF  
OF BIOTECHNOLOGICAL RAPE (*BRASSICA NAPUS L.*),  
RESISTANT TO HERBICIDES BASED ON GLYPHOSATE AND GLUFOSINATE**

L. O. Sakhno, K. V. Lystvan, M. V. Kuchuk

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering  
National Academy of Science of Ukraine  
(Kyiv, Ukraine)  
e-mail: sakhno@icbge.org.ua*

In order to study of possible unintended biochemical peculiarities of herbicide-resistant spring rape (*Brassica napus L.*) plants expressing both synthetic *epsps* gene responsible for resistance to glyphosate herbicides and *bar* gene conferring glufosinate, or phosphinothricin, resistance, total soluble protein content, total radical scavenging activity, and superoxide dismutase activity were investigated. Significant decrease in total radical scavenging activity was detected for initial transgenic plants. Total soluble protein content as well as superoxide dismutase activity was without changes in these plants. It was shown that leaf extracts of untransformed plants have no significant differences in comparison with ones of herbicide-resistant plants of neither first nor second generation under *in vitro* growth conditions in terms of parameters studied. Addition of Basta (phosphinothricin) or Hurricane Forte (glyphosate) herbicide solutions into the culture media did not affect leaf antioxidant activity of biotechnological rape plants.

**Key words:** *Brassica napus L.*, antioxidant activity, glyphosate, glufosinate, superoxide dismutase, total soluble protein

**АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИСТЬЕВ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS L.*),  
УСТОЙЧИВОГО К ГЕРБИЦИДАМ НА ОСНОВЕ ГЛИФОСАТА  
И ГЛЮФОЗИНАТА**

Л. А. Сахно, К. В. Листван, Н. В. Кучук

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
Национальной академии наук Украины,  
(Киев, Украина)*

С целью выявления возможных биохимических особенностей гербицид-устойчивых растений ярового рапса (*Brassica napus L.*), которые имеют в своем ядерном геноме одновременно синтетический ген *epsps* (обеспечивает растениям устойчивость к глифосату) и ген *bar* (отвечает за устойчивость к фосфинотрицину, или глюфоцинату), изучены содержание суммарного растворимого белка, общая антирадикальная активность тканей листьев и активность супероксиддисмутазы. Для первичных трансформантов показано достоверное уменьшение общей антирадикальной активности по сравнению с нетрансформированными растениями, содержание суммарного растворимого белка и активность супероксиддисмутазы оставались без изменений. Выявлено, что при выращивании растений в асептических условиях на средах без гербицидов антирадикальная активность экстрактов из листьев нетрансформированных растений достоверно не отличалась от активности экстрактов гербицид-устойчивых растений первого и второго поколений. Добавление растворов гербицидов Баста (фосфинотрицин) или Ураган Форте (глифосат) в среду культивирования не влияло на антиоксидантную активность листьев биотехнологических растений рапса.

**Ключевые слова:** *Brassica napus*, антиоксидантная активность, глифосат, глюфоцинат, супероксиддисмутазы, суммарный растворимый белок