

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.152.3

**СВЕРХЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ ПЛОДОВ
Pyrus pyrifolia ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ
ТАБАКА К АБИОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ[#]**

© 2013 г. D. Liu, Y. Liu, J. Rao, G. Wang, H. Li, F. Ge, C. Chen

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, 650500, China

Поступила в редакцию 25.10.2012 г.

Принята к печати 12.11.2012 г.

Глутатион-S-трансферазы (GST) – многофункциональные белки, широко распространенные у животных и растений. GST кодируются большими семействами генов, они участвуют в ответе на окислительный стресс, вызываемый засухой, действием тяжелых металлов, солей и т.п. В условиях окислительного стресса избыток активных форм кислорода (АФК) индуцирует повышение уровня GST, которые метаболизируют токсические продукты перекисного окисления липидов, повреждающие ДНК и другие компоненты клеток. Ранее охарактеризовали полную кДНК нового гена *GSTZ* (*PpGST*) из плодов *Pyrus pyrifolia* Nakai cv Huobali. В представленной работе сконструировали вектор для конститутивной экспрессии *PpGST* в растениях и перенесли его в растения табака (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi) для изучения функций *PpGST*. Показано, что ген *PpGST* успешно встраивается в геном растений табака. Экспрессия гена *PpGST* в трансгенных линиях табака подтверждена методами Саузерн-блоттинга и количественной обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции. Растения поколения T₁, полученные как из трансгенных линий, так и из растений дикого типа, одинаково росли в нестрессовых условиях. Однако при стрессе, вызванном недостатком влаги, действием NaCl и кадмия (Cd), трансгенные растения росли почти нормально. Более того, в трансгенных линиях табака T₁ скорость продукции супероксидного аниона в условиях абиотического стресса была значительно ниже, чем в растениях дикого типа. При этом содержание малонового диальдегида в трансгенных растениях табака T₁ лишь слегка возрастало при стрессе и было значительно ниже, чем в растениях дикого типа. Сверхэкспрессия *PpGST* повышала активность GST и одновременно с этим устойчивость трансгенных линий табака к окислительному стрессу.

Ключевые слова: глутатион-S-трансфераза, *Pyrus pyrifolia* Nakai, сверхэкспрессия, трансгенный табак, засухоустойчивость, стрессоустойчивость, солеустойчивость, кадмий.

OVEREXPRESSION OF THE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE FROM *Pyrus pyrifolia* FRUIT IMPROVES TOLERANCE TO ABIOTIC STRESS IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS, by D. Liu, Y. Liu, J. Rao, G. Wang, H. Li, F. Ge, C. Chen (Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, 650500, China; *e-mail: diqiuliu@126.com). Glutathione S-transferases (GSTs) are ubiquitous enzymes in animals and plants, and they are multifunctional proteins encoded by a large gene family. GSTs are involved in response to the oxidative stress including drought, salt, heavy metals, and so on. Under oxidative stress, the excessive reactive oxygen species (ROS) induce an increase in GST levels, and then the GSTs metabolize the toxic products of lipid peroxidation, damaged DNA and other molecules. Previously, a full-length cDNA of a novel zeta GST gene, *PpGST*, was characterized from fruit of *Pyrus pyrifolia* Nakai cv Huobali. In the present study, a constitutive plant expression vector of *PpGST* was constructed and transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi) to verify the function of *PpGST*. As a result, the *PpGST* gene was successfully integrated into the genome of the transgenic tobacco lines and expressed as expected in the transformants through Southern blotting and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. Growth of T₁ generation plants of *PpGST* transgenic lines and WT under non-stressful conditions was similar, however, the transgenic tobacco lines showed relatively normal growth under drought, NaCl, and cadmium (Cd) stresses. Furthermore, the T₁ transgenic tobacco lines showed significantly slower superoxide anion production rate than the WT under abiotic stress. Simultaneously, the MDA content of each T₁ transgenic tobacco plant was only slightly increased and significantly lower than that of the WT under drought, salt and Cd stress. Together with the GST activity of the transgenic tobacco lines, which was significantly increased under stressful conditions, as compared with that in WT, overexpression of *PpGST* in tobacco enhanced the tolerance of transgenic tobacco lines to oxidative damage caused by drought, NaCl, and Cd stresses.

[#] Текст представлен авторами на английском языке.

* Эл. почта: diqiuliu@126.com

Keywords: glutathione S-transferase, *Pyrus pyrifolia* Nakai, overexpression, transgenic tobacco, drought, NaCl, and Cd tolerance.

DOI: 10.7868/S0026898413040101

При быстром росте населения дефицит продуктов питания в некоторых странах и регионах становится неизбежным. Для удовлетворения растущих потребностей в пищевых продуктах необходимо обеспечить быстрое повышение урожайности сельскохозяйственных культур. Однако проблемы неблагоприятного воздействия окружающей среды становятся все более серьезными. Дефицит влаги, засоленность почв и их загрязнение Cd негативно влияют на рост и урожайность растений. Воздействие абиотического стресса, вызванного этими факторами, становится все более выраженным и ограничивает рост урожайности сельскохозяйственных культур. Абиотический стресс вызывает молекулярные, биохимические, физиологические и морфологические изменения, нарушающие рост и развитие растений [1, 2]. Большая часть повреждений в условиях разных стрессовых воздействий чаще всего обусловлена усиленной продукцией активных форм кислорода (АФК) [3]. АФК образуются и в процессе нормального клеточного метаболизма, но соотношение между продукцией АФК и их элиминацией в стрессовых условиях нарушается. Избыток АФК приводит к быстрой инактивации ферментов в клетках растений, вызывает перекисное окисление липидов, ингибирует синтез ДНК и белков, повреждает нуклеиновые кислоты, разрушает мембраны и в конечном итоге приводит к гибели клеток.

Высшие растения контролируют уровень АФК при помощи их детоксикации посредством ферментативных и неферментативных реакций. Антиоксидантные низкомолекулярные тиолы, такие как аскорбат (AsA) и глутатион (GSH), являются важными компонентами неферментативной системы элиминации АФК. Клетки растений содержат также набор таких антиоксидантных ферментов, как супероксиддисмутаза (SOD), аскорбатпероксидаза (APX), каталаза (CAT) и глутатионпероксидаза (GPX).

С антиоксидантной системой связаны глутатионредуктаза (GR), дегидроаскорбатредуктаза и монодегидроаскорбатредуктаза, которые участвуют в репарации AsA и GSH [4]. Трипептид GSH — γ -глутамил-цистеинил-глицин — важный тиоловый антиоксидант, а также скавенджер реактивных электрофильных соединений, вместе с глутатион-S-трансферазой (GST [КФ 2.5.1.18]) участвует в детоксикации многих гербицидов и других ксенобиотиков [5, 6].

GST — многофункциональные ферменты, распространенные у животных и растений, кодируются большим семейством генов. В геноме *Arabi-*

dopsis thaliana найдены 53 гена GST, а в геноме риса — 59 [7, 8]. В геномной базе данных *Populus trichocarpa* выявлен 81 ген GST, а семейство генов GST сорго состоит из 99 членов [9, 10]. Гены семейства GST обычно образуют кластеры и неслучайным образом распределены в геноме [11]. Семейство GST растений делится на семь классов — GST- τ , ϕ , θ , ζ , λ , глутатион-зависимые дегидроаскорбатредуктазы и тетрахлоргидрохинондегалоге-наза. В ранее изученных семействах генов GST наиболее представленными были гены ферментов классов τ и ϕ . GST растений — это белки с мол. массой 25–29 кДа, которые функционируют в виде гомодимеров, гетеродимеров и мономеров. Содержание GST в проростках пшеницы составляет 2% растворимого белка [12], эти ферменты обнаружены во всех изученных тканях растений и на многих стадиях развития, независимо от присутствия ксенобиотиков.

В последнее время все больше внимания уделяется регуляции экспрессии и функциям генов GST растений. Экспрессия генов GST может индуцироваться разными видами абиотического и биотического стресса, а также ксенобиотиками и фитогормонами, в частности, воздействием засухи, солей, холода, тяжелых металлов, 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB), цихалотрина, джаглона, ауксина, абсцизовой кислоты (ABA), салициловой кислоты (SA), перекиси водорода, гербицидов, патогенов и элиситора [13–21].

GST играют важную роль не только в нормальном развитии растений, но и в детоксикации эндогенных цитотоксических соединений и ксенобиотиков, а также в ответе на различные стрессовые воздействия. При ответе на окислительный стресс избыток АФК индуцирует повышение уровня GST, а затем GST метаболизируют продукты перекисного окисления липидов, продукты повреждения ДНК и другие соединения [11].

Значимость GST подтверждается тем, что во многих тканях и органах растений при окислительном стрессе возрастает активность GST, наблюдается также строгая корреляция между активностью GST и устойчивостью к стрессу [22, 23]. С другой стороны, на тесную связь между GST и предотвращением окислительных повреждений указывают результаты изучения генетической трансформации генами GST растений.

Гены GST экспрессировали в гомологичных и гетерологичных системах и показали, что трансгенные растения проявляют повышенную устойчивость к соли, засухе, холоду, повышенным температурам, Cd и хлорацетанилиду [4, 24–27].

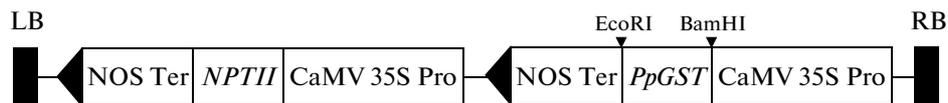


Рис. 1. Схема гибридной конструкции для экспрессии гена *PpGST*. Ген *PpGST* находится под контролем промотора 35S CaMV и соединен с геном устойчивости к канамицину *NPTII*.

Очевидно, что GST растений – это важные компоненты системы антиоксидантной защиты, необходимой для поддержания клеточного гомеостаза в условиях стресса.

Ранее мы клонировали полную размерную кДНК нового гена *GST* из *Pyrus pyrifolia* Nakai cv Huobali из провинции Юнань, используя метод быстрой амплификации концов кДНК (RACE) [28]. кДНК нового гена, названного *PpGST* (GenBank Acc. No. HQ889136), состоит из 1117 п.н. и содержит открытую рамку считывания (ORF) длиной 696 п.н., 5'-нетранслируемую область (UTR, 130 п.н.) и 3'-UTR длиной 351 п.н. ORF кодирует предсказанный полипептид из 231 аминокислотного остатка. По данным филогенетического анализа *PpGST* относится к ферментам класса ζ наряду с некоторыми известными GST растений. Более важно то, что *PpGST* активно экспрессируется в перикарпе плодов *P. pyrifolia* cv Huobali, но не в молодых листьях, что указывает на ее возможное участие в поддержании окислительно-восстановительного баланса и стрессового ответа в ходе развития плодов груши.

В представленной работе сконструировали растительный вектор экспрессии, несущий ген *PpGST*. Этот вектор ввели в растения табака (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi) путем трансформации, опосредованной *Agrobacterium*. После отбора трансгенных линий табака определили условия роста нетрансгенных и трансгенных растений первого поколения (T_1), их устойчивость к окислительным повреждениям, вызванным воздействием засухи, NaCl и Cd.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растительный материал. Стерильные проростки *N. tabacum* L. cv Xanthi выращивали в лаборатории и использовали для генетической трансформации.

Конструирование бинарного вектора с геном *PpGST* для трансформации табака. Для сверхэкспрессии трансгена в растениях использовали модифицированный вектор pCAMBIA2300s [29]. Сайты узнавания BamHI и EcoRI вводили, соответственно, в 5'-области прямого и обратного праймеров для амплификации полиморфной ORF *PpGST* (прямой праймер – 5'-GGAATTC.....3'; обратный праймер – 5'-GAATTC....3'). Амплифицированный продукт сначала клонировали в векторе

pM9-18T (“Takara”, Япония). Полноразмерные ORF *PpGST* получали путем двойного расщепления pM9-18T-PpGST рестриктазами BamHI и EcoRI, а затем встраивали в вектор для экспрессии в растениях – pCAMBIA2300s, расщепленный теми же двумя рестриктазами. Продукты лигирования вводили в компетентные клетки штамма DH5α *Escherichia coli*. Рекомбинантные плазмиды pCAMBIA2300s-PpGST (рис. 1) отбирали с помощью ПЦР.

Трансформация табака и ПЦР-скрининг трансгенных линий. Плазмиды pCAMBIA2300s-PpGST переносили в клетки *A. tumefaciens* LBA4404, используя метод замораживания–оттаивания [30]. Колонии, содержащие встроенную плазмиду, отбирали на чашках со средой LB с канамицином (0.1 мг/мл) и проверяли с помощью ПЦР. Положительные клоны *A. tumefaciens* использовали для трансформации листовых дисков табака [31]. Регенеранты табака отбирали на 0.5-кратной среде MS, содержащей 0.05 мг/мл канамицина. Геномную ДНК выделяли, используя цетавлоновый метод (СТАВ, цетилтриметиламмонийбромид). При отсутствии полноразмерной ORF *PpGST* в положительных трансгенных растениях табака определяли с использованием растений табака дикого типа (WT) в качестве контроля.

Саузерн-блотинг. Геномную ДНК (10 мкг) трех положительных трансгенных растений и WT-растений полностью расщепляли EcoRI, продукты разделяли в 1%-ном агарозном геле и переносили на нейлоновую мембрану (Hybond NT, “Amersham”, Великобритания) посредством восходящего капиллярного транспорта. Меченный ^{32}P (Prime-a-Gene Labeling System Kit, “Promega”) фрагмент (400 п.н.) гена *NPTII* плазмиды pCAMBIA2300s использовали в качестве специфической пробы. Методика гибридизации и радиоавтографии соответствовала процедуре обратного нозерн-блотинга, описанной ранее [32].

Абиотическая стрессовая обработка. Проростки T_1 трансгенных линий и одной WT-линии помещали в сосуды, заполненные смесью гумуса, песка и почвы, и культивировали в фитотроне в течение 2 нед с фотопериодом 16 ч/8 ч (свет/темнота при температуре 25°C и относительной влажности 50%). Затем растения переносили в оранжерею на 2 нед и сбрызгивали питательным раствором Хогланда каждые 3 дня. После снижения содержания воды в почве до

9% растения не поливали в течение 7 дней, чтобы оценить устойчивость к стрессу, вызванному засухой. Для оценки устойчивости к соли растения поливали в течение 10 дней 500 мМ раствором NaCl, а для оценки устойчивости к Cd – в течение 5 дней 50 мМ раствором CdCl₂. Контрольные группы трансгенных растений и WT-растений при оценке стрессоустойчивости поливали раствором Хогланда.

Количественный метод обратной транскрипции–ПЦР (кОТ–ПЦР). кОТ–ПЦР проводили, используя специфические праймеры к *PpGST*: прямой – 5'-TGCTGACTC...3' и обратный – 5'-TTCCAATAT...3'. Систему ABI 7500 Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США) применяли в соответствии с инструкцией производителя. Уровень экспрессии гена актина табака (AB158612.1) использовали в качестве внутреннего контроля для нормирования (стандартизации) образцов РНК в каждом определении методом кОТ–ПЦР. кОТ–ПЦР проводили в 20 мкл смеси, содержащей продукт обратной транскрипции, 5 нг суммарной РНК, 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix (“Toyobo”, Япония) и 0.1 мкл 10 мкМ раствора каждого праймера. Получение суммарной РНК из трансгенных и WT-растений, синтез первой цепи кДНК проводили согласно [29]. ПЦР в реальном времени проводили в следующем температурном режиме: 2 мин, 50°C; 10 мин, 95°C для активации ДНК-полимеразы. Далее проводили денатурацию при 95°C, 15 с; отжиг, удлинение праймера и измерение флуоресценции – 60°C, 1 мин (40 циклов). Затем строили кривую плавления. Каждое определение методом кОТ–ПЦР проводили в трех повторностях.

Определение скорости продукции супероксидного аниона и содержания малонового диальдегида (МДА). Использовали модифицированный метод определения скорости образования супероксидного аниона [33]. Приблизительно 0.5 г свежих листьев измельчали в жидком азоте и добавляли 1.5 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). После центрифугирования при 12000 g (20 мин, 4°C) отбирали супернатант. Инкубационную смесь, содержащую 0.5 мл супернатанта, 0.5 мл 50 мМ фосфатного буфера (рН 7.0), 1 мл 1 мМ сульфаниловой кислоты и 1 мл 7 мМ альфанафтиламина, инкубировали при 25°C в течение 20 мин, затем измеряли поглощение при 530 нм. Стандартную кривую строили согласно [33].

Содержание МДА измеряли согласно [4]. Листья контрольных и подвергнутых абиотическому стрессу растений растирали в жидком азоте до состояния пудры и суспендировали в 0.2 мл дистиллированной воды, затем гомогенизировали с равным объемом 0.5%-ной (в/об) тиобарбитуровой кислоты в 20%-ной (об/об) трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Смесь инкубировали при 95°C в течение

30 мин, а затем охлаждали во льду в течение 15 мин для остановки реакции. После центрифугирования при 13000 g (30 мин, 4°C) измеряли поглощение супернатанта при 532 и 600 нм. Значение неспецифического поглощения при 600 нм вычитали из значения поглощения при 532 нм. Коэффициент поглощения МДА – 155 нмоль/см.

Определение активности GST. Ферментативную активность GST определяли согласно [34]. Примерно 0.2 г листьев контрольных или подвергнутых абиотическому стрессу растений табака растирали в жидком азоте до состояния пудры и гомогенизировали в 0.2 мл буфера для экстракции белков – 50 мМ фосфатный буфер, рН 7.0, 1 мМ EDTA, 0.05% (об/об) тритона X-100, 2.0% поливинилпирролидона (PVP), 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). После центрифугирования при 18000 g (20 мин, 4°C) в супернатанте определяли активность GST. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 50 мМ фосфатного буфера, рН 7.0, 1 мМ CDNB, 1 мМ восстановленного GSH и 50 мкл супернатанта. Смесь инкубировали при 25°C и через определенные промежутки времени измеряли поглощение при 340 нм.

Статистический анализ. Все данные представлены в виде средних значений ± стандартные отклонения. Статистический анализ проводили, используя SPSS. Статистическую значимость различий между трансгенными линиями T₁ и WT-растениями анализировали с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Селекция трансгенных растений табака

Около 200 листовых дисков *N. tabacum* L. cv Xanthi трансформировали в 12 отдельных опытах, используя *A. tumefaciens* LBA4404 с экспрессирующей *PpGST* кассетой, и получили 45 независимых трансгенных линий T₀, устойчивых к канамицину. С помощью ПЦР-анализа геномной ДНК отобрали 34 положительные трансгенные линии, содержащие ген *PpGST*. Анализ морфологии и роста трансформантов не выявил различий между трансгенными и нетрансформированными растениями.

Анализ трансгенных растений табака, несущих ген PpGST, методом Саузерн-блоттинга и получение поколения T₁ трансгенных растений

Саузерн-блот-анализ с использованием в качестве специфического зонда гена *NPTII* выявил несколько вставок в четырех случайно отображенных линиях табака (рис. 2). Число копий в этих линиях варьировало от одной до трех, а три линии содержали одну или две копии трансгенной конструк-

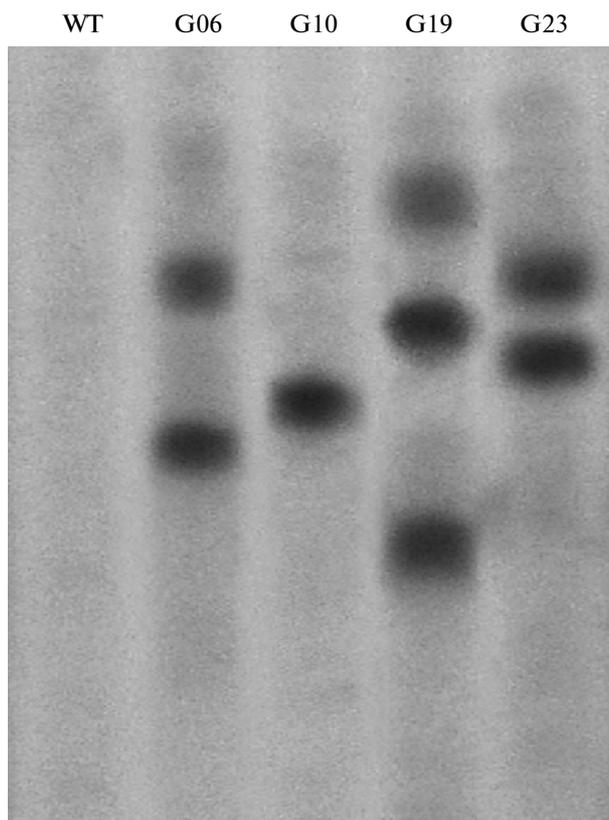


Рис. 2. Анализ копийности гена *PpGST* в трансгенных растениях табака. Для анализа методом Саузерн-блотинга ДНК выделяли из WT-растений и из четырех трансформантов – G06, G10, G19, G23, расщепляли *EcoRI* и гибридизовали с *NP11*-зондом размером 460 п.н.

ции *PpGST*. В линии G10 была однокопийная вставка, в двух линиях – G06 и G23 – двойные копии. Линия G19 содержала три копии Т-ДНК. На рис. 2 представлены различные профили экспрессии трансгена в четырех случайно взятых растениях T_0 . Представленные трансгенные линии вне всякого сомнения содержали ген *PpGST*, в разных линиях интегрированный в разные участки генома. Анализ косегрегации проводили с помощью селекции на устойчивость к канамицину и ПЦР-анализа инбридности. Получили поколение T_1 трансгенных линий G06, G10 и G23, содержащих одну или две копии Т-ДНК. Растения поколения T_1 этих трех линий использовали в дальнейшей работе.

PpGST экспрессируется в трансгенных линиях табака T_1

Экспрессируется ли ген *PpGST* при разных видах стресса? Чтобы ответить на этот вопрос из молодых листьев растений табака T_1 (линии G06, G10, G23) выделяли суммарную РНК и определяли уровень экспрессии *PpGST* методом кОТ–ПЦР (рис. 3). *PpGST* экспрессируется на уровне транскрипции во всех трех трансгенных линиях табака.

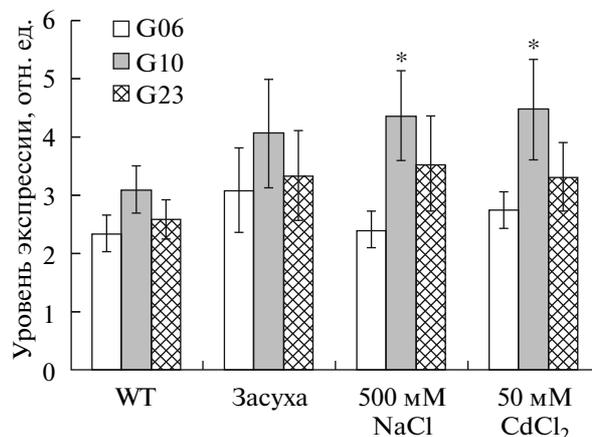


Рис. 3. Анализ экспрессии гена *PpGST* в растениях T_1 трансгенных линий табака методом кОТ–ПЦР. Показаны относительные значения уровней экспрессии *PpGST* в молодых листьях табака в нормальных условиях и при стрессе. *PpGST* экспрессируется на уровне транскрипции во всех трех трансгенных линиях табака и активируется в разной степени под действием стресса, вызванного засухой, NaCl и Cd. Здесь, а также на рис. 5 и рис. 6 представлены средние значения \pm квадратичные отклонения результатов трех независимых опытов. * и ** – доверительные интервалы, $p < 0.05$ и $p < 0.01$, соответственно, по сравнению с WT-растениями согласно критерию Стьюдента.

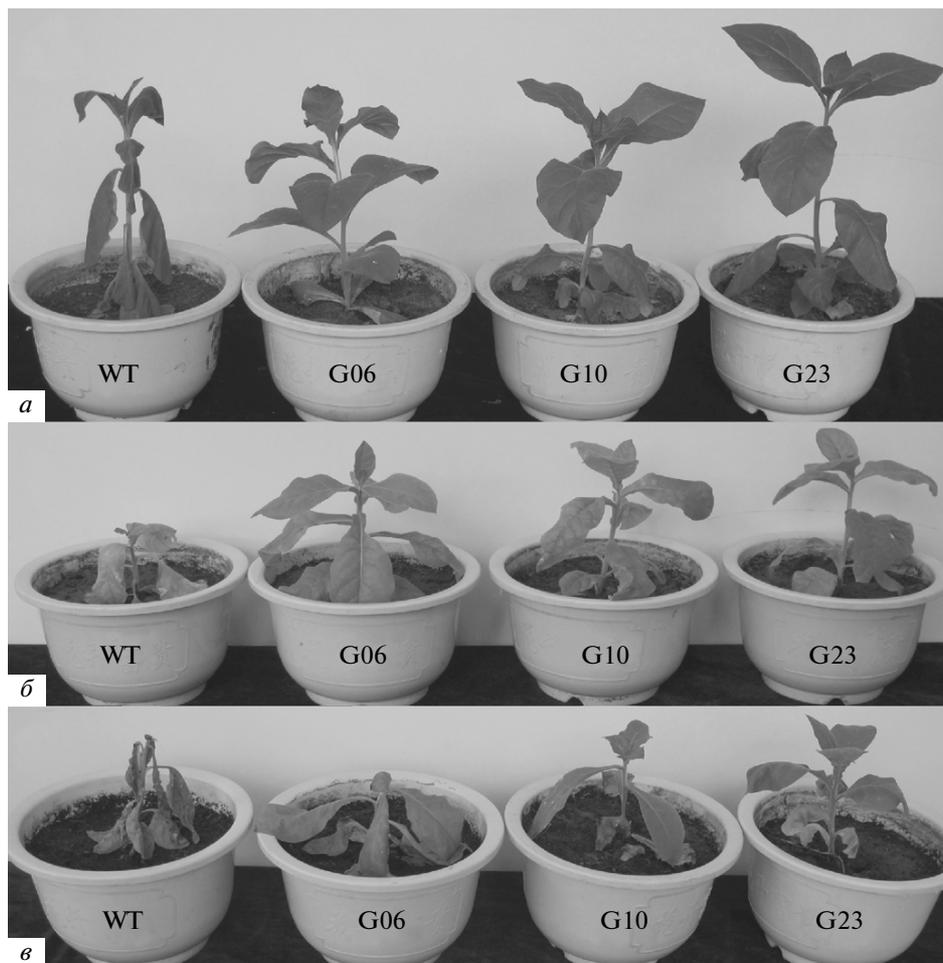


Рис. 4. Рост трансгенных растений табака с геном *PpGST* и WT-растений в условиях стресса, вызванного засухой (а), действием NaCl (б) и Cd (в). Растения, сверхэкспрессирующие *PpGST*, растут в условиях стресса относительно нормально.

Хорошо видно, что экспрессия гена *PpGST* повышается в разной степени при воздействии засухи, NaCl и Cd по сравнению с уровнем экспрессии в нормальных условиях. Из рис. 3 видно, что в трансгенной линии G10 экспрессия гена *PpGST* заметно индуцировалась при обработке 500 мМ NaCl и 50 мМ CdCl₂, однако в линиях G06 и G23, подвергнутых абиотическому стрессу, не наблюдалось существенных различий в экспрессии гена. Кроме того, в трансгенной линии G10 с однокопийной вставкой уровень экспрессии гена *PpGST* на уровне транскрипции был выше, чем в двух других линиях с двумя копиями вставки, независимо от условий выращивания.

Результаты КОТ–ПЦР указывают, что ген *PpGST* экспрессируется в трансгенных линиях табака под контролем промотора 35S CaMV (вирус мозаики цветной капусты) и экспрессия гена *PpGST* активируется в использованных условиях стресса.

Фенотип и физиология трансгенных растений табака T₁ в условиях стресса, вызванного засухой, NaCl и Cd

Растения, трансгенные по *PpGST*, и WT-растения в нормальных (нестрессовых) условиях росли одинаково. Для проверки устойчивости к засухе, действию солей или Cd растения T₁ (линии G01, G10, G23) и WT-растения прекращали поливать, поливали 500 мМ NaCl или 50 мМ CdCl₂, соответственно, и оценивали изменение фенотипа. В условиях засухи WT-растения сильно обезвоживались и увядали, тогда как растения трех трансгенных линий не проявляли видимых признаков увядания (рис. 4а). При солевом стрессе (500 мМ NaCl, 10 дней) рост WT-растений сильно подавлялся, наблюдалось увядание и этиолирование листьев, тогда как трансгенные по *PpGST* линии табака имели нормальный вид при незначительном подавлении роста и этиолировании листьев (рис. 4б). При стрессе, вызванном солями Cd, у WT-растений был выражен токсикоз с сильным

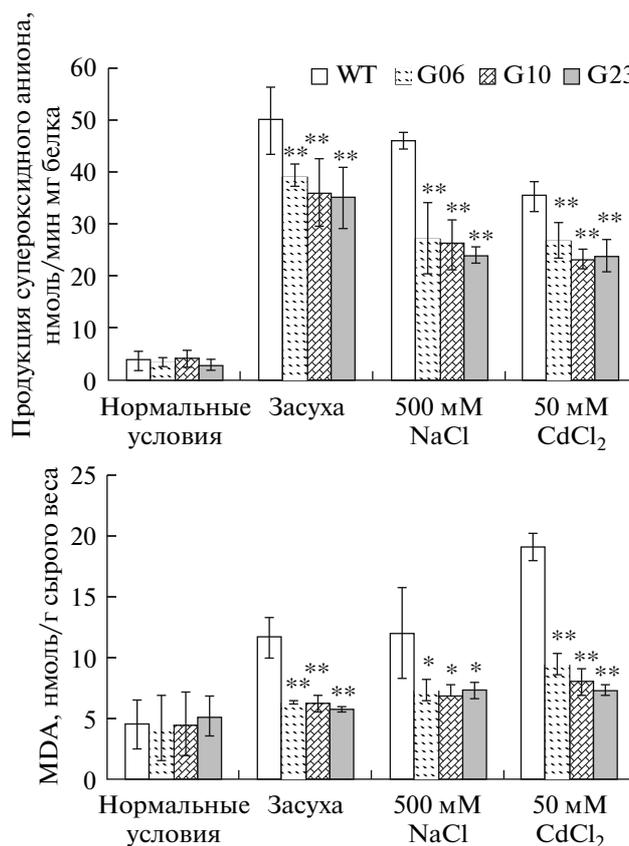


Рис. 5. Действие засухи, NaCl и Cd на скорость продукции супероксидного аниона и содержание МДА в листьях трансгенных растений табака с геном *PpGST* и WT-растений.

увяданием листьев и подавлением роста (рис. 4б). Напротив, стресс, вызванный Cd, приводил к незначительному этиолированию трансгенных растений и не влиял на их рост. Другими словами, трансгенные растения относительно нормально росли в условиях стресса, что свидетельствует о повышении устойчивости к действию засухи, солей Cd и NaCl при сверхэкспрессии *PpGST*.

Для оценки стрессовой устойчивости трансгенных линий табака сравнили WT-растения и растения трех трансгенных линий (G06, G10 и G23). Стресс, вызванный использованными нами воздействиями, приводит к образованию избыточного количества АФК и к окислительному повреждению растений. Один из наиболее активных видов АФК — супероксидный анион — может индуцировать образование дополнительных АФК, подобных OH^\bullet . Перекисное окисление липидов — цепная реакция окисления полиненасыщенных жирных кислот в мембранах под действием АФК и др. свободных радикалов. Конечным продуктом и индикатором этого процесса является МДА. Скорость образования супероксидного радикала и содержание МДА считают маркерами окислительного повреждения клеток и перекисного окисле-

ния липидов. GST растений участвуют в ответе на окислительный стресс, в метаболизации токсических продуктов перекисного окисления липидов, повреждения ДНК и других соединений. В настоящей работе ген *GST-PpGST* был перенесен в растения табака, поэтому активность GST определяли в трансгенных растениях T₁ и в WT-растениях (контроль) в нормальных и стрессовых условиях.

При нормальном росте и развитии скорость продукции супероксидного радикала была стабильной и поддерживалась на низком уровне; отсутствовали существенные различия между WT-растениями и трансгенными линиями (рис. 5). Скорость продукции супероксидного радикала, однако, резко увеличивалась в WT-растениях и во всех трех трансгенных линиях под действием засухи, NaCl и Cd. Несмотря на это, в растениях трансгенных линий табака с геном *PpGST* скорость образования супероксидного аниона при всех видах абиотического стресса была значительно ниже, чем в WT-растениях (рис. 5). Таким образом, стресс вызывает меньше окислительных повреждений в растениях табака, сверхэкспрессирующих *PpGST*.

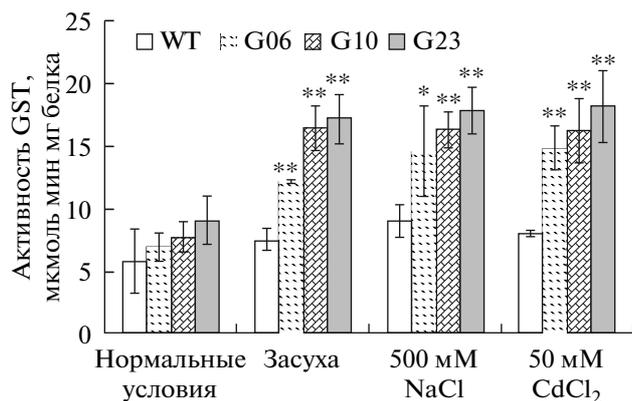


Рис. 6. Определение активности GST в трансгенных растениях табака с геном *PpGST* и в WT-растениях в нормальных и стрессовых условиях.

Не выявлено существенных различий в содержании МДА в трансгенных растениях и в WT-растениях, растущих в нормальных условиях (рис. 5). После прекращения полива или при обработке растворами NaCl или CdCl₂ содержание МДА в растениях дикого типа резко возрастало, а в трансгенных растениях увеличивалось незначительно (рис. 5). Таким образом, снижение содержания МДА в трансгенных линиях табака, несущих ген *PpGST*, указывает на защиту мембран от абиотического стресса.

В нормальных условиях суммарная активность GST в каждой из трансгенных линий более чем на 19% превышала активность в WT-растениях (рис. 6). Это говорит о том, что сверхэкспрессия *PpGST* из *P. pyrifolia* повышает активность GST в трансгенных линиях табака (рис. 6), а в сочетании с результатами КОТ–ПЦР указывает на экспрессию гена *PpGST* не только на уровне мРНК, но и на уровне белка. Ген *PpGST* может регулироваться на трансляционном или посттранскрипционном уровне, поскольку не выявлено положительной корреляции между уровнем транскрипции гена *PpGST* и активностью GST в трансгенных линиях. При воздействии засухи, NaCl или Cd активность GST резко возрастает. В WT-растениях активность GST в условиях стресса также повышается, однако амплитуда увеличения в WT-растениях была меньше, чем в трансгенных линиях (рис. 6). Таким образом, значительное возрастание активности GST вследствие сверхэкспрессии *PpGST* приводило к повышению устойчивости к стрессу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

GST входит в суперсемейство многофункциональных ферментов. Хорошо известно, что GST могут конъюгировать GSH с разными ксенобиотиками и секвестрировать многие эндогенные

или экзогенные токсичные соединения. Кроме того, в течение длительного времени GST связывают с устойчивостью к стрессу, поскольку многие растительные GST индуцируются при воздействии различных видов биотического и абиотического стресса, таких как заболевания, воздействие факторов окружающей среды и токсичных химических соединений [9, 10, 18, 35]. Доказано, что GST участвуют в защите клеток от окислительного повреждения [11]. Ранее мы выделили ген ζ -GST *PpGST* из *P. pyrifolia* Nakai cv Huobali и показали, что *PpGST* экспрессируется, в основном, в перикарпе плодов “Huobali”. Возможную ассоциацию *PpGST* с устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному засухой, NaCl или Cd, изучали с использованием сконструированного нами вектора для сверхэкспрессии *PpGST*, который перенесли в растения табака. Методом КОТ–ПЦР (рис. 3) показали, что в нормальных условиях транскрипты *PpGST* в избытке накапливаются в растениях T₁ табака. Экспрессия гена *PpGST* лишь слегка индуцировалась под действием трех использованных видов стресса, но в трансгенной линии G10 уровень экспрессии значительно изменился в присутствии NaCl или Cd. Следует отметить, что промотор 35S CaMV, который направляет экспрессию гена *PpGST*, является конститутивным, но иногда ген, контролируемый этим промотором, индуцируется некоторыми видами стресса [36].

Была определена скорость роста трансгенных растений табака и WT-растений при стрессе, а также изучены их морфологические особенности. Оказалось, что трансгенные растения росли лучше, чем WT-растения, хотя рост трансгенных растений также подавлялся в разной степени под действием стресса (рис. 4).

Лучшее состояние растений табака, сверхэкспрессирующих *PpGST*, при абиотическом стрессе можно объяснить накоплением в них GST, эффективно защищающей трансгенные растения от окислительного стресса. В трансгенных растениях T₁, сверхэкспрессирующих *PpGST*, суммарная активность GST была значительно выше, чем в WT-растениях, причем не только в нормальных условиях, но и при стрессе (рис. 6). Более того, виды абиотического стресса, использованные нами, заметно индуцировали активность GST в трансгенных линиях. Более высокая активность GST наблюдалась и в трансгенных растениях *Dianthus superbus*, сверхэкспрессирующих ген *GST* табака, и в растениях табака, сверхэкспрессирующих гены *GST* из *Prosopis juliflora*, *Salicornia brachiata*, *Trichoderma virens* и *Escherichia coli* соответственно [4, 17, 27, 37, 38]. Определение активности GST подтвердило, что перенесенный ген *PpGST* кодирует фермент, активный в трансгенных растениях табака. Результаты нашей работы,

а также полученные ранее данные указывают на то, что активность GST, кодируемых генами растений, полностью проявляется в гетерологичных системах экспрессии.

Более важно то, что в физиологических исследованиях получены прямые доказательства значительного снижения скорости синтеза супероксидного аниона и перекисного окисления липидов при сверхэкспрессии *PpGST* (рис. 5). Устойчивость растений T₁ трансгенных линий табака к действию стресса была выше, чем у растений дикого типа. Не вызывает сомнений, что *PpGST* из *P. pyrifolia* играет важную роль в устойчивости к абиотическому стрессу. Ранее показали, что GST участвуют в антиоксидантном ответе и повышают устойчивость к абиотическому стрессу растений, сверхэкспрессирующих GST. В растениях *D. superbus*, экспрессирующих GST табака, (NT107), отмечены улучшения фотосинтетических функций в условиях засухи и при высокой интенсивности освещения, а также накопление и транслокация меди [37]. Ген *gstI* кукурузы сверхэкспрессировали в растениях табака. Оказалось, что у трансгенных растений повышалась устойчивость к гербициду алахлору [24]. *PjGST41* из *P. juliflora* придавала растениям табака устойчивость к засухе [27]. Сверхэкспрессия *AtGSTF10 Arabidopsis* и *SbGSTU S. rachiata*, соответственно, обеспечивала высокую устойчивость трансгенных растений к соли [17, 25]. Ген GST из *E. coli* был перенесен в хлоропласты табака, и трансгенные линии проявляли повышенную устойчивость к соли и холоду, а сверхэкспрессия гена GST *T. virens* в растениях табака повышала устойчивость трансформантов к кадмию.

Механизмы, с помощью которых GST защищают растения от окислительного стресса, далеко не ясны. Абиотический стресс, вызванный в том числе засухой, солью, кадмием, подавляет рост растений, изменяет их морфологию, нарушает физиологические и биохимические процессы, генерирует АФК и ведет к окислительным повреждениям. GST участвуют в формировании устойчивости к абиотическому стрессу, а повышение устойчивости растений, сверхэкспрессирующих GST, может быть обусловлено повышением уровня ферментов, нейтрализующих АФК, которые удаляют избыток H₂O₂, супероксидного аниона и других АФК. Явно пониженный уровень H₂O₂ и супероксидного аниона в трансгенных растениях, сверхэкспрессирующих GST, в условиях стресса подтвержден в нашей работе и в других сообщениях [4]. GSH-конъюгирующая активность GST важна для детоксикации клеточных продуктов деградации, которые образуются в ходе ответа растений на окислительный стресс. Кроме того, GST обладают GSH-зависимой пероксидазной активностью (GPOX), вовлеченной в восстанов-

ление гидропероксидов жирных и нуклеиновых кислот в соответствующие моногидроксиспирты с использованием GSH в качестве донора электронов. Таким образом, установлено, что GST, обладающие пероксидазной активностью, играют критическую роль в противодействии окислительным повреждениям, вызванным стрессом [27, 39, 40]. Более того, сверхэкспрессия специфических генов GST влияет на экспрессию генов других антиоксидантов. В проростках растений табака, несущих трансген GST, активность GST, APX и монодегидроаскорбатредуктазы выше, чем в нетрансгенных проростках [41]. Сходные данные приведены и в других работах [4, 38].

Следовательно, одновременное повышение активности GST, APX и других антиоксидантных ферментов обеспечивает более высокую степень устойчивости к окислительным повреждениям при стрессе. Кроме того, методами РНК-интерференции показано, что GST *phi Arabidopsis* участвует в ограничении метаболических изменений, которые возникают при окислительном стрессе [18]. Главный локус количественных признаков (*QTL*), определяющий холодоустойчивость проростков риса, картирован в области, содержащей гены *OsGSTZ1* и *OsGSTZ2*, а однонуклеотидные полиморфизмы из этой области статистически значимо ассоциированы с холодной чувствительностью и активностью малеил-ацетоацетат-изомеразы в проростках риса [42]. *OsGSTZ2*, продукт которого обладает активностью этой изомеразы, может участвовать в формировании устойчивости к холодному повреждению.

Итак, сверхэкспрессия *PpGST* из плодов *P. pyrifolia* повышает устойчивость трансгенных растений T₁ табака к действию изученных нами видов стресса. Однако необходимо дальнейшее изучение механизмов, при помощи которых *PpGST* обеспечивает повышение устойчивости к абиотическому стрессу. Проводятся опыты по получению очищенного *PpGST*, экспрессируемого в системе из клеток *E. coli*, чтобы определить его удельную активность. Изучается активность других ферментов, вовлеченных в обезвреживание АФК, в растениях табака, несущих трансген *PpGST*. Понимание механизмов действия *PpGST* может помочь в создании генетически модифицированных сортов растений с высокой устойчивостью к абиотическому стрессу.

Авторы признательны Yunnan Provincia Natural Science Foundation за финансовую поддержку этой работы (грант 2008ZCO36M).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang W., Vinocur B., Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. **218**, 1–14.

2. Mohanpuria P., Rana N.K., Yadav S.K. 2007. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ. Toxicol.* **22**, 368–374.
3. Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Botany.* **2012**, 1–26.
4. Le Martret B., Poage M., Shiel K., Nugent G.D., Dix P.J. 2011. Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 661–673.
5. Coleman J.O.D., Blake-Kal M.M.A., Davies T.G.E. 1997. Detoxication of xenobiotics in plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends. Plant Sci.* **4**, 144–151.
6. Dixon D.P., Davis B.G., Edwards R. 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. *J. Biol. Chem.* **277**, 30859–30869.
7. Sappl P.G., Heazlewood J., Millar A.H. 2004. Untangling multi-gene families in plants by integrating proteomics into functional genomics. *Phytochemistry.* **65**, 1517–1530.
8. Soranzo N., Sari Gorla M., Mizzi L., De Toma G., Fropa C. 2004. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol. Genet. Genomics.* **271**, 511–521.
9. Lan T., Yang Z.L., Yang X., Liu Y.J., Wang X.R., Zeng Q.Y. 2009. Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *Plant Cell.* **21**, 3749–3766.
10. Chi Y., Cheng Y., Vanitha J., Kumar N., Ramamoorthy R., Ramachandran S., Jiang S.Y. 2011. Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione S-transferase family in sorghum and other higher plants. *DNA Res.* **18**, 1–16.
11. Fropa C. 2003. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol. Plantarum.* **119**, 469–479.
12. Pascal S., Scalla R. 1999. Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* **106**, 17–27.
13. Gallé A., Csiszár J., Secenji M., Guóth A., Cseuz L., Tari I., Györgyey J., Erdei L. 2009. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit. *J. Plant Physiol.* **166**, 1878–1891.
14. Lo Piero A.R., Mercurio V., Puglisi I., Petrone G. 2009. Gene isolation and expression analysis of two distinct sweet orange [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)] tau-type glutathione transferases. *Gene.* **443**, 143–150.
15. Sytykiewicz H. 2011. Expression patterns of glutathione transferase gene (*GstI*) in maize seedlings under juglone-induced oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 7982–7995.
16. Takahashi Y., Nagata T. 1992. parB: an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 56–59.
17. Jha B., Sharma A., Mishra A. 2011. Expression of *SbG-STU* (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 4823–4832.
18. Sappl P.G., Carroll A.J., Clifton R., Lister R., Whelan J., Harvey Millar A., Singh K.B. 2009. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.* **58**, 53–68.
19. DeRidder B.P., Dixon D.P., Beussman D.J., Edwards R., Goldsbrough P.B. 2002. Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiol.* **130**, 1497–1505.
20. Yu M., Facchini P.J. 2000. Molecular cloning and characterization of a type III glutathione S-transferase from cell suspension cultures of opium poppy treated with a fungal elicitor. *Physiol. Plantarum.* **108**, 101–109.
21. Jones A.M., Thomas V., Truman B., Lilley K., Mansfield J., Grant M. 2004. Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry.* **65**, 1805–1816.
22. Bartoli C.G., Simontacchi M., Tambussi E., Beltrano J., Montaldi E., Puntarulo S. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* **50**, 375–383.
23. Kuźniak E., Skłodowska M. 2004. Differential implication of glutathione, glutathione-metabolizing enzymes and ascorbate in tomato resistance to *Pseudomonas syringae*. *J. Phytopathol.* **152**, 529–536.
24. Karavangeli M., Labrou N.E., Clonis Y.D., Tsaftaris A. 2005. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomol. Eng.* **22**, 121–128.
25. Ryu H.Y., Kim S.Y., Park H.M., You J.Y., Kim B.H., Lee J.S., Nam K.H. 2009. Modulations of *AtGSTF10* expression induce stress tolerance and BAK1-mediated cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 417–422.
26. Zhao F.Y., Liu W., Zhang S.Y. 2009. Different responses of plant growth and antioxidant system to the combination of cadmium and heat stress in transgenic and non-transgenic rice. *J. Integr. Plant Biol.* **51**, 942–950.
27. George S., Venkataraman G., Parida A. 2010. A chloroplast-localized and auxin-induced glutathione S-transferase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confer drought tolerance on tobacco. *J. Plant Physiol.* **167**, 311–318.
28. Liu D., Wang G., Wang J., Ge F., Chen C. 2012. Cloning and expression of a glutathione-S-transferase gene from *Pyrus pyrifolia* Nakai cv Huobali, *Acta Bot. Borealo-Occident. Sin.* **32**, 0029–0034 (in Chinese).
29. Liu D., He X., Li W., Chen C., Ge F. 2012. Molecular cloning of a thaumatin-like protein gene from *Pyrus pyrifolia* and overexpression of this gene in tobacco increased resistance to pathogenic fungi. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **111**, 29–39.
30. Holsters M., de Waele D., Depicker A., Messens E., van Montagu M., Schell J. 1978. Transfection and transform-

- mation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **163**, 181–187.
31. Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. **227**, 1229–1230.
 32. Liu D., Zhang X., Tu L., Zhu L., Guo X. 2006. Isolation by suppression-subtractive hybridization of genes preferentially expressed during early and late fiber development stages in cotton. *Mol. Biol.* **40**, 825–834.
 33. Wang A.G., Luo G.H. 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiol. Commun.* **26**, 55–57 (in Chinese).
 34. Veal E.A., Toone W.M., Jones N., Morgan B.A. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 35523–35531.
 35. Jain M., Ghanashyam C., Bhattacharjee A. 2010. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics*. **11**, 73.
 36. Kasuga M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* **45**, 346–350.
 37. Lim J.D., Hahn S.J., Yu C.Y., Chung I.M. 2005. Expression of the glutathione S-transferase gene (NT107) in transgenic *Dianthus superbus*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **80**, 277–286.
 38. Dixit P., Mukherjee P.K., Ramachandran V., Eapen S. Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS One*. **6**, e16360.
 39. Cummins I., Cole D.J., Edwards R. 1997. Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with safener fenchlorazole-ethyl. *Pestic. Biochem. Physiol.* **53**, 35–49.
 40. Roxas V.P., Smith R.K.Jr., Allen E.R., Allen R.D. 1997. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnol.* **15**, 988–991.
 41. Roxas V.P., Lodhi S.A., Garrett D.K., Mahan J.R., Allen R.D. 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione Peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1229–1234.
 42. Kim S.I., Andaya V.C., Tai T.H. 2011. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isoenzyme GSTZ2. *Biochem. J.* **435**, 373–380.