

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΟΕΝΖΥΜΟΥ PnGSTU2-2 (*P. vulgaris*) ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΟΥ DIMETHENAMID

Γ. Βούλγαρη¹, Κ. Κουντούρη³, Ε. Χρονοπούλου³, Π. Μαδέσης², Ν. Λάμπρου³, Ε. Νιάνιου-Ομπειντάτ¹

¹ Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού περιβάλλοντος, Εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης των φυτών, Τ.Κ.54124 Θεσσαλονίκη

² Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, INEB 6^ο χλμ Χαριλάου Θέρμης, Θέρμη 57001 Θεσσαλονίκη

³ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας Βιοτεχνολογίας Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Ιερά οδός 75, 11855 Αθήνα

Περίληψη

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, έχουν κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό μεταβολικής αποδόμησης ζιζανιοκτόνων των φυτικών οργανισμών. Το γονίδιο *PnGSTU2-2* απομονώθηκε από τα φύλλα του είδους *Phaseolus vulgaris* και το ισοένζυμο που κωδικοποιεί καταλύει την συμπλοκοποίηση της γλουταθειόνης με τα ζιζανιοκτόνα alachlor και metalachlor της ομάδας των χλωροακεταμιδίων. Προκειμένου να μελετηθεί *in planta* η ικανότητα του ισοενζύμου *PnGSTU2-2* να μεταβολίζει ζιζανιοκτόνα της ομάδας αυτής, δημιουργήθηκαν με την μέθοδο του αγροβακτηρίου διαγονιδιακά φυτά καπνού που υπερεκφράζουν το γονίδιο *PnGSTU2-2*. Η παρουσία του διαγονιδίου επιβεβαιώθηκε με PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) και η έκφραση του με ποσοτική PCR. Περαιτέρω επιβεβαιώθηκε πως το διαγονίδιο κωδικοποιεί ενεργές πρωτεΐνες με την μέτρηση της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας στο υπόστρωμα NBD-Cl. Επιλέχθηκαν τρεις διαγονιδιακές σειρές οι οποίες αξιολογήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα τους στο ζιζανιοκτόνο dimethenamid (0,5 and 1 mg/L). Κάτω από *in vivo* συνθήκες οι διαγονιδιακές σειρές επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και στις δύο συγκεντρώσεις καθώς παρουσίασαν μεγαλύτερο μήκος ρίζας και βλαστού σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες. Μέσω της προσέγγισης αυτής, επιβεβαιώθηκε ο ρόλος του ισοενζύμου *PnGSTU2-2* στην εκλεκτικότητα του ζιζανιοκτόνων της ομάδας των χλωροακεταμιδίων.

Λέξεις κλειδιά GST, καπνος, χλωροακεταμίδια

Εισαγωγή

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στην φάση II του συστήματος μεταβολικής αποδόμησης ξενοβιοτικών ουσιών, όπου καταλύουν την συμπλοκοποίησή τους με την γλουταθειόνη (Dietz and Schnoor, 2001). Επίσης, μέσω της δράσης τους ως υπεροξειδάσες αποτελούν σημαντικό στοιχείο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού άμυνας των φυτών. Οι GSTs των φυτών ανακαλύφθηκαν το 1970 όταν αποδείχτηκε πως διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην εκλεκτικότητα των ζιζανιοκτόνων (Frear and Swanson, 1970). Υποδιαιρούνται σε οχτώ κλάσεις, στις επτά εκ των οποίων (ϕ , τ , θ , ζ λ , DHAR και TCHQD) ανήκουν κυτταροπλασματικές ενώ σε μία κλάση μικροσωμικές GSTs. Το ισοένζυμο *PnGSTU2-2* απομονώθηκε από τα φύλλα του *P vulgaris* και καταλύει τον σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ της GSH και διαφόρων ζιζανιοκτόνων. Έχει αξιόλογη δράση έναντι της ατραζίνης, καθώς και ζιζανιοκτόνων της ομάδας των χλωροακεταμιδίων όπως το alachlor και metalachlor (Chronopoulou et al., 2011). Τα ζιζανιοκτόνα της ομάδας αυτής, παρεμποδίζουν την επιμήκυνση των αλυσίδων

λιπαρών οξέων με 20-24 άτομα άνθρακα μέσω της δέσμευσής τους στο ενζυμικό σύμπλοκο της ελονγκάσης (Böger και συν., 2000) και αναστέλλουν κυρίως την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση της καταλυτικής δράσης του ισοενζύμου PnGSTU2-2 με τον βιολογικό του ρόλο *in planta*. Διαμέσου της δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων φυτών που υπερεκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο και της αξιολόγησης της ανθεκτικότητά τους μετά από την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου dimethenamid (χλωροακεταμίδια) κατέστη δυνατός ο λειτουργικός χαρακτηρισμός του ισοενζύμου.

Υλικά και μέθοδοι

1. Δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pART27-GSTU2-2

Για την δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pART27-GSTU2-2 χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pART27-GSTU4 (Benekos et al., 2010). Το γονίδιο PnGSTU2-2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα pET28A. Για την απομόνωση του γονιδίου και του φορέα pART27 πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *HindIII* (New England Biolabs). Οι αντιδράσεις της λιγάσης έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας New England Biolabs και ελέγχθηκε με την τεχνική PCR. Ακουλούθησε ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli*. Σε τυχαία επιλεγμένες αποικίες διεξήχθη έλεγχος με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *BamHI*. Οι ίδιες αντιδράσεις ενζύμων περιορισμού έγιναν και στον φορέα pART27-GSTU4, ο οποίος αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα. Τέλος, Ο ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας pART27-PnGSTU2-2 από ένα θετικό κλώνο κλωνοποιήθηκε στο *A. tumefaciens* (στέλεχος GV3101) με την μέθοδο της ηλεκτροδιήθησης.

2. Γενετική τροποποίηση ταυτοποίηση και επιλογή διαγονιδιακών σειρών καπνού

Η γενετική τροποποίηση του καπνού πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του *A. tumefaciens*, χρησιμοποιώντας ως έκφυτα φυλλικούς δίσκους 1cm² (Horsch, 1985). Η αναγέννηση των εκφύτων και η επιλογή των πιθανά γενετικά τροποποιημένων βλαστών πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αναγέννησης (0,1 mg/l NAA και 1mg/l BAP) το οποίο περιείχε τα αντιβιοτικά σεφοταξίμη (250 mg/L) και καναμυκίνη (50 mg/L). Η ταυτοποίηση των πιθανά γενετικά τροποποιημένων φυτών *N. tabacum* ως προς την ένθεση του διαγονιδίου PnGSTU2-2 πραγματοποιήθηκε με την τεχνική PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR), θετικούς μάρτυρες αποτέλεσαν ένα ταυτοποιημένο γενετικά τροποποιημένο φυτά καπνού με το γονίδιο GST4 και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pART27-PnGSTU2-2. Ως αρνητικός μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε ένα μη γενετικά τροποποιημένο φυτό καπνού. Για την επιλογή των διαγονιδιακών σειρών, μετρήθηκαν τα ειδικά αντίγραφα του mRNA του γονιδίου PnGSTU2-2 με την τεχνική της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (q-RTPCR). Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως σχετική ποσοτική έκφραση με βάση την μέθοδο 2^{- $\Delta\Delta$ CT}. (Livak et al., 2001). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η β -ακτίνη. Επιπλέον σε εκχύλισμα φύλλων των ίδιων διαγονιδιακών σειρών μετρήθηκε η ειδική ενζυμική δραστηριότητα στο υπόστρωμα NBD-Cl, στο οποίο το ισοένζυμο PnGSTU2-2 εμφανίζει υψηλή ενζυμική δραστηριότητα (Chronopoulou et al., 2011)

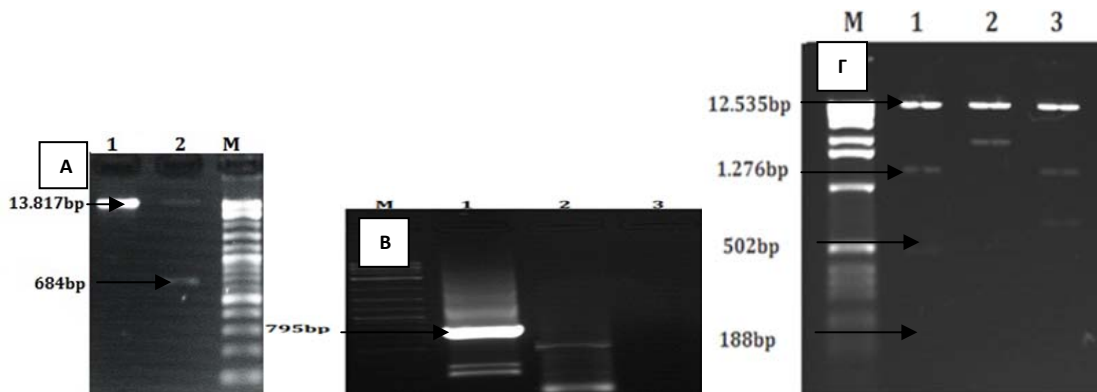
3. In vivo δοκιμή ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο dimethenamid

Οι T0 σειρές NtGSTU2-2.9, NtGSTU2-2.13 NtGSTU2-2.19 καθώς και μη γενετικά τροποποιημένα φυτά μικροπολλαπλασιάστηκαν και σκληραγωγήθηκαν. Τα φυτά ποτίστηκαν με 5ml υδατικού διαλύματος του ζιζανιοκτόνου συγκέντρωσης 0,5 και 1 mg/L (συγκέντρωση που χρησιμοποιείται σε συνθήκες αγρού για τον έλεγχο των ζιζανίων) και ακολούθησε πότισμα με απεσταγμένο νερό. Μετά από 20 ημέρες μετρήθηκε το μήκος του βλαστού και της ρίζας. Το πειραματικό σχέδιο ήταν το πλήρως τυχαίο με τρεις επαναλήψεις. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με το κριτήριο Dunnett για P<0,05 με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 20.

Αποτελέσματα και συζήτηση

1. Δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pART27-GSTU2-2

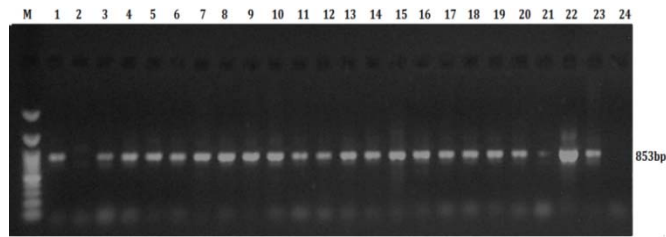
Απο την πέψη του pET-28a-PvGSTU2-2 και του pART27-GSTU4 με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *HindIII* απομονώθηκε ένα τμήμα DNA 684bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο *PvGSTU2-2*, και ο φορέας pART27 μαζί με την κασέτα έκφρασης 13.817bp (Εικόνα 1 A). Η ένωση των μονόκλωνων συμπληρωματικών άκρων του γονιδίου και του φορέα πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης της λιγάσης. Η επιτυχία της ελέγχθηκε με την τεχνική PCR. Το τμήμα DNA που ενισχύθηκε είχε μέγεθος 795bp (Εικόνα 1B). Για την επιλογή των θετικών αποικιών *E.coli* πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *BamHI*. Μόνο σε ένα κλώνο παρατηρήθηκε το αναμενόμενο πρότυπο ζωνών μεγέθους 12.535bp, 1276bp, 502bp και 188bp (Εικόνα 1Γ).



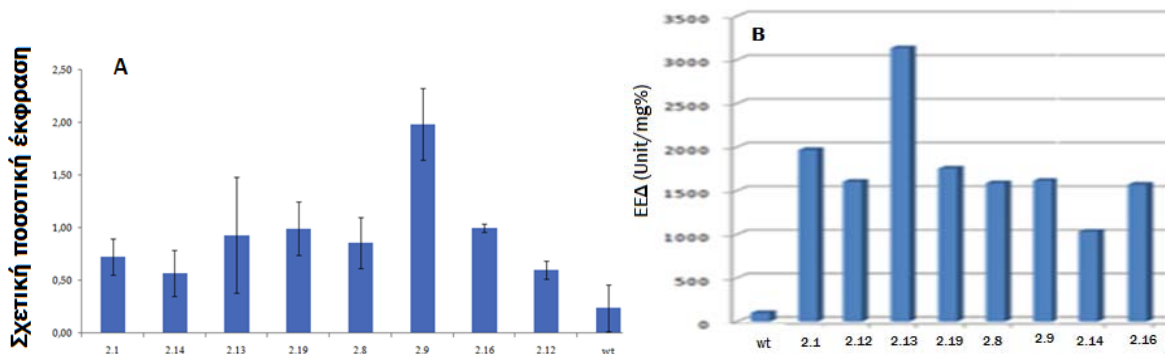
Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% **(A)** Των προϊόντων διπλής πέψης του pART27-GSTU4 και του γονιδίου *PvGSTU2-2* με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *HindIII* μετά από τον καθαρισμό τους **1**: Ο πλασμιδιακός φορέας pART27 **2**: Γονίδιο *PvGSTU2-2* **M**: Δείκτης μοριακών βαρών 1Kb. **(B)** Των προϊόντων PCR για τον έλεγχο του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pART27-*PvGSTU2-2* μετά από την αντίδραση της λιγάσης **M**: Δείκτης μοριακών βαρών 1Kb **1**: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pART27-*PvGSTU2-2* **2**: Πλασμιδιακός φορέας pART27 κομμένος με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *Xba* (αρνητικός μάρτυρας) **3**: Αντίδραση χωρίς DNA εκμαγείο **(Γ)** Των προϊόντων αντίδρασης με ένζυμα περιορισμού, για τον έλεγχο του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pART27-*PvGSTU2-2*. **M**: Δείκτης μοριακού βάρους 1Kb **1 και 2**: Κλώνοι pART27-*PvGSTU2-2* **3**: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pART27-GST4

2. Γενετική τροποποίηση, ταυτοποίηση και επιλογή διαγονιδιακών σειρών καπνού

Συνολικά προέκυψαν 21 T0 διαγονιδιακές σειρές με το γονίδιο *PvGSTU2-2*, 19 εκ των όφωσαν την αναμενόμενη ζώνη των 853 bp βάση της ανάλυσης RT-PCR (Εικόνα 2). Για την επιλογή των διαγονιδιακών σειρών μετρήθηκε η ποσοτική έκφραση και η ενζυμική δραστηριότητα του διαγονιδίου *GSTU2-2*. Μέσω της σχετικής ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *PvGSTU2-2* σε 8 διαγονιδιακές σειρές. Το γονίδιο *PvGSTU2-2* εκφράζεται σε όλες τις T0 σειρές καπνού. Εντούτοις, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρουσίασε η σειρά *NtGSTU2-2.9*, της οποίας η έκφραση ήταν περίπου 2 φορές μεγαλύτερη ($1,99 \pm 0,33$) και οι σειρές *NtGSTU2-2.13* και *NtGSTU2-2.19* των οποίων η έκφραση ήταν περίπου μία φορά μεγαλύτερη ($0,93 \pm 0,55$ και $0,99 \pm 0,25$ αντίστοιχα) σε σχέση με την T0 σειρά *NtGSTU2-2.16* (calibrator) (Διάγραμμα 1A). Η ενζυμική δραστηριότητα στο υπόστρωμα NBD-Cl ήταν παρόμοια σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές με εξαίρεση την σειρά *NtGSTU2-2.13* της οποίας ήταν διπλάσια (Διάγραμμα 1B). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν πως σε όλες τις σειρές το διαγονίδιο *PvGSTU2-2* μεταγράφεται και οι πρωτεΐνες που παράγονται είναι ενζυμικά δραστικές.



Εικόνα 2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων RT- PCR για τον έλεγχο των T0 διαγονιδιακών σειρών *N. tabacum* με το γονίδιο *PvGSTU2-2*. **M**: Δείκτης μοριακών βαρών 100 bp **1-21**: Πιθανά γενετικά τροποποιημένα φυτά με το γονίδιο *PvGSTU2-2* **22**: Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pART27-PvGSTU2-2* (Θετικός μάρτυρας) **23**: Ταυτοποιημένο γενετικά τροποποιημένο φυτό με το γονίδιο *GSTU4* (Θετικός μάρτυρας) **24**: Μη γενετικά τροποποιημένο φυτό *N. tabacum* (Αρνητικός μάρτυρας) **25**: Δείγμα χωρίς DNA εκμαγείο



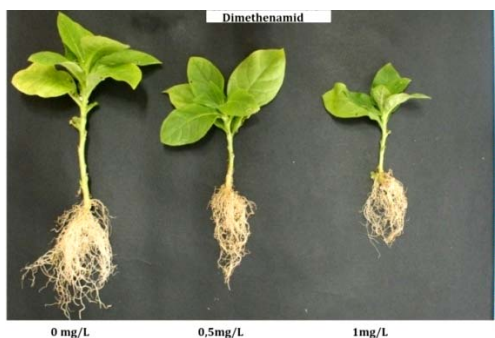
Διάγραμμα 1 Επιλογή διαγονιδιακών σειρών καπνού με το γονίδιο *GSTU2-2* μέσω της μέτρησης **(A)** της σχετικής ποσοτικής έκφρασης και **(B)** της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας (E.E.Δ) του στο υπόστρωμα NBD-Cl. **2.1, 2.14, 2.13, 2.19, 2.8, 2.9, 2.14, 2.16**: Ανεξαρτητές διαγονιδιακές σειρές **wt**: Μη γενετικά τροποποιημένο φυτό

3. *In vivo* δοκιμή ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο dimethenamid

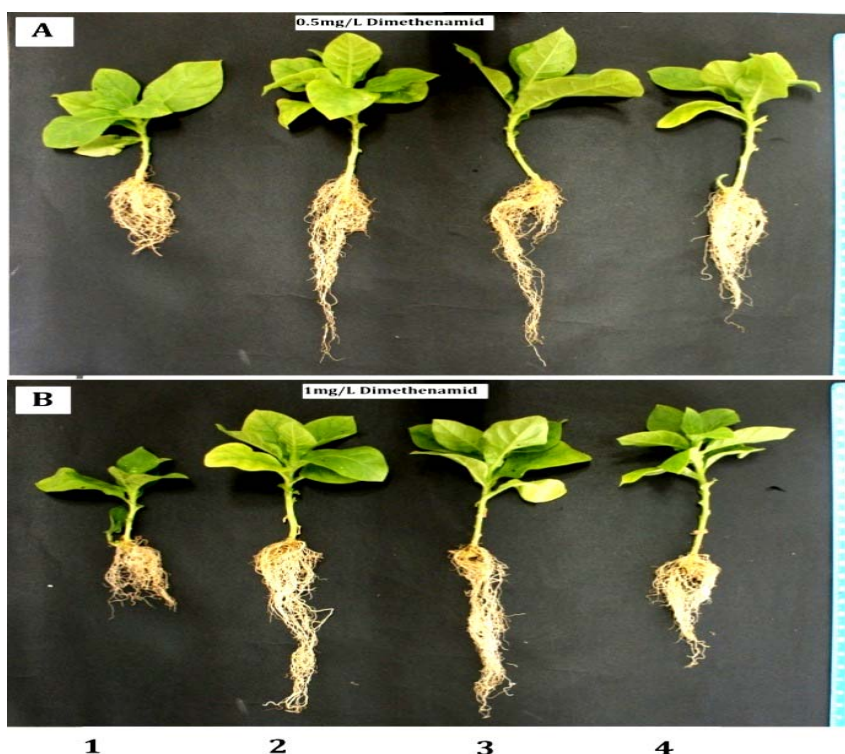
Απο την μελέτη της επίδρασης του ζιζανιοκτόνου dimethenamid σε *in vivo* συνθήκες προέκυψε πως η επίδραση του ήταν έντονη στα μη γενετικά τροποποιημένα φυτά καθώς προκάλεσε μεγάλη μείωση στο μήκος του βλαστού και της ρίζας (Εικόνα 3). Στις διαγονιδιακές σειρές *NtGSTU2-2.9*, *NtGSTU2-2.13* και *NtGSTU2-2.19* στην συγκέντρωση των 0,5mg/L ο μέσος όρος του μήκους της ρίζας ήταν έως και δύο φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τα μη γενετικά τροποποιημένα φυτά και έως τρεις φορές στην συγκέντρωση του 1mg/L (Εικόνα 4 A και B και Διάγραμμα 2A). Το μήκος του βλαστού και στις δύο συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου ήταν μεγαλύτερο στις T0 σειρές σε σχέση με τα μη γενετικά τροποποιημένα φυτά. Ωστόσο στατιστικώς σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μόνο στην συγκέντρωση του 1mg/L, όπου ο μέσος όρος του μήκους του βλαστού ήταν έως και 1,5 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τα μη γενετικά τροποποιημένα φυτά (Εικόνα A και B και Διάγραμμα 2B).

Γενικά, η ανθεκτικότητα των φυτών στα ζιζανιοκτόνα της ομάδας των χλωροακεταμιδίων σχετίζεται με την υψηλή διαθεσιμότητα της GSH και την έκφραση συγκεκριμένων GSTs (Fuerst et al., 1998; Farago et al., 1993 ; Cottingham and Hatzios 1992). Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τον ρόλο των GSTs στην αποδόμηση του ζιζανιοκτόνου dimethenamid. Στο σιτάρι η ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής φυτοπροστατευτικών ουσιών (safeners) οι οποίες

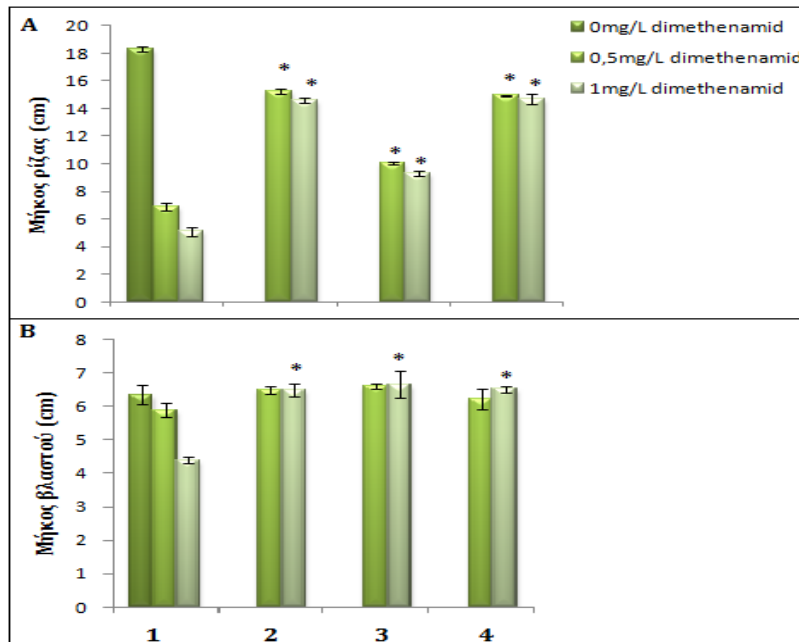
επάγουν συγκεκριμένα GSTs ισoenζυμα (Riechers et al., 1996). Γενετικά τροποποιημένο σιτάρι που υπερεκφράζει ένα GST γονίδιο από τον αραβόσιτο παρουσίασε αυξημένη ανθεκτικότητα όχι μόνο στο ζιζανιοκτόνο dimethenamid και alachlor αλλά και στο EPTC της ομάδας των θειοκαρβαμιδικών (Milligan et al., 2001). Η αύξηση της αντοχής των T0 φυτών καπνού υποδεικνύει πως το ισoenζυμο PnGSTU2-2 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αποτοξίνωση του ζιζανιοκτόνου dimethenamid. Περαιτέρω, είναι πολύ πιθανόν να εμπλέκεται και στην αντοχή του κοινού φασολιού στο συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο, στην καλλιέργεια του οποίου εφαρμόζεται εκλεκτικά για την καταπολέμηση των ζιζανίων.



Εικόνα 3 Επίδραση του ζιζανιοκτόνου dimethenamid σε μη γενετικά τροποποιημένα φυτά καπνού στην συγκέντρωση των 0,5 και 1 mg/L σε *in vivo* συνθήκες



Εικόνα 4 Αξιολόγηση σε *in vivo* συνθήκες της αντοχής των T0 διαγονιδιακών σειρών καπνού (*NtGSTU2-2*) καθώς και μη γενετικά τροποποιημένων φυτών 20 ημέρες μετά απο την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνιου dimethenamid (A) 0,5 mg/L (B) 1mg/L Μη γενετικά τροποποιημένο φυτό 2-4: T0 σειρές *NtGSTU2-2.9*, *NtGSTU2-2.19* και *NtGSTU2-2.13* αντίστοιχα



Διάγραμμα 2 Σύγκριση της ανθεκτικότητας μεταξύ των T0 διαγονιδιακών σειρών καπνού (*NtGSTU2-2*) καθώς και μη γενετικά τροποποιημένων φυτών 20 ημέρες μετά από την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνιου dimethenamid (0,5 mg/L και 1mg/L) σε *in vivo* συνθήκες με την μέτρηση του μήκους (A) της ρίζας και (B) του βλαστού. 1: μη γενετικά τροποποιημένο φυτό 2-4: *NtGSTU2-2.9*, *NtGSTU2-2.13* και *NtGSTU2-2.19* αντίστοιχα. Τα δεδομένα αντιστοιχούν στον μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα). Οι τιμές των διαγονιδιακών σειρών που επισημαίνονται με * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από των αντίστοιχων φυτών άγριου τύπου στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε $P \leq 0,05$

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF PvGSTU2-2 (*P. vulgaris*) ISOENZYME IN THE METABOLIC DETOXIFICATION OF THE HERBICIDE DIMETHENAMID

G. Voulgari, K. Kountouri, E. Chronopoulou, P. Madesis, N. Lambrou, E. Nianiou

Plant glutathione transferases (GSTs) have a major role in plants herbicide detoxification mechanism. *PvGSTU2-2* gene has been previously isolated from leaves of *Phaseolus vulgaris* plants. The enzyme, catalyses the conjugation with chloroacetamide herbicides alachlor and metalachlor. With the aim of studying *in planta* the ability of *PvGSTU2-2* to detoxify these herbicides, tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi) plants overexpressing *PvGSTU2-2* were raised via the method of *A. tumefaciens*. The introgression of the transgene in the plant genome was confirmed by RT-PCR and the expression of *PvGSTU2-2* with q-RTPCR analysis. Furthermore, it was verified that transgene codes functional proteins by measuring GST enzyme activity towards NBD-Cl. Three transgenic lines overexpressing *PvGSTU2-2* were assayed for their tolerance towards the herbicide dimethenamid (0,5 and 1 mg/L). Under *in vivo* conditions the *PvGSTU2-2* overexpressing lines exhibited significantly higher shoot and root elongation compared to wild type plants. Via this approach the role of *PvGSTU2-2* in chloroacetamide selectivity was verified.

ACKNOWLEDGEMENTS. The present work was supported by the action "THALIS: Glutathione transferases, multifunctional molecular tools in red and green biotechnology" falling under the Operational Programme "Education and Lifelong Learning (EdLL)" and is co-financed by the European Social Fund (ESF) and National Resources.

Βιβλιογραφία

- Benekos K, Kissoudis C, Nianiou-Obeidata I, Labrou N, Madesis P, Kalamaki M, Makris A, Tsaftaris A (2010) Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants *Journal of Biotechnology* 150:195–201
- Boger P, Matthes B, Schmalfu J (2000) Towards the primary target of chloroacetamides—new findings pave the way *Pest Management Science* 56:497-508
- Chronopoulou E, Madesis P, Asimakopoulou B, Platis D, Tsaftaris A, Labrou NE (2011) Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris* *Planta* DOI 10.1007/s00425-011-1572-z
- Cottingham CK, Hatzios KK (1992) Basis of differential tolerance of two corn Hybrids (*Zea mays*) to metalachlor *Weed science* 40: 359-363
- Dietz AC, Schnoor JL (2001) Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives* 109:163–8
- Farago S, Kreuz K, Brunold C (1993) Decreased Glutathione Levels Enhance the Susceptibility of Maize Seedlings to Metolachlor Pesticide *Biochemistry and Physiology* 47:199–205
- Frear DS, Swanson HR (1970) Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino- 2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn *Phytochemistry* 10:2123–2132
- Fuerst EP (1987) Understanding the mode of action of the choloacetanilide and thiocarbamate herbicides weed technology 1: 270-277 the susceptibility of maize seedlings to metalachlor *Journal of pesticide Biochemistry and Physiology* 47: 199-205
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Farley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229–1231
- Milligan AS, Daly A, Parry MAJ, Lazzeri PA, Jepson I (2001) (The expression of a maize glutathione S-transferase gene in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both *in planta* and *in vitro* *Molecular Breeding* 7:301–315
- Riechers DE, Yang K, Irzyk GP, Jones SS, Fuerst E P (1996) Variability of Glutathione S-Transferase Levels and Dimethenamid Tolerance in Safener-Treated Wheat and Wheat Relatives *Pesticide Biochemistry and physiology* 56: 88–101