

Luis Antônio Serrão Contim

**Análise Molecular da Família Gênica *SBP* da Soja: Organização Genômica e Expressão Tecido-específica e Dependente de Sacarose.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Doctor Scientiae".

Viçosa  
Minas Gerais – Brasil  
Novembro - 2002

Luis Antônio Serrão Contim

**Análise Molecular da Família Gênica *SBP* da Soja: Organização Genômica e Expressão Tecido-específica e Dependente de Sacarose.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Doctor Scientiae".

APROVADA: 15 de outubro de 2002

---

Prof. Carlos Roberto de Carvalho

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

---

Prof<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Cristina Baracat Pereira

---

Dr<sup>a</sup> Cláudia Teixeira Guimarães

---

Prof<sup>a</sup> Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
Orientadora

## **Agradecimentos**

À Deus antes de tudo, que é a minha fortaleza e meu refúgio.

À minha esposa Luciana, pelo amor incondicional e dedicado, pelo incentivo constante e pela compreensão.

Às minhas filhas Ana Luisa e Marília, por me ensinarem o verdadeiro sentido da minha vida, o amor.

Aos meus pais queridos, Luiz e Arlete, pelo incentivo sem limites, pelo suor e sangue derramados por mim, pela integridade, minhas escolas do amor.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores, em especial à minha orientadora, pela sua competência profissional e pela dedicação na orientação deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, em especial aos que contribuíram diretamente para o êxito deste trabalho, Adriana, Alessandro, Aloísio e Carolina.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A cada brasileiro sofrido que, diante da dureza de sua realidade, financiaram minha bolsa de estudos e meu trabalho.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como o bronze que soa, ou como o símbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, não sou nada.”

I Cor 13, 1-2

## **Biografia**

LUIS ANTÔNIO SERRÃO CONTIM, filho de Luiz da Silveira Contin e Arlete dos Santos Serrão Contin, é natural de Governador Valadares, estado de Minas Gerais, nascido no dia 06 de dezembro de 1974.

Em dezembro de 1997, diplomou-se Engenheiro-Agrônomo, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em março de 1998, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento nessa Universidade, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de Plantas, concluindo sua tese em agosto de 1999.

Em agosto de 1999, iniciou o Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento nessa Universidade, consolidando sua formação na área de Biologia Molecular de Plantas.

## Conteúdo

Resumo.....	v
Introdução geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	4
Artigo I.....	6
Abstract.....	8
Introduction.....	9
Material and Methods.....	11
Results.....	15
Discussion.....	18
References.....	21
Figure legends.....	27
Figures.....	29
Artigo II.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	44
Resultados.....	47
Discussão.....	61
Referências Bibliográficas.....	67
Resumo e Conclusões Gerais.....	78

## Resumo

A proteína SBP (Sucrose Binding Protein) foi inicialmente identificada pela sua capacidade de se ligar a sacarose e parece estar envolvida na via de translocação de sacarose em plantas superiores. Nesta investigação, foram isolados de uma biblioteca genômica de soja, propagada em  $\lambda$ ZAPII, dois clones genômicos, que correspondem às formas alélicas do gene *SBP2*. O número de cópias gênicas da família *SBP* foi estimado por Southern blot e por FISH (Fluorescence *in situ* Hibridization), utilizando o cDNA *SBP* e o clone genômico *SBP2* como sondas, em lâminas com núcleos interfásicos de soja. O padrão de hibridização demonstrou a existência de dois pares de genes homólogos, com razão de hibridização diferente, representando os dois genes distintos, *SBP* e *SBP2*.

Para investigar a funcionalidade da sequência do promotor *SBP2*, aproximadamente 2,0 quilobases da região 5' foram sequenciadas e fusionadas aos genes repórteres *GUS* (beta-glucuronidase) e *GFP* (Green Fluorescent Protein) e analisados em plantas de tabaco transgênicas. Os ensaios histoquímicos demonstraram que ambos os promotores exibem expressão tecido-específica. Estes resultados foram confirmados pela fluorescência tecido-específica da expressão de *GFP*. Consistente com seu envolvimento no transporte de sacarose a longa distância, os promotores *SBP2* dirigiram a expressão dos genes repórteres com alta especificidade para o floema de todos os órgãos analisados, como meristema, caule, folha e raiz. Entretanto, altos níveis de expressão foram observados predominantemente no meristema e em folhas-dreno. Foi também demonstrado que o promotor *SBP2* é regulado de modo dependente da forma e da concentração de açúcar disponível no meio de cultura de células de tabaco transgênico em suspensão.

Deleções no promotor *SBP2* foram feitas para a identificação de regiões contendo elementos regulatórios em *cis*. Ensaio histoquímico com plantas transgênicas contendo as construções quiméricas com as deleções do promotor

demonstraram que o padrão tecido-específico do gene *SBP2* é coordenado pela interação entre elementos regulatórios positivos e negativos. A região contida entre as posições -2000 até -490 possui elementos positivos que potencializam a expressão no floema, uma vez que a deleção dessa região causou um decréscimo substancial na atividade do promotor. A deleção adicional do promotor até a posição -364 restaurou a atividade do promotor em todos os tecidos analisados. Como conseqüência, a atividade quantitativa de GUS foi muito superior àquela observada para o promotor intacto. Estes resultados indicam a presença de um elemento silenciador, na região delimitada pelas posições -489 a -364. Além disso, a região de -363 a -132 possui um elemento positivo, responsável pela expressão no meristema radicular, uma vez que a deleção deste fragmento silencia a expressão de GUS no meristema radicular. O padrão de expressão tecido-específico, das construções quiméricas das deleções do promotor, se correlaciona com a distribuição dos elementos *DOF* na seqüência do promotor, em associação com os elementos *O2* e *GCN4*.

Coletivamente, estes resultados mostram que o promotor *SBP* representa uma poderosa ferramenta biotecnológica útil para o direcionamento da expressão de genes alvos para o tecido vascular de plantas de soja e tabaco transgênicas

## Introdução Geral

As plantas superiores são organismos complexos e possuem capacidade para diferenciar em tecidos altamente especializados, que exibem funções vitais específicas. Esta especialização dos tecidos é acompanhada pela perda da autonomia, o que torna indispensável a colaboração e a conexão a longa distância entre diferentes tipos celulares. Os elementos do floema e do xilema formam uma rede capilar conectando órgãos-fonte e órgãos-dreno a longa distância. Os tecidos verdes são dependentes do suprimento de água e sais minerais absorvidos pelo sistema radicular e transportados via xilema, enquanto que os tecidos não verdes dependem do suprimento de carbono fixado em órgãos-fonte e transportado via floema (Esaú, 1965). A existência de uma rede de transporte a longa distância bem coordenada foi um pré-requisito para o desenvolvimento evolucionário das plantas superiores (Behnke, 1989).

Na maioria das plantas, a forma predominante de fotoassimilado transportado à longa distância é a sacarose, em contraste com as hexoses, que predominam no reino animal. O transporte de sacarose de órgãos-fonte para órgãos-dreno envolve inicialmente uma rede de transporte a curta distância, célula-a-célula, onde o floema é carregado com a sacarose produzida nas células fotossintéticas do mesófilo e descarregado para os tecidos não fotossintéticos nos órgãos-dreno. O transporte de sacarose célula a célula ocorre via plasmodesmas (transporte simplástico) (van Bel e Gamalei, 1992) ou via proteínas transportadoras de sacarose utilizando o apoplasto (transporte apoplástico). A sacarose presente no floema cria um alto potencial osmótico interno, que dirige o transporte a longa distância por fluxo de massa (van Bel, 1996).

Nos últimos 200 anos, a atividade humana provocou um aumento dos níveis de CO<sub>2</sub> na atmosfera, elevando sua disponibilidade de 27 Pascals (Pa) para 36 Pa (Griffin e Seemann, 1996), e a previsão é que estes valores dobrem durante o século 21 (McElroy, 1994). Este aumento drástico está ocorrendo mais rápido do que a adaptação genética natural das plantas, o que provoca uma alteração no balanço funcional das reações da fotossíntese. Sob o aumento da disponibilidade de carbono as plantas respondem inicialmente com

um aumento na razão fotossintética (Stitt, 1991). Este fato provoca o aumento da concentração intracelular de açúcares (Arp, 1991; Wullschlegler et al., 1992) causando um declínio na razão fotossintética em um período de poucos dias, (Curtis et al., 1995; Van Oosten e Besford, 1995), devido ao acúmulo de açúcares observado nas folhas (Heineke et al., 1994). As rotas enzimáticas envolvidas na fixação de carbono são bem conhecidas e as propriedades das enzimas individuais estão bem entendidas (Taiz e Zeiger, 1998). Porém, os mecanismos complexos que envolvem a regulação das diversas rotas envolvidas neste processo permanecem desconhecidos. Neste contexto, a compreensão dos diversos mecanismos envolvidos na regulação da fotossíntese, do metabolismo e do transporte de açúcares nas plantas assume uma importância fundamental.

A fixação do CO<sub>2</sub> acontece nos cloroplastos das células do parênquima palissádico do mesófilo, através das reações do ciclo de Calvin, produzindo triose-fosfato. As moléculas de triose-fosfato são direcionadas para várias rotas biossintéticas como a biossíntese de amido, de lipídios ou de aminoácidos nos cloroplastos ou para a síntese de sacarose e aminoácidos no citosol. De acordo com o requerimento da planta, a direção da biossíntese é determinada pela razão de troca de triose-fosfato do cloroplasto com fosfato inorgânico do citoplasma (Flügge et al., 1989). A disponibilidade de fosfato inorgânico depende predominantemente da síntese de sacarose, que libera fosfato inorgânico em várias etapas. O decréscimo da síntese de sacarose reduz os níveis de fosfato inorgânico, reduzindo o transporte de triose-fosfato para o citosol, causando a deposição de amido secundário no cloroplasto e, conseqüentemente, a fotossíntese é reprimida. Isto funciona como um mecanismo adaptativo do metabolismo de carbono, para requerimentos momentâneos de estoque transiente ou transporte a longa distância (Flügge et al., 1989). Deste modo, um mecanismo regulatório fundamental tem sido descoberto, em que a detecção do produto final da fotossíntese (açúcares) estimula ou reprime o aparato fotossintético através da regulação transcricional dos genes envolvidos. Deste modo, os açúcares podem agir como sinais regulatórios que afetam a expressão gênica e conseqüentemente o desenvolvimento da planta (Dijkwel et al., 1997).

As concentrações de carboidratos podem afetar a expressão de genes que codificam componentes fotossintéticos em duas rotas diferentes. A ausência de açúcares leva à ativação da expressão gênica e a um aumento na capacidade fotossintética (Van Oosten e Besford, 1994, 1995). Quando a adição exógena de açúcares excede a capacidade para metabolizar ou exportar, o aumento subsequente nas concentrações internas de açúcares causa a repressão de genes para o aparato fotossintético e conseqüentemente a da fotossíntese (Stitt, 1991; Krapp et al., 1993). Estes dois efeitos distintos são provavelmente o resultado de um único mecanismo regulatório, onde o aumento da expressão, pela redução no teor de açúcares, pode ser o resultado de uma de-repressão do controle por açúcar na transcrição (Koch, 1996).

Genes que respondem a carboidratos podem ser classificados como de resposta à disponibilidade ou à escassez. Genes para fotossíntese e mobilização de reservas normalmente são induzidos pela escassez de carboidratos (resposta à escassez), enquanto que o aumento das concentrações de açúcares estimula a expressão de genes de utilização e armazenamento (resposta à disponibilidade), independente da localização (tecidos fonte ou dreno) (Graham et al., 1994; Jang e Sheen, 1994; Thomas e Rodriguez, 1994; Koch, 1996).

Até o momento, o fenômeno de repressão catabólica, em que a expressão de um conjunto específico de genes é reprimida na presença de glicose, tem sido extensivamente estudado em bactérias (Ullmann, 1996) e leveduras (Gancedo, 1998), e muito já é conhecido sobre tais mecanismos regulatórios nestes sistemas. Tem sido mostrado que genes específicos são induzidos ou reprimidos em resposta a alterações nos níveis de carboidratos em plantas (Sheen, 1994; Graham, 1996; Koch, 1996; Krapp et al., 1993; Stitt et al., 1991; Stitt et al., 1995). As evidências sugerem que os mecanismos moleculares da expressão gênica, em função da concentração de certos metabólitos como açúcares, são muito complexos (Ho et al., 2001). Em organismos em que a regulação metabólica da expressão gênica tem sido bem caracterizada, existem evidências para várias rotas de transdução de sinais entre os níveis de açúcares solúveis e a expressão gênica (Thevelein e Hohmann, 1995). A regulação gênica mediada por açúcares tem sido descrita atuando a nível de transcrição, processamento e estabilidade do mRNA, e a

níveis pós-transcricionais (Trevelein e Hohmann, 1995; Cereghino e Scheffler, 1996; Shen e Tye, 1995; Tung et al., 1992). A análise da atividade da enzima invertase em células de milho em suspensão mostrou que ocorre repressão da expressão da enzima na ausência de sacarose e o efeito inverso foi percebido quando foram adicionadas concentrações normais de sacarose ao meio de cultura. Este efeito foi relacionado à regulação da região 3' não traduzida do mRNA, onde o aumento do tamanho da região 3' não traduzida do mRNA da invertase de parede pode interferir nos processos de estabilidade do mRNA e na tradução da proteína em células deficientes em sacarose (Cheng et al., 1999).

Em relação à alocação de reservas, a habilidade em reconhecer alterações nas concentrações de açúcares pode ter uma vantagem importante na manutenção da planta, regulando seu metabolismo em tecidos-fonte para responder às demandas dos tecidos-dreno. Existe um grande interesse na dissecação dos processos de sinalização que estão envolvidos nas rotas de reconhecimento e resposta a açúcares. Em plantas, existem evidências da existência de rotas múltiplas de reconhecimento/resposta a açúcares, sendo que algumas destas vias, compreendem componentes encontrados em vias de reconhecimento/resposta a açúcares de outros organismos. Existem três possíveis sistemas de reconhecimento de açúcares em plantas: (1) um sistema de reconhecimento via hexocinase ou outra cinase; (2) um sensor associado a um transportador de sacarose e (3) um sensor associado a um transportador de hexose (Smeekens e Rook, 1997).

Hexocinase, a enzima que catalisa a fosforilação de açúcares hexoses no primeiro passo da via glicolítica, tem sido relacionada como um sensor de glicose em diversos organismos, como leveduras (Rose et al., 1991) e mamíferos (Efrat et al., 1994). Estudos recentes sugerem que a hexocinase também age como um sensor primário em plantas, sendo identificada nos mecanismos de resposta a açúcares, causando a repressão de vários genes de plantas (Graham et al., 1994; Jang e Sheen, 1994; Jang et al., 1997, Oosterhelt e Gross, 2002). Todavia, tem sido demonstrado que a expressão de outros genes de plantas regulados por açúcares é independente de hexocinase. Estes resultados fornecem evidências para a existência de múltiplas rotas de reconhecimento/resposta a açúcares em plantas (Martin et

al., 1997; Chiou e Bush, 1998). Em fungos, a proteína SNF1 é requerida para a de-repressão de praticamente todos os genes reprimidos por glicose e é um componente integral da rota de transdução de sinais por açúcares. SNF1 é uma proteína cinase tipo Ser/Thr e a atividade cinase está presente em um complexo de massa molecular alta (Hardie et al., 1998). Recentemente, experimentos por repressão antisense demonstraram que uma proteína cinase-1 em plantas, designada SnRK1 e relacionada com SNF1, é necessária para a ativação do gene da sintase da sacarose em resposta à sacarose (Purcell et al., 1998). Este estudo indica que SnRK1 pode ter uma função em plantas análoga à SNF1 em leveduras (Halford et al., 1999). Adicionalmente, açúcares metabolizáveis e derivados de sacarose não metabolizáveis ativam distintamente rotas de transdução de sinais diferentes em células de tomate foto-autotróficas em suspensão. Sacarose e glicose não ativaram o sistema de sinalização MAPK, enquanto que isômeros de sacarose não metabolizáveis ativaram a rota MAPK, indicando que existem rotas diferentes de sinalização por açúcares em plantas (Sinha et al., 2002).

O outro sistema de reconhecimento de açúcares proposto em plantas é uma rota de sinalização ligada a um receptor ou transportador de glicose e/ou sacarose (Smeekens e Rook, 1997; Halford et al., 1999). Em analogia a leveduras (Boles e Hollenberg, 1997), em que membros da família de transportadores de açúcares funcionam como sensores, é possível que membros da família de transportadores de sacarose tenham uma função direta nas rotas de transdução de sinais de resposta a açúcares (Lalonde et al., 1999). Um membro da família SUT de tomate e *Arabidopsis*, que é caracterizado pela presença de uma alça central citosólica, tem sido relacionado como um possível sensor (Barker et al., 2000; Schulze et al., 2000). Nas plantas superiores, toda a energia utilizada e armazenada provém de processos fotossintéticos que ocorrem nos tecidos fotossinteticamente ativos (tecidos-fonte), principalmente o mesofilo, onde a energia é fixada em carboidratos.

Um grande número de proteínas transportadoras de açúcares já foi identificado até o momento em diferentes organismos, desde procariotos até eucariotos superiores. A atividade de transporte de sacarose tem sido descrita em uma grande variedade de sistemas (Riesmeier et al., 1992, 1993; Bush,

1993) e um número expressivo de cDNAs que codificam para proteínas transportadoras tem sido identificado, caracterizando uma grande família gênica, a família *SUT / SUC*. O “screening” heterólogo de bibliotecas de cDNA ou genômicas foi usado para identificar genes homólogos de outras espécies, e para identificar a presença de mais de um gene em uma única espécie.

Em nosso laboratório, foi isolado um cDNA de uma biblioteca de expressão de soja, produzida a partir de mRNAs de cotilédones imaturos (Pedra et al., 2000; Pirovani et al., 2002). Este cDNA foi totalmente sequenciado e o produto codificado deduzido a partir da seqüência de nucleotídeos é uma proteína de aproximadamente 64 KDa, denominada de S64 ou SBP2. Essa proteína apresenta 91% de identidade de seqüência com a proteína SBP, identificada inicialmente por Ripp et al. (1988), relacionada com o transporte de sacarose em plantas. Uma outra proteína de 52 KDa com um grau de homologia menor foi identificada em *Vicia faba* (Fleuw et al., 1992; Heim et al., 2001).

A proteína SBP foi identificada inicialmente, associada exclusivamente à membrana plasmática em células de cotilédone de soja, sendo capaz de se ligar a sacarose (Ripp et al., 1988). O cDNA de SBP foi isolado de uma biblioteca de expressão, preparada com mRNAs de sementes de soja, codificando para uma proteína de aproximadamente 62 KDa (Grimes et al., 1992). O gene *SBP* é expresso em altos níveis nos tecidos-dreno, inclusive nas folhas em formação e cotilédones, exibindo uma expressão temporal, coordenada com o período de absorção de sacarose no cotilédone. Adicionalmente, o uso de imunofluorescência tornou possível a localização exata da proteína nas células companheiras do floema. Uma análise comparativa da seqüência de aminoácidos mostrou que SBP não apresenta homologia considerável com nenhuma outra proteína caracterizada anteriormente, inclusive outras proteínas envolvidas no metabolismo e transporte de sacarose (Grimes et al., 1992). Contudo, as evidências mais fortes do envolvimento de SBP no transporte de sacarose foram detectadas por meio de ensaios de complementação em leveduras mutantes, onde a expressão do cDNA de SBP em , deficientes para o gene da invertase, é suficiente para promover a absorção de sacarose pela membrana plasmática (Overvoorde et al, 1997).

A alta homologia estrutural entre as proteínas S64 e SBP é um forte indício de que elas estão relacionadas funcionalmente e é possível que S64 esteja envolvida no transporte de sacarose em soja. Coerente com esta afirmação, a expressão do cDNA de S64 na orientação anti-senso em tabaco resultou em um maior acúmulo de amido, redução da taxa fotossintética nas folhas, redução do crescimento e aumento do ciclo de vida das plantas transgênicas, indicando que a inibição do gene endógeno, homólogo a S64, alterou a partição de sacarose nessas plantas (Pedra et al., 2000). A expressão do cDNA de S64 na orientação senso resultou na redução de amido das folhas, aumento da taxa fotossintética, maior taxa de crescimento e redução no ciclo de vida da planta. Além disso, Delú-Filho et al. (2000) mostraram que a proteína S64 é capaz de alterar a razão de transporte de sacarose em células de tabaco em suspensão expressando o cDNA de S64 de maneira transiente. Recentemente, foi demonstrado que S64 é uma proteína associada à membrana plasmática, que se liga a GTP e possui a habilidade de restabelecer o transporte de sacarose em leveduras mutadas para o gene da invertase (Pirovani et al., 2002). O processo de transporte de sacarose é independente do processo de ligação a GTP, sendo que o processo de ligação de GTP à proteína S64 possivelmente pode estar relacionado com processos de sinalização na célula. A identificação do gene *S64*, também designado *SBP2*, traz novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos envolvidos no transporte de sacarose em plantas superiores.

As proteínas SBP/SBP2 possuem atividade de ligação e transporte de sacarose, mas não possuem qualquer similaridade estrutural com as proteínas transportadoras de sacarose típicas da família SUT (Sucrose Transporter), podendo representar uma nova classe de proteínas transportadoras de sacarose. As proteínas SBP/S64 têm sido caracterizadas como um novo subgrupo possivelmente originado de um precursor da família das vicilinas (Heim et al., 2001), devido a algumas características estruturais similares entre estes dois grupos. A alta similaridade entre os genes *S64* e *SBP* indica que possivelmente eles são membros de um mesmo grupo gênico, provavelmente originados de uma duplicação gênica; ou simplesmente formas alélicas de um mesmo gene, distanciados por processos evolutivos, localizados num mesmo locus no genoma de soja.

Os objetivos primordiais desta investigação foram caracterizar molecularmente a família gênica *SBP* da soja e analisar a regulação do promotor *SBP2* em plantas transgênicas, cujos resultados serão apresentados na forma de dois artigos.

No primeiro artigo, o número de cópias da família *SBP* da soja foi estimado por Southern blot e FISH (“fluorescence *in situ* hybridization”). Além disto, dois clones genômicos, representando duas formas alélicas distintas, foram isolados. Aproximadamente 2,0 Kb das regiões promotoras 5’ foram seqüenciadas e fusionadas aos genes repórteres *GUS* e *GFP*, e a atividade do promotor analisada em plantas de tabaco transgênicas, quanto ao padrão tecido-específico de expressão. No artigo posterior, as plantas contendo a construção do promotor *SBP2* fusionadas ao gene *GUS* foram utilizadas em ensaios histoquímicos, mostrando um padrão de expressão temporal e modulado por açúcares. Adicionalmente, plantas transgênicas contendo construções com deleções do promotor *SBP2* fusionadas ao gene repórter *GUS* mostraram que a expressão tecido-específica dirigida pelo promotor é coordenada por diversos elementos em *cis*, positivos e negativos, agindo em associação.

### Referências Bibliográficas

- Bush, D.R. Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. **Annu Rev Plant Physiol** 44, 513-542, 1993.
- Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Pedra, J.H.F., Matrangolo, F.S.V., Macêdo, J.N.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. A sucrose binding protein homologue from soybean affects sucrose uptake in transgenic tobacco suspension-cultured cells. **Plant Physiol Bioch** 38, 353-361, 2000.
- Fleuw, S., Francechi, V. R., Patrick, J. W. Antibody against the sucrose binding protein specifically inhibits sucrose-proton symport by transfer cell protoplasts of developing *Vicia faba* L. seed. **Plant Physiol** 99, 7, 1992. Abstract.

- Frömmer, W. B., Sonnerwald, Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. **J Exp Bot** 46, 587-607, 1995.
- Grimes, H. D., Overvoorde, P. J., Hipp, K. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **Plant Cell** 4, 1561-1574, 1992.
- Heim, U., Wang, Q., Kurz, T., Borisjuk, L., Golombek, S., Nelbohn, B., Adler, K., Gahrtz, M., Sauer, N., Weber, H., Wobus, U. Expression patterns and subcelular localization of a 52 KDa sucrose-binding protein homologue of *Vicia faba* (VfSBPL) suggest diferent functions during development. **Plant Mol Biol** 47, 461-474, 2001.
- Overvoorde, P. J., Chao, W. S., Grimes, H. D. A plasma membrane sucrose-binding protein that mediates sucrose uptake shares structural and sequence similarity with seed storage proteins but remains functionally distinct. **J Biol Chem** 272, 15898-15904, 1997.
- Pedra, J.H.F., Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Contim, L.A.S., Dewey, R.E., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. **Plant Sci** 152: 87-98, 2000.
- Pirovani, C.P., Macêdo, J.N.A., Contim, L.A.S., Matrangolo, F.S.V., Loureiro, M.E., Fontes, E.P.B. A sucrose binding protein homologue from soybean exhibits GTP-binding activity that functions independently of sucrose transport activity. **Eur J Biochem** 269, 3998-4008, 2002.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., Frömmer, W. B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by funtional expression in yeast. **EMBO J** 11, 4705-4713, 1992.
- Riesmeier, J. W., Hirner, B., Frömmer, W. B. Expression of the sucrose transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. **Plant Cell** 5, 1591-1598, 1993.
- Ripp, K. G., Viitanen, P. B., Hitz, W. D. L. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiol** 88, 1435-1445, 1988.

Stitt, M. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. **Plant Cell** 8, 565-571, 1996.

## **Artigo I**

**The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization,  
gene copy number and tissue-specific expression.**

**The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number and tissue-specific expression.**

**Keywords:** *Glycine max*, sucrose transport, phloem-specific expression, FISH

**Luis Antônio S. Contim<sup>1</sup>, Nelson Delú-Filho<sup>2</sup>, Carlos P. Pirovani<sup>2</sup>, Wellington R. Clarindo<sup>3</sup>, Marcelo E. Loureiro<sup>2</sup>, Carlos R. Carvalho<sup>3</sup>, Elizabeth P. B. Fontes<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, <sup>2</sup>BIOAGRO and <sup>3</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa 36571.000, Viçosa, MG, Brazil

\*Address for correspondence: DBB/BIOAGRO- Universidade Federal de Viçosa, Av PH Rolfs s/n 36571.000 Viçosa- MG- Brazil

Phone: +553138992949, Fax: +553138992864, e-mail: [bbfontes@ufv.br](mailto:bbfontes@ufv.br)

**Abbreviations:** SBP, sucrose binding protein; *GmSBP1*, sucrose binding protein gene 1 from *Glycine max*; *GmSBP2/S64* or *GmSBP2*, sucrose binding protein gene 2 from *Glycine max*; SUT, sucrose transporter; *SoSUT1*, *Spinacia oleracea* sucrose transporter gene; *StSUT1*, *Solanum tuberosum* sucrose transporter gene; FISH, fluorescence in situ hybridization; GUS,  $\beta$ -glucuronidase; GFP, green fluorescent protein.

## Abstract

The sucrose binding protein (SBP) from soybean has been implicated as an important component of the sucrose uptake system. We have isolated and characterized two *SBP* genomic clones, *gsS641.1* and *gsS641.2*, which correspond to allelic forms of the *GmSBP2/S64* gene. As a member of the seed storage protein superfamily, we showed that the *SBP* gene structure is similar to vicilin genes with introns/exons boundaries at conserved positions. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) suggested that the soybean *SBP* gene family is represented by at least two non-allelic genes corresponding to the previously isolated *GmSBP1* and *GmSBP2/S64* cDNAs. These two cDNAs share extensive sequence similarity but are located at different loci in the soybean genome. To investigate transcriptional activation of the *GmSBP2* gene, 2-kb 5'flanking sequences of *gsS641.1* and *gsS641.2* were fused to  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) reporter gene and to green fluorescent protein (*GFP*) reporter gene and independently introduced into *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The *SBP2* promoter directed expression of both *GUS* and *GFP* reporter genes with high specificity to the phloem of leaves, stems and roots. Thus, the overall pattern of *SBP-GUS* or *SBP-GFP* expression was consistent with the involvement of SBP in sucrose translocation-dependent physiological processes.

## 1. Introduction

A central characteristic of plants is the capacity to convert light energy through photosynthesis into carbohydrate. These molecules can be stored, directly consumed as energy source or utilized as structural components of the cells. Because of that the plants are considered basic producers of energy flux of the planet trophic chain. Although carbon autotrophy is a typical feature of plant cells, whole plants behave as physiological mosaics in which photosynthetically active tissues, such as mesophyll cells from mature leaves (source tissues), export carbohydrate to photosynthetically less active or inactive tissues, such as stems, flowers and roots (sink tissues) (Frömmer and Sonnerwald, 1995; Stitt, 1996). The processes that regulate carbon allocation to the various sink organs directly impact plant development. Sucrose is the main carbohydrate that is transported cell-to-cell and used for long-distance transport in the vascular system of a large number of higher plants. Sucrose not only functions as a transport metabolite but also contributes to the osmotic driving force for phloem translocation (mass flow) and serves as a signal to activate or repress specific genes in a variety of different tissues (Lalonde *et al.*, 1999). The cell-to-cell sucrose transport occurs either directly via plasmodesmata (symplastic transport) or across plasma membranes mediated by protein carriers (apoplastic transport) (Lemoine, 2000; Williams *et al.*, 2000). Both symplastic and apoplastic transports can contribute for phloem loading and unloading processes, although in some plants one route of sucrose loading may predominate over the other (Frömmer and Sonnerwald, 1995). In fact, in several species, sucrose transporters have been identified as essential for phloem loading into sieve elements, the phloem-specific photoassimilate-transporting cells (Riesmeier *et al.*, 1994; Bürkle *et al.*, 1998).

Complementation assays using an invertase deficient yeast mutant have been used to identify and isolate the sucrose transporter *SoSUT1* cDNA from spinach leaves (Riesmeier *et al.*, 1992) and *StSUT1* from potato leaves (Riesmeier *et al.*, 1993). The subsequent identification of sucrose transporters in other species has been accomplished by hybridization screening using heterologous probes or PCR-amplification from these initial sequences (Lemoine, 2000). The members of the *SUT* family encode highly hydrophobic disaccharide transporters with two sets of six membrane-spanning domain structures, separated by a large cytoplasmic loop (Williams *et al.*, 2000). Many of these transporters have been shown to mediate sucrose transport through a proton-coupled

transport mechanism. The SUT1 protein has been described as the proton-motive-force-driven sucrose symporter that mediates phloem loading and long-distance transport, the key transport step in assimilate partitioning for many plants (Riesmeier et al., 1994; Bürkle et al., 1998). SUT1 serves as a high-affinity transporter, whereas SUT4, a second member of this sucrose transporter family, corresponds to the low-affinity/high capacity saturable component of sucrose uptake found in leaves (Weise et al., 2000). A third structurally related-member of the family has been identified and designated SUT2 (Barker et al., 2000). Although the whole family of sucrose transporter genes of a given species has not been identified, the sucrose transporters make a large gene family, as at least seven distinct sequences that encode putative sucrose transporters are present in the *Arabidopsis* data base (Williams et al., 2000).

A sucrose binding protein (SBP), structurally unrelated to the members of the SUT family, was first identified in soybean cotyledons and has been demonstrated to be involved in sucrose translocation-dependent physiological processes in plants. *SBP* repression studies in tobacco have indeed shown some of the typical phenotypes caused by impairment of sucrose translocation (Riesmeier et al., 1994; Kühn et al., 1996), such as accumulation of carbohydrates within source leaves, inhibition of photosynthesis and stunted growth (Pedra et al., 2000). Furthermore, manipulation of SBP levels in transgenic cell lines correlated with the efficiency of radiolabeled sucrose uptake by the cells and altered sucrose-cleaving activities in a metabolic compensatory manner (Delú-Filho et al., 2000). Direct evidence implicating SBP in sucrose transport has been obtained with complementation studies using a secreted-invertase deficient mutant yeast strain, incapable of growth on medium containing sucrose as the only carbon source (Overvoorde et al., 1996, 1997; Pirovani et al., 2002). The SBP-mediated specific sucrose uptake in yeast displays linear, non-saturable kinetics up to 30 mM external sucrose, being relatively insensitive to pH gradient across the membrane (Grimes and Overvoorde, 1996; Overvoorde et al., 1996). These biochemical features closely resemble the kinetics properties of the previously characterized linear component of sucrose uptake in higher plants (Maynard and Lucas, 1982; Lin et al., 1984). Nevertheless, these relevant data do not allow us to reconcile the apparent inconsistency between the absence of typical membrane transporter structural motifs on SBP and a SBP-mediated sucrose transport mechanism and, as consequence, a scenario for SBP function remains elusive.

Homologous *SBP* genes have been isolated from pea (GeneBank<sup>TM</sup> accession number Y11207) and *Vicia faba* (GeneBank<sup>TM</sup> accession number VFA292221). In spinach, a *SBP* homologue was immunolocalized in the plasma membrane of sieve elements in fully expanded leaves, shoots and roots (Warmbrodt et al., 1989; 1991) and, in tobacco, it was detected in the microsomal fraction of young leaves from *Nicotiana tabacum* (Pedra et al., 2000). In soybean, two *SBP* genes have been identified (Grimes et al., 1992; Pirovani et al., 2002), but an extensive analysis has not been performed to provide a global view of the *SBP* gene content. In this investigation, we report the isolation of *SBP2* genomic clones and we perform *in situ* hybridization on isolated nuclei to characterize the soybean *SBP* gene family. We also present data on the tissue-specific expression of the *SBP2* gene.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Screening of soybean genomic libraries and DNA sequence analysis

A size-selected genomic library propagated in  $\lambda$ ZAPII ( $9.75 \times 10^9$  pfu) was screened by plaque hybridization, as described by Sambrook et al. (1989), using the complete *SBP2/S64* cDNA (Pirovani et al., 2002) as probe. The hybridization probe was radiolabeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP by random primed labeling (Amersham Pharmacia Biotech). Two positive clones, *gsS641.1* and *gsS641.2*, were plaque purified, excised and sequenced. Sequencing was carried out with a combination of insert subcloning and primer walking. The identity of these clones was obtained by sequence comparison analysis using the BLAST program (Altschul et al., 1990). The computer program CLUSTAL-W was used for sequence alignment.

### 2.2 Genomic DNA gel blot analysis

DNA was extracted from young leaves, digested overnight with *Bam*HI or *Eco*RI, precipitated with ethanol 70% (v/v) and separated on a 1% (w/v) agarose gel. The gel was washed with 250 mM HCl followed by alkaline denaturation (Sambrook et al., 1989). After neutralization, the DNA was transferred to nylon membranes and UV fixed (Stratalinker, Stratagene). The *SBP2* cDNA (GeneBank<sup>TM</sup> accession number AF191299) was labeled using the Primer-It Fluor Fluorescence Labeling Kit

(Stratagene) according to the instructions of the supplier. Hybridization and washing of the blots were performed using standard procedures (Sambrook et al., 1989). The hybridization signals were revealed by the Iluminator<sup>TM</sup> Nonradioactive Detection System (Stratagene) according to the instructions of the supplier.

### 2.3 Probe preparation for *in situ* hybridization

Two DNA fragments were used as probe for *in situ* hybridization. The first one corresponds to the 4-kp *EcoRI* insert from pgsS641.2. The second one corresponds to a 1.5-kb DNA fragment extending from position 313 to 1695 of the *GmSBP1* cDNA (GeneBank<sup>TM</sup> accession number L06038). This DNA fragment correspond to the insert of the soy25Z12 cDNA clone, previously isolated in our laboratory through the screening of a soybean seed cDNA library using the *SBP2/S64* cDNA (GeneBank<sup>TM</sup> accession number AF191299) as probe. Both DNA fragments, used as FISH probes, were released from the vector by *EcoRI* digestion, gel-purified and labeled using the Primer-It Fluor Fluorescence Labeling Kit (Stratagene) according to the recommendations of the supplier.

### 2.4 Cytological preparations and *in situ* hybridization

Soybean seeds were germinated in Petri dishes containing a film of distilled water, and incubated at 29 °C in the dark. Seedlings (0.5 to 1 cm long roots) were fixed in a fresh ice-cold methanol:acetic acid solution (3:1) and kept at -20 °C for 24 h. Then, the roots were excised at 0.1 cm and macerated with a freshly prepared Flaxzyme (NOVO) enzymatic solution (1/10), and incubated at 35 °C for 90 min. The macerated cells were dissociated in a clean slide with a freshly fixative solution, air-dried and stained with a 2 % Giemsa solution in phosphate buffer, pH 6.8, for 5 min (Carvalho and Saraiva, 1997).

The slides containing soybean interphase nuclei were treated with 100 µg/ml RNase-A in 2x SSC (150 mM NaCl, 15 mM Na<sub>3</sub> citrate, pH 7.0) at 37 °C for 1 h, washed with the same buffer, then with PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0), dehydrated sequentially in 70%, 80% and 100% ethanol (2 min each) at room temperature and finally air-dried. The probe (2 ng/µl ) and salmon sperm

DNA (200 ng/μl) were denatured in the hybridization solution [50 % (v/v) deionized formamide, 10% (w/v) dextran sulphate, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 and 2x SSC] for 75 °C for 15 min and, then, further co-denatured with the nuclei for 4 min at 75 °C. The denatured nuclei were hybridized for 12 h at 37 °C in HYBAID OmiSlide thermal cycler. After hybridization, the slides were washed twice in 2x SSC containing 50 % (v/v) formamide for 2 min each at 45 °C ; four times for 2 min in 2x SSC at room temperature and then rinsed in PBS for 2 min. The slides were air-dried and mounted in 15 μl of detection buffer (12,5 mg/ml triethylenediamine in glycerol, 1/2x PBS and 200 ng/ml propidium iodide).

### *2.5 Microscopy and analysis of the hybridization signal*

The images of isolated nuclei were captured with a CCD video camera and digitalized by an image analysis system attached to the Olympus BX 60 reflected-light fluorescence microscope with objective 100x and WU excitation (cube U-MWU) fluorescence filter, BA 420 barrier filter and DM400 dichroic mirror. Image analyses were conducted using the public domain Image SXM 1.68 software (Rasband, 1997). The original color TIFF images were converted to a gray scale up to a 255 gray value for the relative density plot analysis. Using the color table tool of the software, the final plot images were digitally pseudo-colored with the filter color spectrum.

### *2.6 Construction of SBP2 promoter-reporter gene constructs*

A *SBP2* promoter-*GUS* fusion gene was constructed by cloning a 2.0-kb *EcoRI/NcoI* fragment from *pgsS641.1* into the *EcoRI/NcoI* sites of pCAMBIA 1381Z (Roberts et al., 1996) to give pUFV335, also referred to as -2000p*SPB2-GUS*. The corresponding fragment from *pgsS641.2* was also transferred to the same sites of pCAMBIA 1381Z, yielding pUFV334.

To construct a *SBP2* promoter-*GFP* fusion gene, a Klenow-repaired *KpnI/SpeI* *GFP* cDNA fragment was transferred to the Klenow-repaired *NcoI* site of pUFV335. The resulting clone, pUFV419 (-2000p*SBP2-GFP*), contains a *GFP* cDNA under the control of 2.0 kb 5' flanking sequence of *gsS641.1*.

### *2.7 Generation of transgenic plants*

The pCAMBIA-derived recombinant plasmids or pCAMBIA 1381Z binary vector alone were used to transform *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation (Alvim et al., 2001) and the transformed plants were regenerated on medium containing hygromycin (50 mg/l) (Buzeli et al., 2002). For the -2000p*SBP2-GUS* constructs, plantlets were assayed for GUS activity and primary transformants were either maintained *in vitro* or transferred into soil and grown in standardized greenhouse conditions (T0 plants) to generate seeds. Most of the rooted plants were tested for the incorporation of the hygromycin gene and *SBP2* promoter-reporter gene fusions by PCR analysis. The intensity of GUS staining among the selected lines was similar and the expression pattern was consistent between independent transgenic lines. Detailed sectional analyses for tissue-specific expression were carried out on eleven independent *SBP2-GUS* transgenic lines and five independent *SBP2-GFP* transgenic lines. One hygromycin-resistant plant for the pCAMBIA 1381Z incorporated binary vector was used as control.

## 2.8 Analysis of expression patterns

For the transgenic lines carrying *SBP2-GUS* fusion, histochemical analysis of  $\beta$ -glucuronidase activity was performed as previously described (McCabe et al., 1988). The tissues (roots, stems and leaves) were sampled and sectioned using a hand microtome. Tissue sections were embedded in the GUS assay buffer [100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pH 7.0), 0.5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% (v/v) Triton X-100] containing 5 bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D glucuronide (X-Gluc) (McCabe et al., 1988) and incubated at 37 °C in the dark for 4 hours. Pigments were extracted from stained tissues with methanol:acetone (3:1). After extensive washing, the clarified tissues were stored in 50% (v/v) glycerol until photodocumentation. The micrographies were taken under an Olympus AX-70 microscope.

Transformed plants containing *SBP2-GFP* construct were harvested and mounted. An Olympus BX 60 fluorescence microscope with objectives 10x, 20x, 40x and B excitation (WB cube U-MWU) fluorescence filters was used to view plants. Images were captured with a CCD video camera and analyzed using the public domain Image SXM 1.68 software (Rasband, 1997). The original color TIFF images were

converted to a gray scale ranging from zero to 255 gray value. The images were digitally pseudocolored using the color filter number 5 (cyan, yellow and green).

### 3. Results

#### 3.1 The genomic clones, *gsS641.1* and *gsS641.2*, are allelic forms of the *SBP2* gene

We have isolated two genomic clones, *gsS641.1* and *gsS641.2*, carrying a *SBP* gene from a soybean genomic library constructed in  $\lambda$ ZAPII. The insert of *gsS641.1* is 6.4-kb long, possesses 1963-bp of 5' flanking sequences and covers the complete sequence of a gene, which is interrupted by five introns (Figure 1A). The introns have a length of 318, 598, 110, 575, and 529 bp. All the intron/exon junctions deduced by comparison with *SBP* cDNA sequence possess the consensus GT/AG dinucleotide and keep conserved positions as compared to those of *VfSBPL* and other genes belonging to the vicilin superfamily (Braun et al., 1996; Heim et al., 2001). Although the coding region has not been completely sequenced, partial sequence analysis implicated the *gsS641.1* as the *SBP2/S64* isoform gene (Pedra et al., 2000; Pirovani et al., 2002). The six exons give a continuous open reading frame of 1469-bp, which is almost identical to the *SBP2* cDNA sequence, differing by just one nucleotide at position 94 of the *SBP2* cDNA, in which a C was replaced by a G in the *gsS641.1* sequence. This nucleotide difference led to a glutamine to glutamate replacement in *gsS641.1* deduced protein.

With respect to *gsS641.2*, its insert is 4-kb long, possesses 1963 bp of 5' sequence and covers 1/2 of the coding region sequence (2037 bp), which is interrupted by three introns (Figure 1B). The four exons give a continuous open reading frame encoding a partial SBP protein of 330 amino acid residues that shares 99% identity with the corresponding *SBP2* protein sequence.

Comparison of *gsS641.1* and *gsS641.2* nucleotide sequences revealed that they retain identical sequences, except for the presence of an *EcoRI* site in the fourth exon of *gsS641.2*, that is absent in *gsS641.1* sequence. The high identity of sequence extends to include the 5' upstream regulatory sequences and the 5' untranslated sequence. In fact, the genomic clones share identical promoter sequences. Very likely *gsS641.1* and *gsS641.2* correspond to allelic forms of the *SBP2* gene.

The nucleotide sequence of a 1.0-kb 5' flanking sequence from *gsS641.1* is presented in Figure 1C. Sequence analysis of these promoter regions revealed a number

of conserved motifs of most eukaryotic promoters, in addition to several potential regulatory elements. Typical TATA box and CAAT box were identified on *gsS641.1* at position -73 and -105 upstream of the ATG translation start codon, respectively. The potential regulatory elements found in the soybean *S64* promoters fall into five categories: (1) temporal expression controlling elements, such as the Aba a-like sequence CATTCTY (coordinates -106 to -101; Andrianopoulos and Timberlake, 1996); (2) tissue-specific controlling elements, such as GATA-1 (-238 to -233 and -278 to -273; Raich et al., 1995), several Pit1-like elements, TAAAT (Smith et al., 1995), directly and inversely repeated F2F elements, TAAAAT (Jackson et al., 1992), and the PEA3 sequence AGGAAA (-31 to -26 and -324 to -319; Reifel-Miller et al., 1996); (3) light-responsive elements like the NIT-2 sequence TATCTA (-236 to -232; Feng et al., 1993); (4) sugar-responsive elements, such as multiple CCAAT-inverted sequence (Edwards et al., 1998), a GAL4-like sequence ATATAA (Vashee and Kodadek, 1995), a GCN4-like sequence TGATTC (Onodera et al., 2001), a TUBF sequence CCATCAGCG in reverse orientation (Koritschoner et al., 2001) and (5) stress-responsive elements, such as a CSBP1 sequence ATGTCAGA (McLaughlin et al., 1996) and two repeated CREB sequences, TGACG (Katagiri et al., 1989). The conserved stress- and sugar-responsive elements are found in a number of sugar-induced genes, involved in sugar metabolism or transport.

### 3.2 The *SBP* gene family is represented by few copies in the soybean genome

Two distinct *SBP* cDNAs which share 85% nucleotide sequence identity have been isolated from a seed cDNA library (Grimes et al., 1992; Pirovani et al., 2002), but precise information about the copy number of *SBP* genes in the soybean genome is not available. We performed reconstruction genomic DNA blot analysis in order to estimate the *SBP* gene copy number (Figure 2). DNA digested with endonucleases that recognize one site in the genomic clone, resulted in banding patterns in which more than two bands were detected. The endonuclease *EcoRI* yielded one major band and three bands of lower intensity (lanes E). Using the enzyme *BamHI*, which does not cut within the two isolated cDNAs and the genomic clones, we detected a major band of high intensity and a low intensity, higher band poorly resolved on a 1% agarose gel (lane B). The number of *SBP* genes was further estimated to be 2-3 copies by comparing the signal

intensity of the hybridizing bands (lanes E and B) with that of copy number reconstituting cDNA (lanes 1, 5 and 10).

### 3.3 The *S64/SBP2* and *SBP* genes are located in distinct regions on the soybean genome

To further estimate the *SBP* gene copy number in the soybean genome, we have performed fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei using a fragment of the *SBP* cDNA as probe (Figure 3). At moderate stringency, we detected four hybridizing spots on the genome, suggesting the presence of two distinct loci or two highly homologous genes. The intensity of the hybridizing signals was very similar and may reflect the high degree of sequence conservation of the *SBP* genes. In fact, the probe used covers the most conserved region between *SBP* and *S64/SBP2* cDNAs. These results were consistently repeated in different nucleus preparations (Figure 3).

We have also used a *gsS641.2* genomic probe in FISH assays for specific labeling of the *S64/SBP2* locus (Figure 4). The genomic probe cross-hybridized to different extent with two pair of genes. The intensity of the hybridizing signals was estimated by a semi-quantitative method based on the quantification of the pixel values (8 bits) of each labeling signal of the digitalized image. The original color of the images was converted to a gray scale up to a 255 value for the analysis of relative density of labeling signals (4B and 4E). The density of each signal was three-dimensionally plotted using an image analysis software, as described in methods (4C and 4F). The values of each labeling signal were obtained as a function of the highest peak value. The calculated values grouped the signals in two pairs of similar intensity (Table 1). Based on the high homology of the probe to *SBP2*, the higher intensity hybridizing signals may correspond to the *SBP2/S64* alleles, whereas the *SBP1* alleles may be represented by the lower intensity spots. Thus, the *gsS641.2* (*pgSBP2*) genomic fragment probe seems to be able to discriminate quantitatively between *GmSBP1* and *GmSBP2* genes. Collectively, these results may indicate that soybean *SBP* is encoded by a small gene family, represented by at least two highly conserved copies in the soybean genome.

### 3.4 Tissue-specific expression of the *SBP2* promoter

Transgenic plants expressing the *SBP2-GUS* fusion genes were examined for tissue specific GUS activity. Because the expression patterns of *gsS641.1-GUS* (-

*2000pSBP2-GUS*) and *gsS641.2-GUS* (pUFV334) fusion genes were indistinguishable, only the results of the expression of the first construct (*-2000pSBP2-GUS*) are presented. Histochemical examination of different independently transformed *SBP2-GUS* lines indicated that in all their organs analyzed (leaf, stem and root) the expression of the *SBP2-GUS* fusion was restricted to the vascular tissue (Figure 5). In the shoot apex, reporter gene activity was also mostly expressed in vascular tissues (Figure 5B) and transverse sections through the leaf revealed an intense GUS staining associated exclusively with the vascular bundle (Figure 5E). Detailed analysis of leaf sections revealed that the *SBP2-GUS* expression was restricted to the phloem (Figure 5F) with clearly staining of the sieve elements (Figure 5G). Likewise, in cross-sections of petiole and stems, high levels of expression were mostly associated with the phloem, especially the inner phloem tissues (Figures 5L and 5N). An intense GUS staining was also observed in the vascular cylinder in roots (Figures 5R). Microscopic analysis of root sections revealed that this expression was restricted to the phloem of the vascular tissue (Figure 5S). In control assays, GUS activity was not detected in shoots and roots from transgenic plants harboring the promoterless *GUS* gene (Figures 5A, 5D, 5K, 5M, 5Q).

The tissue-specific expression from the *SBP2* promoter was also analyzed in transgenic plants containing the green fluorescent protein (*GFP*) cDNA fused to *SBP2* upstream sequences. Analyses of the vascular tissues from transverse sections of untransformed, control leaf (Figure 5I), stem (Figure 5O) and roots (data not shown) demonstrated that the xylem tissue from tobacco contains very high level of background yellow fluorescence, whereas the phloem tissue does not autofluoresce. In contrast, microscopic analysis of the vascular tissue from apical meristem (Figure 5C), leaf (5H and 5J), stem (5P) and root (5T) of *SBP2-GFP* transgenic lines clearly demonstrated a high level of *GFP* expression in the phloem tissue. Thus, the pattern of *SBP2-GFP* expression was similar to *SBP2-GUS* expression pattern, further confirming that the *SBP2* promoter exhibits a phloem-specific expression. In addition, these results provided evidence that the intense activity of the *GUS* reporter gene associated with vascular tissue was indeed a result of *SBP2* promoter activity and not due to the enzymatic product diffusion to the phloem or availability of the substrate.

#### **4. Discussion**

We have described the structure of the soybean *SBP* gene. The *SBP* gene is approximately 6.4-kb long and contains six exons with five introns. The exon-intron boundaries follow the 5'donor and 3'acceptor consensus sequence (GT...AG) and conserve identical positions as those of genes belonging to the proposed vicilin-like protein superfamily (Braun et al., 1996, Heim et al., 2001). This observation underscores the evolutionary relatedness between SBP and seed storage proteins, which has been previously considered based on conservation of primary and possibly tertiary structure (Overvoorde et al, 1997). The 5'flanking region upstream of the initiation codon is 2000 bp and the 3'-flanking non-coding region is about 800-bp. The 5'-flanking region of the soybean *SBP2* gene contains typical eucaryotic promoter elements, such as CCAAT box (position-105 upstream of the ATG translational start codon) and TATA box (position -73). Furthermore, several eukaryotic promoter regulatory elements have been identified in the *SBP2* promoter sequences. These include temporal and tissue-specific expression controlling elements, light-responsive elements, sugar-responsive elements and stress-induced elements.

In addition to *SBP* and *SBP2* cDNA from soybean, two other members of the *SBP* family have been described, a pea *SBP* (Castillo et al., 2000) and the faba bean *VfSBPL* cDNA (Heim et al., 2001). In contrast to *Vicia faba* SBP that is represented by a single copy in the faba bean genome, as judged by DNA gel blot analysis, the soybean SBP is encoded by a small gene family. Our data based on nuclei *in situ* hybridization using cDNA and genomic probes confirmed that the soybean *SBP* family is represented by at least two non-allelic genes. These distinct hybridizing loci may correspond to the previously isolated *GmSBP1* (Grimes et al., 1992) and *GmSBP2/S64* cDNAs (Pirovani et al., 2002), as judged by the intensity of the hybridizing signal using a *GmSBP1* cDNA probe or a *gsS641.2* (*pgSBP2*) genomic fragment probe harboring promoter and intron sequences in addition to exon 1, exon 2, exon 3 and exon 4 sequences. The exon sequences on *gsS641.2* probe give a continuous SBP sequence that is highly related to *GmSBP1* (90% sequence identity) and *GmSBP2* (99% sequence identity) cDNAs. While the *GmSBP1* cDNA probe cross-hybridized with both loci with the same efficiency (Figure 3), the genomic probe was more specific to its cognate *GmSBP2* alleles (Table 1). The intensity differences of the cross-hybridizing spots may reflect significant divergence between the *SBP1* and *SBP2* genomic sequences, which most likely lies in their 5'flanking and intron sequences, contrasting with the high homology found in their coding region (85% sequence identity by comparing the full-length *GmSBP1* and

*GmSBP2* isolated cDNAs). In fact, among genes of the same family, the conservation of sequence is expected to be lower when 5' upstream and intron sequences are used as the basis for comparison. Thus, the capacity of the genomic probe to discriminate quantitatively between *GmSBP1* and *GmSBP2* genes makes it well suited for simultaneously FISH mapping these genes on soybean chromosome.

Despite the structural relationship between *VfSBPL* and *GmSBP/SBP2* (65% and 63% identity between the former and the soybean DNA sequences, respectively), functional studies in yeast and transgenic plants have indicated that these proteins may not be functionally analogs. The soybean SBP has been shown to facilitate sucrose uptake when ectopically expressed in a yeast mutant strain (Grimes and Overvoorde, 1996; Pirovani et al., 2002) and to alter plant growth and carbohydrate partitioning in leaves of tobacco plants expressing the *SBP2* cDNA in sense or antisense orientation (Pedra et al., 2000). In contrast, expression of *VfSBPL* in yeast cells failed to show sucrose transport properties and its overexpression in potato plants did not cause any detectable alteration in the carbohydrate status of the transgenic tubers (Heim et al., 2001). Consistent with the lack of function similarity, *GmSBP* from soybean and *VfSBPL* from faba bean display distinct expression patterns. While the expression of the *VfSBPL* has been demonstrated to be confined to seeds, *GmSBP1* transcripts have also been detected in young sink leaves (Grimes et al., 1992). Furthermore, the *VfSBPL* promoter failed to drive expression of a reporter gene in any tissues other than cotyledons (Heim et al., 2001). In contrast, we showed that the *GmSBP2* promoter directed expression of *GUS* and *GFP* reporter genes to the vascular tissues of roots, stems and leaves, corroborating with the involvement of SBP in the long-distance sucrose translocation pathway. These results further support the notion that *GmSBP* from soybean and its homolog *VfSBPL* from faba bean may perform distinct functions.

Analysis of the *SBP* promoter activity in tobacco provides indirect evidence that *SBP* is expressed in sieve-element companion cell complex of phloem and supports the hypothesis that the protein operates in the sucrose translocation pathway. In fact, the transport of sucrose between source and sink tissues occurs in the vascular tissue and is mediated by the sieve-elements and the closely associated companion cells of the phloem tissue (Truernit, 2001). Nevertheless, our results based on expression of *SBP*-reporter gene transcriptional fusions in transgenic plants did not allow us to rule out the possibility that the accumulation of *SBP2* protein in soybean tissues might be different from the reporter gene activity pattern due to the lack of transcriptional regulatory

elements and post-transcriptional control. However, the spatial regulation of the *SBP-GUS* and *SBP-GFP* reporter genes accurately reproduced the accumulation of SBP that has been observed in the phloem cells of soybean leaves (Grimes et al., 1992). Likewise, in spinach, a SBP homologue was immunolocalized in the plasma membrane of sieve elements in fully expanded leaves, shoots and roots (Warmbrodt et al., 1989; 1991). These observations support the argument that the *SBP2* derived sequence may control tissue-specific regulation of *SBP2* expression.

In summary, the data presented here confirm that the *SBP* gene family from soybean is represented by at least two non-allelic genes corresponding to the previously isolated *GmSBP1* and *GmSBP2/S64* cDNAs. As a member of the vicilin-like seed storage protein superfamily, the *GmSBP2* gene structure is similar to that of other members of the family and retains the conserved positions of the introns. Our investigation on the spatial regulation of *SBP2* expression during plant development demonstrated that the *SBP2* promoter drives expression of linked reporter genes to the phloem tissue of tobacco transgenic lines, which is in marked contrast with the *VfSBP* promoter expression. Our results of *SBP2* promoter analysis are consistent with the involvement of SBP in long distance sucrose transport pathway and further support the notion that *GmSBP* and its homolog from *Vicia faba* performs distinct functions.

### **Acknowledge**

This research was supported by the Brazilian Government Agency, PADCT/CNPq Grant 62.0272/97.0 (to E.P.B.F.) and FAPEMIG Grant CBB 333/01 (to E.P.B.F.). LASC, NDF and CPP were supported by CNPq graduate fellowships from the Brazilian Government

### **References**

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.
- Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B., 2001. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.* 126, 1042-1054.

- Andrianopoulos, A., Timberlake, W.E., 1994. The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Molecular Cell Biology* 14, 2513-2515.
- Barker, L., Kühn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J.M., Frommer, W.B., 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12, 1153-1164.
- Braun, H., Czihal, A., Shutov, A.D., Bäumlein, H., 1996. A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose binding proteins. *Plant Mol. Biol.* 31, 35-44.
- Bürkle, L., Hibberd, J.M., Quick, W.P., Kühn, C., Hirner, B., Frommer, W.B., 1998. The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol.* 118, 59-68.
- Buzeli R.A.A., Cascardo J.C.M., Rodrigues L.A.Z., Andrade M.O., Loureiro M.E., Otoni W.C., Fontes E.P.B., 2002. Tissue-specific regulation of *Bip/Grp78* genes: a cis-acting regulatory domain is required for *BiP* promoter activity in plant meristems. *Plant Mol. Biol.* 50, 757-771.
- Carvalho, C. R, Saraiva, L. S, 1997. High-resolution HKG-banding in Maize Mitotic Chromosomes. *J. Plant Res.* 110, 417-420.
- Castillo, J., Rodrigo, M.I., Márques, J.A., Zúñigat, Á., Franco, L., 2000. A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily. *Eur. J. Biochem.* 267, 2156-2165.
- Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Pedra, J.H.F., Matrangolo, F.S.V., Macêdo, J.N.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B., 2000. A sucrose binding protein homologue from soybean affects sucrose uptake in transgenic tobacco suspension-cultured cells. *Plant Physiol. Bioch.* 38, 353-361.
- Edwards, D., Murray, J.A.H., Smith, A.G., 1998. Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117, 1015-1022.
- Feng, B., Xiao, X., Marzluf, G.A., 1993. Recognition of specific nucleotide bases and cooperative DNA binding by the trans-acting nitrogen regulatory protein NIT2 of *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* 21, 3989-3996.
- Frömmer, W. B., Sonnerwald., 1995. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *J. Exp. Bot.* 46, 587-607.

- Grimes, H. D., Overvoorde, P. J., Hipp, K., 1992. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. *Plant Cell* 4, 1561-1574.
- Grimes, H.D., Overvoorde, P.J., 1996. Functional characterization of sucrose binding protein-mediated sucrose uptake in yeast. *J. Exp. Bot.* 47, 1217-1222.
- Heim, U., Wang, Q., Kurz, T., Borisjuk, L., Golombek, S., Nelbohn, B., Adler, K., Gahrtz, M., Sauer, N., Weber, H., Wobus, U., 2001. Expression patterns and subcellular localization of a 52 kDa sucrose-binding protein homologue of *Vicia faba* (VfSBPL) suggest different functions during development. *Plant Mol. Biol.* 47, 461-474.
- Jackson, S.M., Keech, C.A., Williamson, D.J., Gutierrez-Hartmann, A., 1992. Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells. *Mol Cell Biol.* 12, 2708-2719.
- Katagiri, F., Lam, E., Chua, N.H., 1989. Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature* 340, 727-730.
- Koritschoner, N.P., Alvarez-Dolado, M., Kurz, S.M., Heikenwalder, M.F., Hacker, C., Vogel, F., Munoz, A., Zenke, M., 2001. Thyroid hormone regulates the obesity gene *tub*. *EMBO Rep.* 2, 499-504.
- Kuhn, C., Quick, W.P., Schulz, A., Sonnewald, U., Frommer, W.B., 1996. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environ.* 19, 1115-1123.
- Lalonde, S.L., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B., Ward, J.M., 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11, 707-726.
- Lemoine, R., 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1, 246-262.
- Lin, W., Schmitt, M.R., Hitz, W.D., Giaquinta, R.T., 1984. Sugar transport into protoplast isolated from developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 75, 936-940.
- Maynard, J.W., Lucas, W.J., 1982. A re-analysis of the two-component phloem loading system in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 69, 734-739.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., Christou, P., 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. *Biotech* 6, 923-926.

- McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Horni, S.V., Lee, J.C., Livi, G.P., Peter, R., 1996. Young Identification of Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase-activated Protein Kinase-3, a Novel Substrate of CSBP p38 MAP Kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 8488–8492.
- Onodera, Y., Suzuki, A., Wu, C., Washidai, H., Takaiwa, F., 2001. A Rice Functional Transcriptional Activator, RISBZ1, Responsible for Endosperm-specific Expression of Storage Protein Genes through GCN4 Motif. *J. Biol. Chem.* 276, 14139–14152.
- Overvoorde, P.J., Frommer, W.B., Spencer, D., 1996. A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. *Plant Cell* 8, 271-280.
- Overvoorde, P.J., Chao, W.S., Grimes, H.D., 1997. A plasma membrane sucrose-binding protein that mediates sucrose uptake shares structural and sequence similarity with seed storage proteins but remains functionally distinct. *J. Biol. Chem.* 272, 15898-15904.
- Pedra, J.H.F., Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Contim, L.A.S., Dewey, R.E., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B., 2000. Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. *Plant Sci.* 152, 87-98.
- Pirovani, C.P., Macêdo, J.N.A., Contim, L.A.S., Fabiana S. V. Matrangolo, F.S.V., Loureiro, M.E., Fontes, E.P.B., 2002. A sucrose binding protein homologue from soybean exhibits GTP-binding activity that functions independently of sucrose transport activity. *Eur. J. Biochem.* 269, 3998-4008.
- Raich, N., Clegg, C.H., Grofti, J., Romeo, P.H., Stamatoyannopoulos, G., 1995. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. *EMBO J.* 14, 801-809.
- Rasband, W., 1997. Image SXM 1.61. A public domain software for image analysis, written at the US National Institute of Health, extensions by Steve Barret and available from the Internet by anonymous ftp from [zippy.nimh.nih.gov](ftp://zippy.nimh.nih.gov).
- Reifel-Miller, A.E., Conarty, D.M., Valasek, K.M., Iversen, P.W., Burns, D.J., Birch, K.A., 1996. Protein Kinase C Isozymes Differentially Regulate Promoters Containing PEA-3/12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate Response Element Motifs. *J. Biol. Chem.* 271, 21666–21671.

- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., Frömmer, W. B., 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11, 4705-4713.
- Riesmeier, J. W., Hirner, B., Frömmer, W. B., 1993. Expression of the sucrose transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. *Plant Cell* 5, 1591-1598.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., Frommer, W.B., 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J.* 13, 1-7.
- Roberts, C.S., Rajagopal, S., Smith, L.A., Nguyen, T.A., Yang, W., Nugroho, S., Ravi, K.S., Cao, M., Vijayachandra, K., Patell, V., Harcourt, R.L., Dransfield, L., Desamero, N., Slamet, I., Keese, P., Kilian, A. and Jefferson, R.A., 1996. A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. Canberra, Australia: Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture (CAMBIA), 146 p.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, E. F. T., 1989. *Molecular cloning – a laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 3v.
- Smith, K.P., Liu, B., Scott, C., Sharp, Z.D., 1995. Pit-1 exhibits a unique promoter spacing requirement for activation and synergism. *J. Biol. Chem.* 270, 4484-4491.
- Stitt, M., 1996. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell* 8, 565-571.
- Tuernit, E., 2001. Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Curr. Biol.* 11, 169-194.
- Vashee, S., Kodadek, T., 1995. The activation domain of GAL4 protein mediates cooperative promoter binding with general transcription factors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10683-10687.
- Warmbrodt, R.D., Buckhout, T.J., Hitz, W.D., 1989. Localization of a protein, immunologically similar to a sucrose-binding protein from developing soybean cotyledons, on the plasma membrane of sieve-tube members of spinach leaves. *Planta* 180, 105-115.

- Warmbrodt, R.D., Vanderwoude, W.J., Hitz, W.D., 1991. Studies on the localization of a protein, immunologically similar to a 62-kilodalton sucrose-binding protein isolated from developing soybean cotyledons, in the shoot and root of spinach. *New Phytol.* 118, 501-511.
- Weise, A., Barker, L., Kühn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B. & Ward, J.M. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* 12, 1345-1355
- Williams L. E., Lemoine R., Sauer N., 2000. Sugar transporters in higher plants- a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* 5, 283-290.

## Figure legends

Figure 1. Gene structure of soybean *SBP2*.

- A. Schematic diagram of the intron-exon organization of *GmSBP2* in the soybean genome (*gsS641.1*). The position of the translation start codon (ATG) in the first exon and the translation stop codon within exon 6 are indicated. The exons (black boxes) are numbered from 1 to 6. Promoter region and 3' flanking genomic sequence are indicated by white boxes and introns as hatched boxes. The positions of some restriction enzyme sites are indicated.
- B. Schematic representation of the *gsS641.2* allele. An extension of 4-kb sequences representing the genomic clone *gsS641.2* is presented in which the promoter sequences, intron and exons are indicated as in A. The positions of some restriction enzyme sites are indicated.
- C. Putative cis-regulatory elements on *gsS641.1* promoter regions. The sequences presented extend until the ATG translational initiation codon of *gsS641.1*. Numbers indicate position relative to the translation start codon. The putative transcriptional start site +1 is indicated, followed by the putative TATA box. Several putative cis-regulatory elements are underlined and indicated by their appropriate names.

Figure 2. DNA gel blot analysis. Soybean genomic DNA (10 µg) was digested with *EcoRI* (E) and *BamHI* (B), separated by electrophoresis, transferred to nylon membrane and hybridized with a fluorescein labeled *GmSBP2/S64* cDNA sequence. The numbers at the top correspond to the relative gene copy number. Migration positions of molecular weight standards are indicated on the right in kb.

Figure 3. *GmSBP1* cDNA FISH on soybean interphase nuclei. Interphase nuclei were hybridized with a fluorescein-labeled *GmSBP1* cDNA fragment and the DNA was counterstained with propidium iodide. Using a *GmSBP1* cDNA sequence as probe, four hybridization sites (two loci) with similar intensity were consistently observed in different preparations.

Figure 4. FISH on soybean interphase nuclei with *gsS641.2* genomic probe (*SBP2/S64*). Soybean interphase nuclei were hybridized with a fluorescein-labeled *gsS641.2* genomic fragment and counterstained with propidium iodide (A and D). The originally colored TIFF images were converted into a gray scale up to 255 value (B and E) and the

fluorescence intensity of the hybridizing signal was pseudocolored for graphic representation (scale from 0 to 255 points) (C and F). The *gsS641.2* genomic probe discriminates between the two loci.

Figure 5. Tissue-specific regulation of *SBP2-GUS* and *SBP2-GFP* fusion gene expression in transgenic plants. Photographs of transgenic organs plants harboring -2000*SBP2-GUS* fusion gene stained for GUS activity or *SBP2-GFP* fusion gene visualized for GFP fluorescence. The expression of -2000*SBP2-GUS* fusion gene was determined in longitudinal section through the shoot apex (B); transverse sections of leaf (D) (E), (F) and (G); transverse section of petiole (L); transverse section through the stem (N); root tip (R) and transverse sections of roots (S). The expression of -2000*SBP2-GFP* fusion gene was visualized in transverse section of the shoot apical meristem (C); transverse sections of leaves (H) and (J); transverse section through the stem (P) and transverse section of roots (T).

(A), (D), (K) (M) and (Q) correspond to pCAMBIA-transformed, control plants stained for GUS activity. (A) Longitudinal section through the shoot apex; (D) transverse section of leaves; (K) transverse section of petiole; (M) transverse section of stems and (Q) transverse section of roots. The transverse section of leaf (I) and transverse section through the stem (O) are originated from pCAMBIA-transformed control plants but visualized for fluorescent background.

Abbreviations: LP, procambium; SAM, shoot apical meristem; E, epidermis; VT, vascular tissue; Pa, parenchyma; X, xylem; EP, external phloem; IP, internal phloem; T, trichome; VB, vascular bundle; MS, mesophyll; P, Phloem; ST, sieve tube; SP, sieve plate; AM, apical meristem; VC, vascular cylinder; RC, root cap; PX, primary xylem; PP, primary phloem. Bars in (A), (B), (E), (L), (M), (N) and (S) = 200  $\mu\text{m}$ ; bars in (D), (K), (Q) and (R) = 100  $\mu\text{m}$ ; bars in (F), (I), (J), (O), (P) and (T) = 50  $\mu\text{m}$ ; bars in (C) and (H) = 20  $\mu\text{m}$ ; bar in (G) = 10  $\mu\text{m}$ .

Table 1. Relative density of the hybridizing signals, as shown in Figure 4.

<b>Signal number*</b>	<b>Relative density**</b>
B1	243
B2	243
B3	187
B4	176
E1	243
E2	243
E3	239
E4	214

\*The numbering scheme is according to Figure 4B and 4E

\*\*Highest peak of fluorescence intensity

Figure 1.

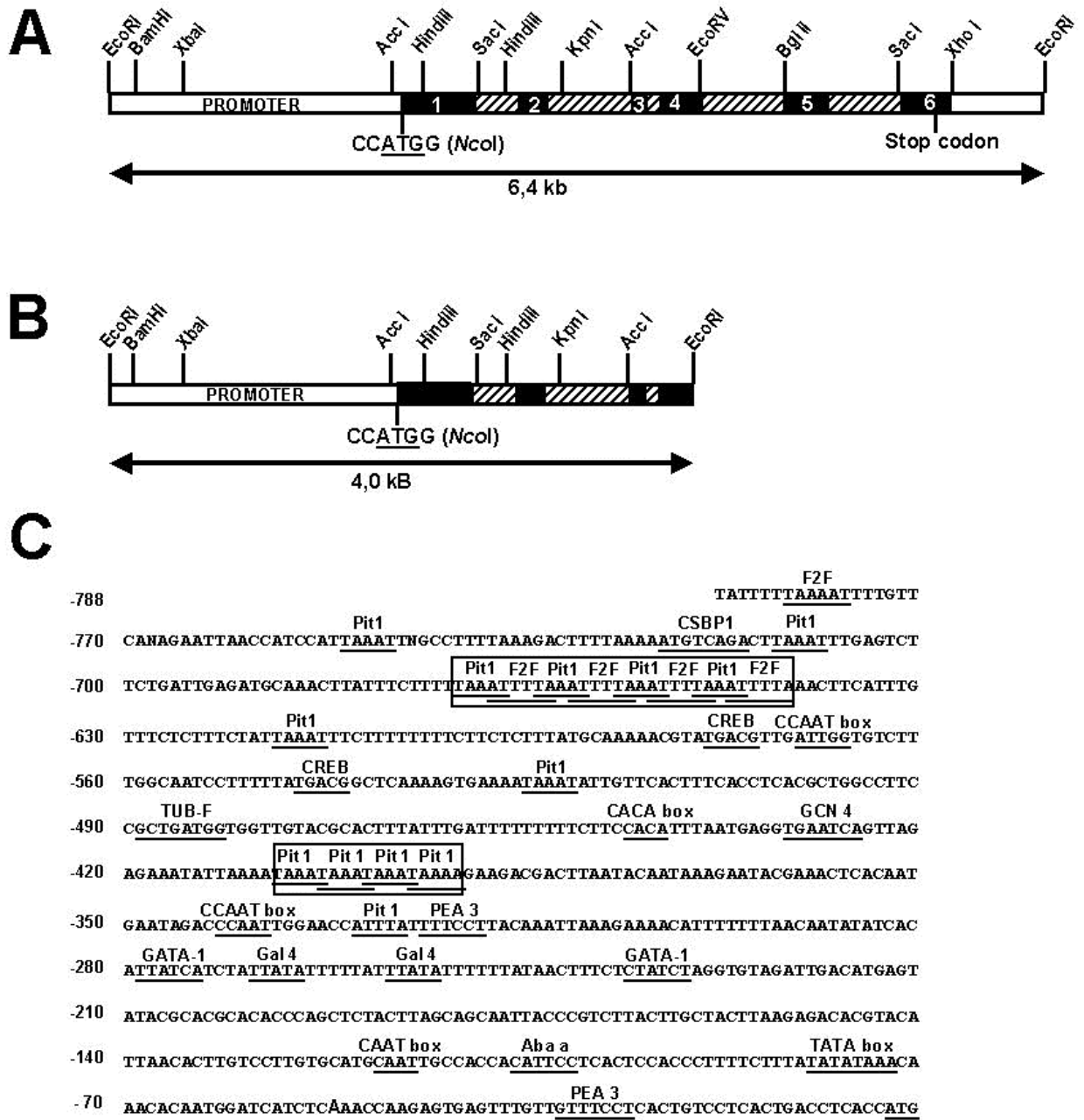


Figure 2.

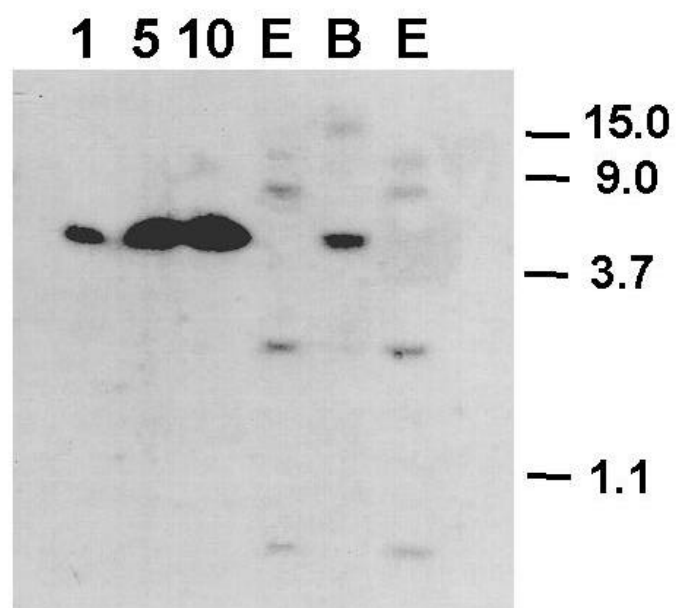


Figure 3.

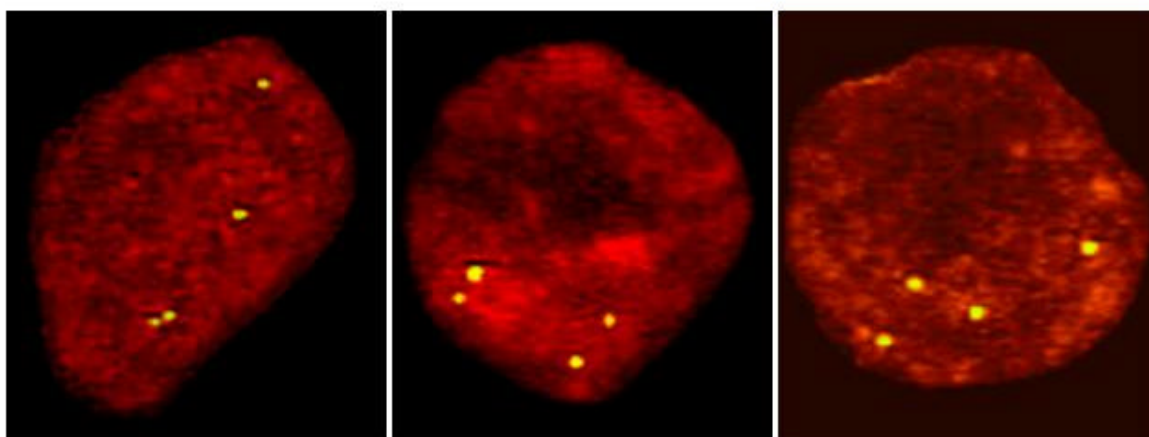


Figure 4.

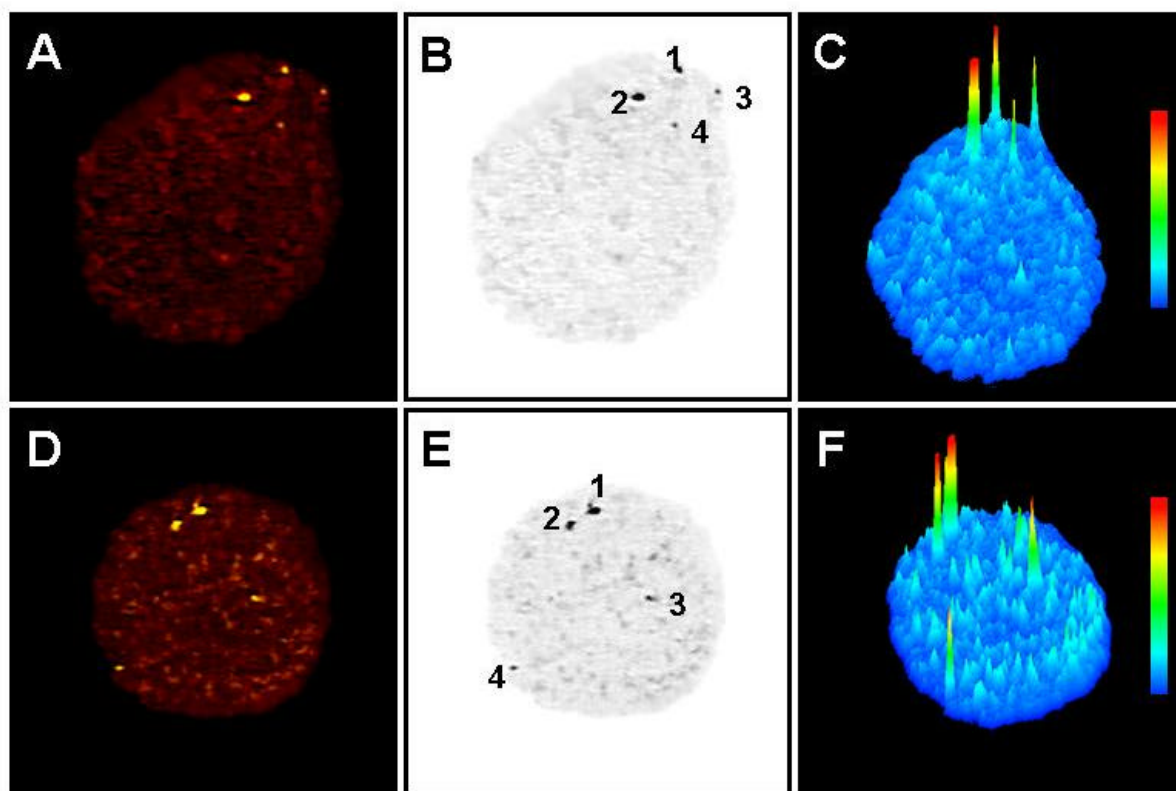
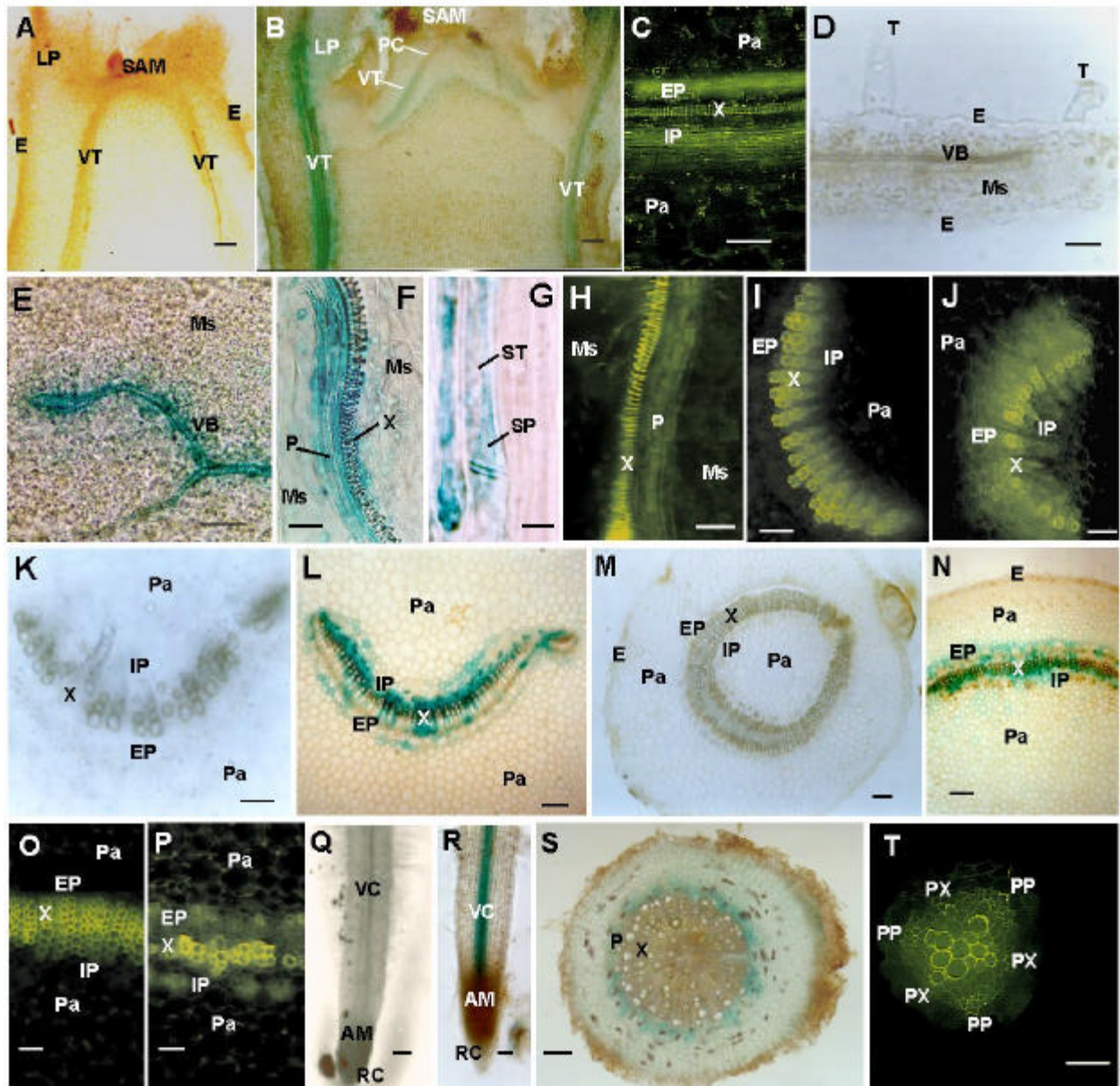


Figure 5.



## **Artigo II**

Caracterização molecular e funcional da região promotora do gene *SBP2* de soja em plantas de tabaco transgênicas

## Introdução

A regulação transcricional de enzimas envolvidas na biossíntese de sacarose e amido parece ser bem coordenada e depende das condições de luz, do estágio de desenvolvimento e do status nutricional da planta (Heineke et al., 1994). Exemplos de genes regulados por sacarose incluem o gene do zíper de leucina *ATB2* de *Arabidopsis*, e o promotor *RoIC* de *Agrobacterium* (Smeeckens e Rook, 1997; Yokohama et al., 1997). Em beterraba, altas concentrações de açúcares causam a repressão da atividade de transporte de sacarose, correlacionando com a redução nos níveis de mRNA de *BvSUT1* (Chiou e Bush, 1998). Deste modo, tais estudos indicam a presença de processos de percepção e transdução de sinais específicos, em que tanto sensores internos quanto externos podem estar envolvidos. Respostas específicas à glicose também têm sido descritas (Thomas e Rodriguez, 1994; Koch, 1996). Todavia, glicose e sacarose parecem controlar vias diferentes. Enquanto a glicose favorece a divisão celular, a sacarose está relacionada com o acúmulo de compostos de reserva em sementes (Weber et al., 1998).

Na maioria das espécies, o embrião em desenvolvimento é simplasticamente isolado dos tecidos maternos, sendo capaz de importar açúcares do espaço apoplástico que o envolve (Thorne, 1995). Açúcares são requeridos para o desenvolvimento do embrião e para a deposição de compostos de reserva para a germinação. Transportadores de monossacarídeos e dissacarídeos expressos nas células do cotilédone do embrião têm sido identificados em *Vicia faba*, *Pisum sativum* e *Hordeum vulgare*, cuja presença está relacionada com o suprimento de substratos para a síntese e armazenamento de compostos (Weber et al., 1997; Tegeder et al., 1999; Weschke et al., 2000). Transportadores de sacarose relacionados com o processo de germinação também foram identificados, sendo expressos em altos níveis em cotilédones em germinação e, parecem ser responsáveis pelo descarregamento de sacarose do parênquima de reserva para o espaço apoplástico (Bick et al., 1998). Diversos outros transportadores também já foram identificados em flores, um órgão-dreno forte (Stadler et al., 1999).

Como os transportadores de açúcares possuem uma função chave nas interações fonte-dreno, é evidente que eles precisam ser controlados. Existem vários níveis em que esta regulação pode ocorrer (Bush, 1999; Delrot et al., 2000). A regulação transcricional da expressão gênica acontece com a alteração do padrão de expressão dos transportadores devido à transição dreno-fonte (Riesmeier et al., 1993), durante o desenvolvimento da semente (Weber et al., 1997) ou durante a maturação do pólen e a germinação (Truernit et al., 1999; Ylstra et al., 1998). Também existem evidências que fatores abióticos e bióticos como tratamentos mecânicos, luz, água, estresse salino, fitormônios e ataque de patógenos induzem a expressão de certos transportadores (Williams et al., 2000).

As plantas possuem vários transportadores de monossacarídeos e dissacarídeos envolvidos no transporte de açúcares em diversos tecidos, para diferentes estádios de desenvolvimento e sob várias condições ambientais (Williams et al., 2000). Nos últimos anos, o isolamento de proteínas transportadoras de sacarose em plantas foi ampliado com a utilização de ensaios de complementação, em leveduras deficientes na utilização de sacarose disponível no meio de cultura (Frommer e Ninnemann, 1995). Membros da família SUT (Sucrose Transporter) foram isolados inicialmente em espinafre e batata (Riesmeier et al., 1992, 1993). O *screening* heterólogo de bibliotecas de cDNA ou genômicas permitiu tanto a identificação de genes homólogos em outras espécies, quanto a identificação de mais de um carreador em uma mesma espécie. Comparações detalhadas das seqüências e estudos filogenéticos mostram que na maioria dos casos, estes genes originaram-se de ampliações gênicas, sendo que cada membro da família retém funções específicas (Rentsch et al., 1998). Tem sido proposto que as múltiplas cópias gênicas em uma espécie estão relacionadas com um mecanismo sofisticado de regulação, específica de célula, tecido ou órgão, em resposta a um estágio de desenvolvimento ou outros estímulos internos e externos (Zimer et al., 1996). A estrutura básica destes transportadores compreende 12 domínios transmembrana, com uma alça hidrofílica central (Lu e Bush, 1998). A atividade de transportadores de sacarose pode ser regulada nos níveis transcricional, pós-transcricional, incluindo a estabilidade do mRNA, traducional, endereçamento e modificação das proteínas. A expressão de

mRNAs de transportadores de sacarose de batata e *Arabidopsis* está sob o controle do desenvolvimento e da transição dos tecidos-dreno para tecidos-fonte (Riesmeier et al., 1993; Truernit and Sauer, 1995).

Estudos de expressão antisense em solanáceas mostram que SUT1 é essencial para o carregamento do floema e o transporte a longa distância, causando fenótipos típicos de inibição do transporte de sacarose. Estes incluem redução do tamanho e do número de tubérculos em plantas de batata (Riesmeier et al., 1994; Kühn et al., 1996) e retardamento do desenvolvimento com redução drástica da exportação de açúcares das folhas em tabaco (Bürkle et al., 1998). Os transportadores de sacarose SUT têm sido localizados normalmente associados à membrana plasmática de elementos de tubo crivado e de células companheiras. Todos estes transportadores resultam da transcrição do gene na célula companheira, e isto pode ser importante para determinar os sinais e os mecanismos que regulam seu destino final (Kühn et al., 1997).

Existem evidências que alterações nos níveis de açúcares podem afetar a expressão e a atividade de transportadores de açúcares. Em folhas destacadas de beterraba, a regulação da atividade do transportador simporte de sacarose foi específico para sacarose, dependente da concentração, e foi correlacionado com alterações dos níveis de transcrição, e reversível. Estas características são consistentes com uma rota de sinalização dependente de sacarose que dinamicamente regula o carregamento do floema, capaz de responder às alterações dos níveis de sacarose no floema (Chiou e Bush, 1998). Isto tem um impacto direto no particionamento de assimilados para o nível da translocação no floema. O fluxo de açúcares e a concentração de açúcares solúveis e amido em folhas-fonte é regulado durante o dia em batata e tabaco com uma razão máxima para o final do período luminoso (Heineke et al., 1994). De acordo com estes dados, o transportador de sacarose SUT1 de tomate e batata acompanha este padrão de regulação (Kürn et al., 1997). Não pode ser excluído que o aumento dos transcritos de SUT1, induzidos pela luz, é baseado em uma regulação circadiana do transportador.

Tem sido demonstrado que fitormônios como auxinas e citocininas também aumentam a razão de carregamento do floema (Ward et al., 1998). De fato, a aplicação de fitormônios em folhas destacadas de batata acarretou um

aumento nos níveis de transcritos do transportador de sacarose StSUT1 (Harms et al. 1994).

Chiou e Bush (1998) identificaram a sacarose como uma molécula sinalizadora na rota de transdução de sinais que regula a atividade do transportador de sacarose em beterraba, através do controle transcricional ou da estabilidade do mRNA. As rotas de reconhecimento de sacarose podem modular a atividade de transporte em função da alteração das concentrações de sacarose da folha (Chiou e Bush, 1998). Esta rota de regulação pode ser considerada um exemplo de 'regulação dreno', em que a redução da demanda do dreno causa um aumento das concentrações de sacarose no floema, reduzindo a expressão do transportador de sacarose da folha. A 'regulação dreno' também tem sido descrita para genes fotossintéticos (Krappet al., 1993) e invertases (Roitsch et al., 1995).

A proteína SBP foi identificada inicialmente por Ripp et al. (1988) pela capacidade de se ligar à sacarose. Subseqüentemente, seu cDNA foi clonado (Grimes et al., 1992) e a capacidade de SBP transportar sacarose foi confirmada com o restabelecimento do crescimento em sacarose de células de leveduras transgênicas, deficientes na utilização de sacarose, com a expressão ectópica de SBP (Overvoorde et al., 1997). SBP foi localizada na membrana plasmática de vários tipos celulares envolvidos no transporte de sacarose, incluindo células do mesófilo de folhas-dreno jovens, em células companheiras do floema maduro e em células de cotilédones em desenvolvimento. Consistente com esta observação, o promotor *SBP2* é capaz de dirigir a expressão de genes repórteres especificamente para as células do floema em plantas de tabaco transgênicas, co-localizando com o sistema de transporte de sacarose (Contim et al., 2002). A análise da seqüência do cDNA de *SBP* mostrou que esta proteína é parte de um grupo distinto de transportadores de sacarose, cujo padrão de expressão temporal correlaciona-se com o período de transporte de sacarose no cotilédone (Grimes et al., 1992). Um segundo membro deste grupo, *SBP2*, com 85% de identidade de seqüência com *SBP*, foi capaz de alterar o transporte de sacarose em células de tabaco transgênicas em suspensão (Delú-Filho et al., 2000). A expressão senso e antisense do cDNA *SBP2* em plantas de tabaco transgênicas afetou o particionamento de carboidratos e o desenvolvimento das plantas

transformadas (Pedra et al., 2000). Além de estar envolvida no transporte de sacarose, a proteína SBP2 possui um sítio de ligação a GTP que é funcional e independente da capacidade de se ligar a sacarose, e possivelmente está envolvida numa rota de transdução de sinais, relacionada com o metabolismo de sacarose (Pirovani et al, 2002). O envolvimento de proteínas que se ligam a GTP em rotas de transdução de sinais em plantas é revisado por Assmann (2002). A expressão da proteína GPA1 que se liga a GTP é abundante no tecido vascular e em meristemas, um padrão muito similar ao observado para a proteína SOGA1 de espinafre (Perroud et al., 2000). A família *SBP* é uma família gênica pequena, composta de pelo menos dois membros em soja (Contim et al., 2002) e muito pouco é conhecido sobre a função e os mecanismos que regulam a expressão das proteínas SBP na planta.

Neste trabalho, plantas de tabaco transgênicas, transformadas com o promotor *SBP2* fusionado ao gene repórter GUS, foram analisadas quanto à distribuição da expressão de GUS na planta. Células em suspensão obtidas a partir destas plantas foram submetidas a ensaios de resposta a açúcares e os resultados foram quantificados pela atividade da enzima GUS. Plantas de tabaco transgênicas contendo deleções do promotor *SBP2* fusionadas ao gene *GUS* foram analisadas para a identificação de regiões responsáveis pelo padrão de expressão tecido-específico. Coletivamente, os resultados apresentados neste artigo fornecem informações importantes para a compreensão do padrão de expressão e do envolvimento do gene *SBP2* no metabolismo e em rotas de transdução de sinais de resposta a açúcares.

## **Material e Métodos**

*Obtenção das construções com as deleções do promotor SBP2 fusionadas ao gene repórter GUS*

O promotor *SBP2* fusionado ao gene repórter *GUS* (-2000p*SBP2*-*GUS*) foi obtido por Contim *et al.* (2002). Fragmentos do promotor *SBP2* deletados de

1511, 1637 e 1869 pb, foram obtidos por meio de PCR. Para isso, o oligonucleotídeo reverso pS64ATGR (GCTTGGGTCTGGTCCGCATGG), que anela da posição -2 à +19 relativo ao códon de início da tradução, foi combinado com os oligonucleotídeos senso pS64Hd138F (TTAAAGCTTGTCTTGTGCATG), pS64BI373F (ATAAAGAATTCGAAACTCACAATG) e pS64Pt505F (CTCACGCTGGCCCTGCAGCTG) que anelam respectivamente nas posições -137 a -116, -370 a -346 e -505 a -485 relativo ao primeiro códon ATG foram utilizados para amplificação dos fragmentos do promotor a partir do DNA recombinante *pgS641.1* (Contim et al., 2002). Os fragmentos purificados de gel foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas. Os fragmentos *NcoI/PstI* de 489 pb, *NcoI/EcoRI* de 363 pb e *NcoI/HindIII* de 131 pb foram clonados nos sítios correspondentes do vetor pUC120, originando os clones pUFV426, pUFV425 e pUFV424, respectivamente. Finalmente os fragmentos foram liberados dos clones com as enzimas *NcoI/HindIII* e inseridos nos mesmos sítios no vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA1381Z, originando os clones pUFV429 (-131p*SBP2-GUS*), pUFV433 (-363p*SBP2-GUS*) e pUFV428 (-489p*SBP2-GUS*).

#### *Obtenção de plantas transgênicas*

Plantas de tabaco transgênicas contendo o promotor *SBP2* fusionado ao gene *GUS* (-2000p*SBP2-GUS*) foram obtidas como descrito por Contim et al. (2002). Os plasmídios recombinantes derivados do vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA1381Z ou o vetor intacto foram utilizados para transformar plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana por meio de transformação de discos foliares mediados por *Agrobacterium tumefaciens* (Alvim et al., 2001) e as plantas transformadas foram regeneradas em meio MS (Murashige E Skoog, 1962) contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de higromicina (Buzeli et al., 2002). Para cada construção, as plântulas foram testadas para a atividade de *GUS* e os transformantes primários (T0) foram mantidos *in vitro* ou transferidos para o solo e crescidos em condições controladas em casa de vegetação para os ensaios histoquímicos e fluorimétricos. As plantas enraizadas foram

testadas para a incorporação do gene de resistência à higromicina por análises de PCR (dado não mostrado). A intensidade da coloração e atividade de GUS entre as linhas independentes foram similares e o padrão de expressão foi consistente entre linhas transgênicas independentes. As análises histoquímicas foram feitas em quatro transformantes independentes de cada uma das construções -489pSPB2-GUS, -363pSPB2-GUS e -131pSPB2-GUS.

#### *Obtenção de células em suspensão de tabaco transgênico*

As células em suspensão foram obtidas a partir de três transformantes independentes de tabaco contendo a construção -2000pSPB2-GUS. O tecido medular do caule das plantas transgênicas foi isolado e transferido para meio MS suplementado com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ANA e 62,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cinetina e cultivado por 3 a 4 semanas até a formação de um calo esponjoso. Os calos foram transferidos para 50 mL de meio NT-1 [sais MS suplementados com sacarose 3% (p/v), tiamina-HCl 0,0001% (p/v), inositol 0,01% (p/v), 2,4-D 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,32 mM] e incubados, sob agitação de 110 rpm, até a desagregação das células dos calos.

#### *Determinação da atividade da enzima GUS em órgãos e células em suspensão de plantas transgênicas de tabaco.*

A extração de proteínas para os ensaios fluorimétricos e a determinação da atividade de GUS foram feitas essencialmente como descrito por Jefferson et al. (1987), utilizando metilumbelliferona (MU) como padrão. Para o ensaio padrão, fragmentos dos órgãos ou as células em suspensão foram macerados em 0,5 mL do tampão de ensaio da enzima GUS [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100 mM (pH 7,0), EDTA 10 mM, sarcosil 0,1% (p/v), Triton X-100 0,1% (v/v)] e 25  $\mu\text{L}$  deste extrato foram misturados com 25  $\mu\text{L}$  do tampão de ensaio da enzima GUS, contendo 1,7 mM do substrato 4-methylumbelliferone  $\beta$ -D glucuronidio (MUG). A mistura foi incubada a 37° C no escuro por 15 min e a atividade da enzima

GUS foi medida usando um Fluorímetro DYNA Quant 200 (Amersham Pharmacia Biotech). As análises fluorimétricas foram feitas em três linhagens independentes de células e de plantas de tabaco transgênicas -2000pSPB2-GUS e em três transformantes independentes de cada construção -489pSPB2-GUS, -363pSPB2-GUS e -131pSPB2-GUS.

#### *Análise histoquímica do padrão de expressão*

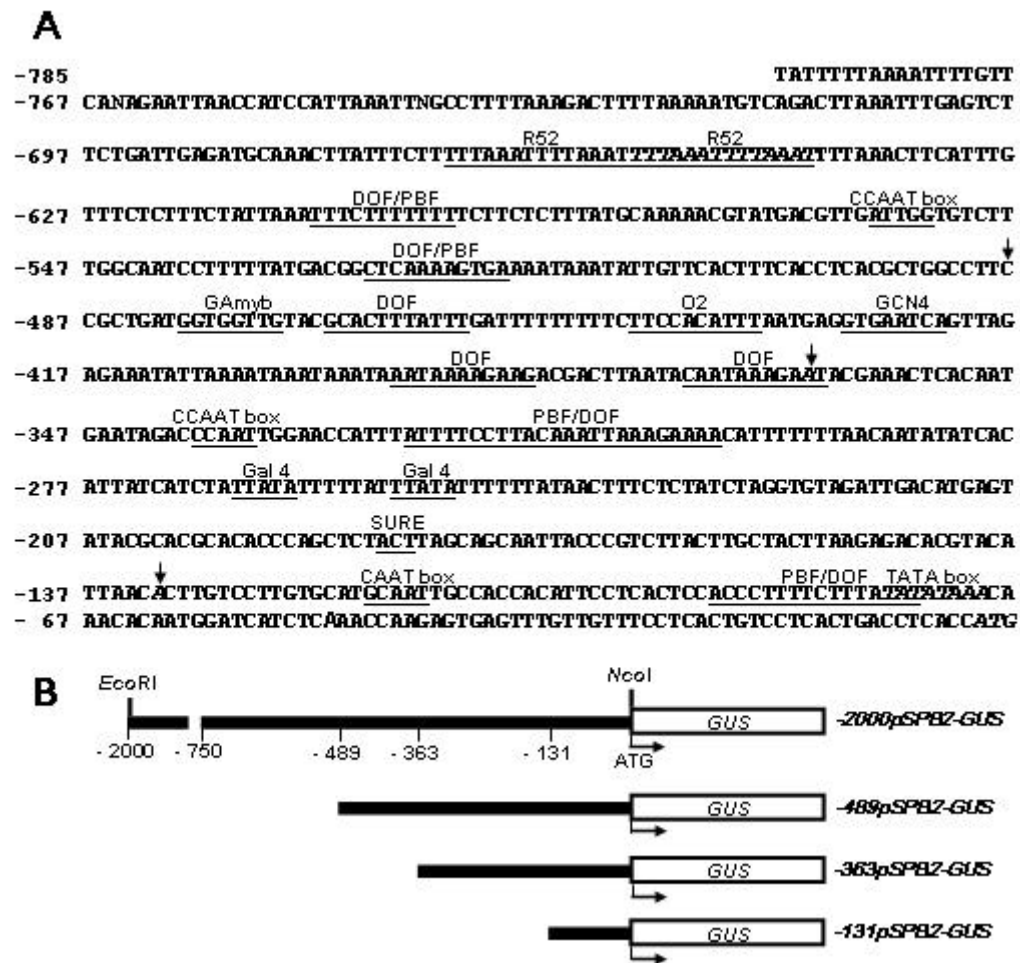
Para as linhagens transgênicas -2000pSPB2-GUS, -489pSPB2-GUS, -363pSPB2-GUS e -131pSPB2-GUS, as análises histoquímicas da atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase foram feitas conforme descrito por McCabe et al. (1988). Os tecidos (raízes, caules e folhas) foram coletados e seccionados usando um micrótomo manual. As seções dos tecidos foram embebidas no tampão de ensaio da enzima GUS [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100 mM (pH 7,0),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) ] contendo 5 bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D glucuronide (X-Gluc) (McCabe et al., 1988) e incubados a 37 °C no escuro por 4 horas. Os pigmentos foliares foram extraídos dos tecidos corados com solução de metanol:acetona (3:1). Após várias lavagens, os tecidos clarificados foram armazenados em solução de glicerol 50% (v/v) e montados em lâminas para fotodocumentação. As micrografias foram obtidas em um microscópio Olympus AX-70.

## **Resultados**

*A seqüência do promotor do gene SBP2 possui elementos em cis característicos de promotores de genes envolvidos no metabolismo e transporte de açúcares.*

A análise de aproximadamente 790 pb da região promotora do gene *SBP2*, com programas computacionais, mostrou a presença de diversos elementos em *cis*, característicos de promotores de genes eucariotos, inclusive a presença de um TATA box na posição -77 a -70 relativo ao sítio de início de tradução (Contim et al., 2002). O sítio +1 da transcrição foi deduzido como o nucleotídeo A, na posição -49 em relação ao sítio de início de tradução, com o auxílio do programa cutoff 0.80 ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)). O sítio +1 de transcrição dista 21 nucleotídeos *downstream* da seqüência TATA, numa localização favorável para o contexto de início de transcrição. Nas posições de -115 a -111 foi identificada a seqüência CAAT, que possui uma função importante na determinação da eficiência de transcrição do promotor (Figura 1A).

Além dos elementos responsáveis pelo aparato basal de transcrição, foram identificados vários outros sítios regulatórios importantes, envolvidos na expressão gênica em plantas, com o auxílio dos programas *Signal Scan* (<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal/>) e *Genomatix* (<http://www.genomatix.de/>) (Figura 1A). Na posição de -185 a -183, foi identificado um elemento tipo SURE (*sucrose responsiveness element*), responsável pela indução gênica em resposta à sacarose, apresentando maior similaridade com o elemento SURE-2 do gene da patatina (-180 a -178) (Urwin e Jenkins, 1997). Além deste, o promotor *SBP2* possui dois elementos tipo Gal 4, nas posições de -266 a -262 e de -254 a -250, envolvidos na regulação do metabolismo de açúcares em leveduras (Griggs e Johnston, 1991).



**Figura 1.**

Seqüência do promotor *SBP2* e esquema das construções químéricas. (A) Seqüência de nucleotídeos do promotor do gene *SBP2* com os prováveis elementos regulatórios em *cis* sublinhados. As setas indicam o nucleotídeo de início de cada fragmento de deleção e o sítio +1 de transcrição deduzido é representado por A em destaque na posição -49 ao sítio de início da tradução (códon ATG em *itálico*). (B) Diagrama das construções químéricas do promotor *SBP2-GUS* (-2000p*SBP2-GUS*) contendo a posição esquemática de cada deleção (-131, -363 e -489). A posição do primeiro códon ATG é representado por uma seta direcional.

Consistente com o envolvimento de fitormônios na regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo e transporte de açúcares, foi identificado um elemento regulatório de resposta a giberelinas no promotor *SBP2*. O elemento GAmbyb, localizado entre as posições -480 e -473, foi identificado como o sítio de ligação da proteína regulatória GAMYB, expressa especificamente nas células da camada de aleurona em cereais, responsável

pela ativação de um grande número de enzimas envolvidas no metabolismo energético (Gubler et al., 1999).

O promotor *SBP2* dirige a expressão dos genes repórteres *GUS* e *GFP* especificamente para as células do floema, de caules, folhas e raízes, em plantas transgênicas de tabaco (Contim et al., 2002). De acordo com este padrão de expressão, diversos sítios, possivelmente envolvidos na regulação tecido-específica, foram identificados na seqüência do promotor *SBP2*. Os sítios R52 (-670 a -657 e - 656 a -643) têm sido descritos como responsáveis pela expressão específica em semente de soja (Jofuku et al., 1987). A proteína regulatória R52 de 60 kDa é expressa especificamente na semente de soja, ativando a expressão do gene da lectina.

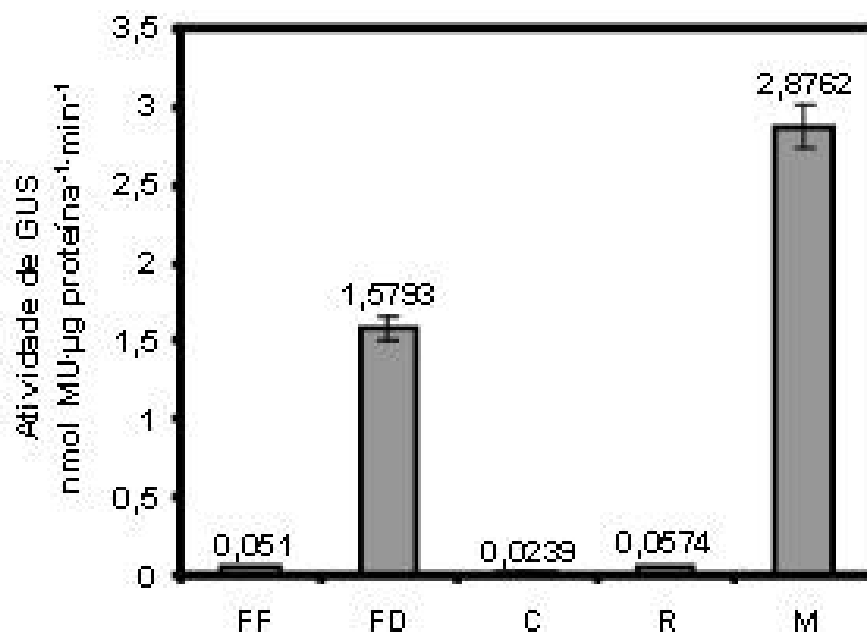
Pelo menos sete sítios relacionados com a proteína regulatória DOF foram identificados no promotor *SBP2* (Figura 1A). As proteínas DOF são uma família de fatores de transcrição, identificadas em associação com diversos promotores de genes específicos de plantas, envolvidas em funções diferentes no controle da expressão gênica em plantas (Yanagisawa e Schmidt, 1999). O fator PBF, um tipo de fator DOF de milho, é expresso especificamente no endosperma, coordenando a ativação da expressão dos genes das zeínas, durante o desenvolvimento do endosperma. Recentemente, foi identificado um fator DOF de *Arabidopsis*, específico do floema, relacionado com a expressão de genes no floema (Papi et al., 2002). Adicionalmente, seqüências de ligação dos fatores Opaque2 (O2) e GCN 4, que atuam em associação com os fatores DOF, foram localizados nas regiões -446 a -437 e -430 a -423, respectivamente (Vicente-Carboja et al., 1997).

Um outro provável sistema de controle da expressão gênica, identificado no promotor *SBP2*, tem sido descrito pela interação de proteínas regulatórias que se ligam ao sítio CCAAT box, presente em um grande número de promotores de genes de plantas. Várias proteínas regulatórias que se ligam a este sítio já foram identificadas, existindo um número grande de homólogos em uma mesma espécie (Edwards et al., 1998), indicando um sistema complexo de regulação. Deste modo, o padrão de expressão do gene *SBP2* em soja parece ser regulado por um grande número de fatores acessórios de transcrição, o que indica um sistema complexo e cooperativo no controle da expressão gênica.

*O promotor do gene SBP2 dirige a expressão da enzima GUS diferencialmente para diferentes órgãos na planta.*

Existe uma grande variação no padrão de expressão das proteínas da família SUT em plantas. A expressão dos mRNAs dos transportadores de sacarose em batata e *Arabidopsis* está sob o controle do desenvolvimento da planta e obedece à transição dos órgãos dreno para fonte (Riesmeier et al., 1993; Truernit and Sauer, 1995). Deste modo, existe um nível de regulação em transportadores SUT que é sensível ao estágio de desenvolvimento do órgão na planta. Tanto a proteína (Pirovani et al., 2002) quanto o mRNA *SBP2* (Fontes, dado não publicado) acumulam-se no início do desenvolvimento em sementes de soja, o que indica que *SBP2* está sob o controle temporal durante o desenvolvimento da semente.

Consistente com estas observações, o promotor *SBP2* dirigiu a expressão do gene repórter *GUS* diferencialmente para os vários órgãos testados, em plantas de tabaco transgênicas (Figura 2). Níveis muito baixos de atividade da enzima *GUS* foram detectados em órgãos maduros, como folhas-fonte, caule e raiz (Figura 2, FF, C e R). Em contraste, níveis elevados de expressão foram detectados em tecidos em desenvolvimento, com alta taxa de divisão celular, como folhas-dreno (folhas jovens em crescimento) e no meristema apical caulinar (Figura 2, FD e M). A atividade no meristema radicular não foi testada. As folhas jovens e o meristema apical caulinar são considerados órgãos-dreno fortes, com alta taxa de consumo de fotoassimilados na planta em desenvolvimento. Estes dados correlacionam o padrão de expressão controlado pelo promotor *SBP2* com tecidos em desenvolvimento, indicando a existência de um nível de controle temporal.

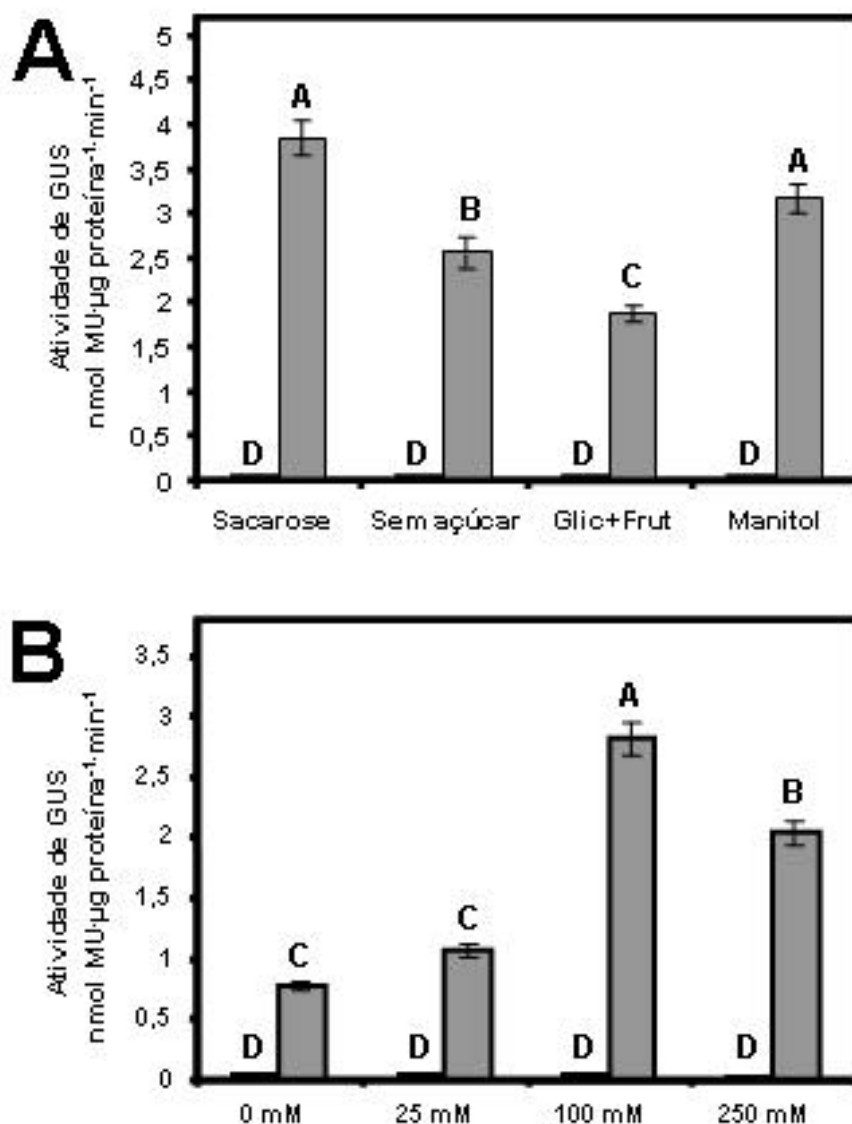


**Figura 2.**

Atividade de -2000pSBP2-GUS em tecidos de plantas de tabaco transgênicas após 10 dias de cultivo no solo. FF: folha-fonte, FD: folha-dreno, C: caule, R: raiz, M: meristema apical caulinar.

*A expressão de GUS é diferencialmente regulada em células em suspensão de tabaco transgênico de acordo com a disponibilidade de açúcar no meio de cultura.*

Os transportadores de sacarose em plantas estão diretamente envolvidos nos processos de alocação de fotoassimilados no corpo vegetal. Deste modo, estes transportadores, ao mesmo tempo em que dirigem o fluxo de sacarose entre o floema e as células adjacentes, eles próprios estão sob o controle da disponibilidade do açúcar. A presença de uma possível rota de reconhecimento de açúcares pode provocar alterações nos níveis de expressão e atividade dos transportadores de sacarose, em função de alterações nas concentrações de sacarose na folha (Chiou e Bush, 1998).



**Figura 3.**

Atividade de GUS em células em suspensão de plantas transgênicas de tabaco controle e -2000p*SBP2-GUS*, cultivadas em meio NT-1 com diferentes condições de disponibilidade de açúcar. A) Atividade da enzima GUS nas células em suspensão cultivadas em meio NT-1 com 87,6 mM de sacarose, sem açúcar, 87,6 mM de glicose + 87,6 mM de frutose e 87,6 mM de manitol como fontes de açúcar, durante 48 horas de cultivo. (B) Atividade da enzima GUS após 48 horas de incubação em meio NT-1 com 0, 25, 100 e 250 mM de sacarose. As letras acima das barras indicam a similaridade entre as médias pelo teste T com  $\nabla=5\%$ .

Deste modo, a expressão e a atividade de transportadores de sacarose são direta ou indiretamente reguladas pela disponibilidade do açúcar. Células em suspensão foram obtidas a partir de plantas transgênicas de tabaco e cultivadas em meio suplementado com sacarose. As células foram coletadas e

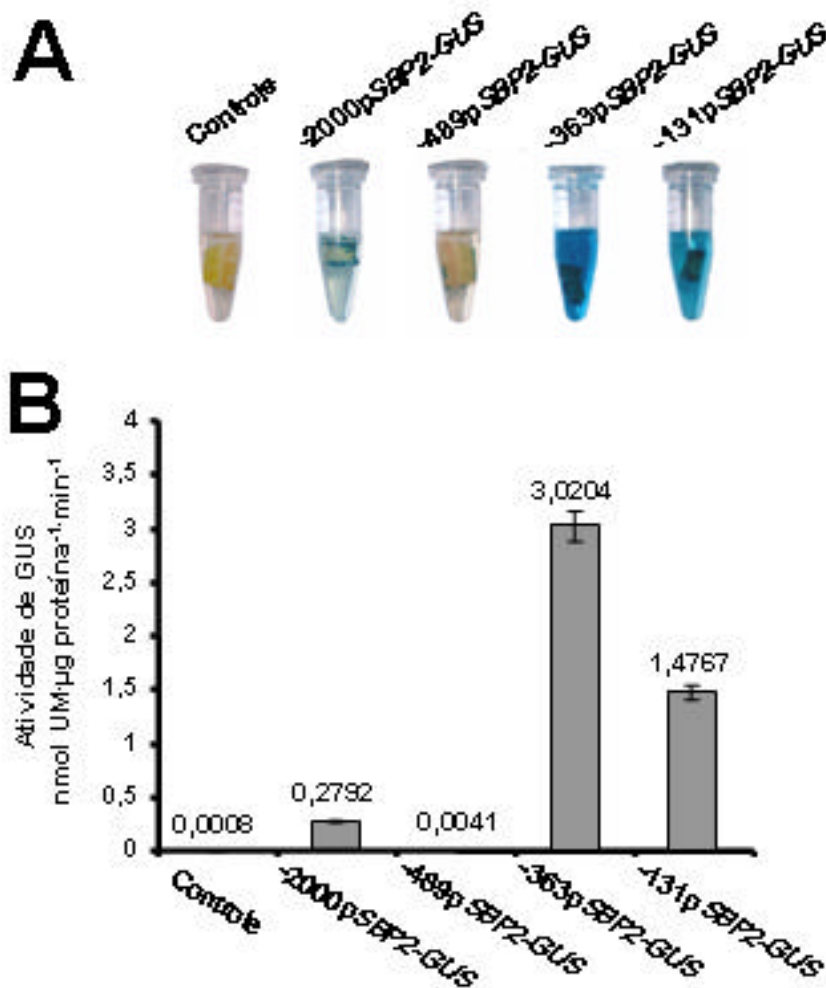
transferidas para meios de cultura suplementados com sacarose, glicose + frutose, manitol e meio não suplementado com açúcares, para testar uma possível resposta à forma específica de açúcar disponível. Após 48 horas de cultivo, as células foram coletadas e a atividade da enzima GUS foi quantificada (Figura 3A). A atividade da enzima GUS nas células cultivadas em sacarose foi pelo menos duas vezes maior que em células crescidas em meio contendo glicose+frutose. Além disso, a atividade de GUS nas células cultivadas no meio de cultura sem açúcar foi 28% menor em média do que naquelas cultivadas no meio suplementado com sacarose, indicando que houve uma indução e/ou de-repressão no promotor pela presença de sacarose. Esta diferença não foi devida à alteração do potencial osmótico do meio sem açúcar, pois valores muito similares foram obtidos nas células cultivadas em manitol. Em comparação com as células cultivadas em manitol e meio sem açúcar, a atividade de GUS nas células cultivadas na presença de glicose+frutose foi bem inferior, indicando que a atividade do promotor foi reprimida pela presença dos produtos de clivagem da sacarose. Deste modo, o promotor *SBP2* é diferencialmente regulado pela forma de açúcar disponível no meio de cultura.

Similarmente, células em suspensão cultivadas em sacarose foram coletadas e incubadas por 48 horas em meios de cultura contendo 0, 25, 100 e 250 mM de sacarose (Figura 3B). A atividade da enzima GUS determinada nos extratos das células crescidas em diferentes concentrações de sacarose indicou que a atividade do promotor *SBP2* é dependente da concentração de sacarose disponível no meio de cultura das células em suspensão. Baixa atividade enzimática foi detectada quando as células foram incubadas com baixas concentrações (25 mM) ou a ausência (0 mM) de sacarose no meio de cultura, em relação às células incubadas com 100 mM de sacarose. Foi observado uma redução na atividade enzimática das células incubadas com 250 mM de sacarose, o que era esperado devido ao efeito do elevado potencial osmótico do meio de cultura (Chiou e Bush, 1998; Sinha et al., 2002). Coletivamente estes resultados indicam que a atividade do promotor *SBP2* é modulada de acordo com a disponibilidade de açúcar no meio de cultura.

*A atividade do promotor SBP2 é controlada por regiões discretas contendo cis elementos regulatórios positivos e negativos.*

O promotor *SBP2* apresenta um padrão de expressão bastante complexo, sendo regulado de maneira tecido-específica (Contim et al., 2002), temporal e dependente de forma e concentração de açúcares (esta investigação). Este padrão complexo de expressão gênica é controlado principalmente pelo conjunto de seqüências regulatórias presentes no promotor, podendo também estar sujeito à influência de outros fatores externos à seqüência do gene, como a localização na cromatina (Gribnau et al., 1998), existência de *enhancers* e “região controladora de locus” (Blackwood e Kadonaga, 1998).

De forma a estudar o papel das prováveis seqüências regulatórias identificadas, deleções do promotor *SBP2* foram geradas por PCR e inseridos no vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA1381Z, controlando a expressão do gene repórter *GUS* (Figura 1B). Plantas transgênicas de tabaco foram geradas a partir destas construções e a atividade da enzima GUS foi quantificada nestes transformantes. Pequenos fragmentos foliares destes transformantes cultivados *in vitro* foram submetidos a um ensaio histoquímico, para o diagnóstico da atividade da enzima GUS (Figura 4A). Todos os fragmentos do promotor testados foram capazes de induzir a expressão da enzima GUS, mostrando que eles possuem pelo menos os elementos mínimos necessários para a iniciação da transcrição. Entretanto, a intensidade de coloração do produto obtido foi visualmente muito discrepante, entre as construções testadas, indicando que cada construção pode estar sendo regulada de maneira diferencial. A atividade de cada construção foi quantificada por ensaio fluorimétrico, com o objetivo de avaliar a contribuição específica do conjunto de elementos regulatórios, das deleções do promotor *SBP2* no controle da expressão gênica (Figura 4B).



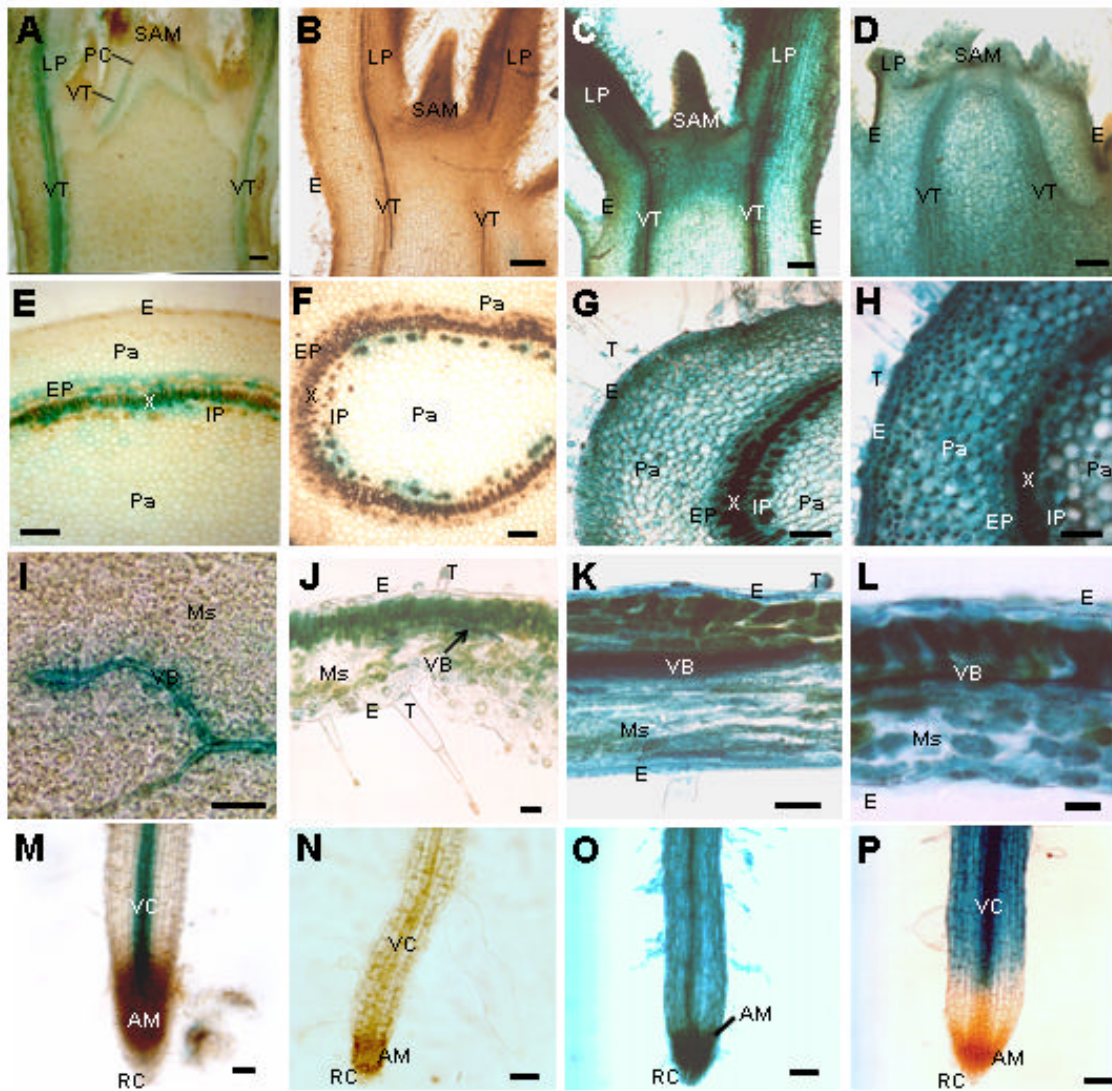
**Figura 4.**

Análise da expressão da enzima GUS em plantas transgênicas. A atividade da enzima GUS nas construções quiméricas do promotor *SBP2* e das suas deleções foi analisada em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. A atividade de GUS foi visualizada pela coloração com o substrato X-Gluc (A) e quantificada em extratos protéicos de folhas maduras cultivadas *in vitro* após a reação com o substrato MUG (B).

A deleção de aproximadamente 1500 pb da seqüência do promotor *SBP2* até a posição -489 (-489p*SBP2-GUS*) causou uma redução da atividade de GUS para níveis praticamente não detectáveis (Figura 4B). Em contraste, as deleções adicionais da seqüência até a posição -363 (-363p*SBP2-GUS*) causaram um acréscimo na atividade de GUS na ordem de 10 vezes, quando comparado com aquele resultante do promotor intacto (-2000p*SBP2-GUS*) (Figura 4B) Esta observação indica a existência de seqüências silenciadoras,

entre as posições -489 e -364 (Figura 1A). Nesta região específica, além da existência de mais três sítios DOF, estão presentes os sítios O2 e GCN4, cujas fatores regulatórios atuam em associação com os fatores DOF, modulando a expressão gênica de modo cooperativo em genes de plantas (Vicente-Carbajosa et al., 1997; Mena et al., 1998).

A deleção adicional do fragmento -364 a -131 (-131p*SBP2-GUS*) resultou em atividade de GUS 5 vezes superior àquela de -2000p*SBP2-GUS*, porém duas vezes inferior àquela resultante de -363p*SBP2-GUS*. Este resultado indica a presença de seqüências regulatórias positivas entre as posições -364 a -131, responsáveis pelo alto nível de expressão da construção -363p*SBP2-GUS*. Além disso, indicam que as seqüências até a posição -131 são suficientes para produzir alto nível de expressão basal. Consistente com esta observação, o fragmento de 131 pb do promotor *SBP2* possui em sua seqüência um elemento CAAT box e um DOF/PBF, que estão correlacionados com a ativação da transcrição, responsáveis por altos níveis de transcrição em promotores de plantas (Kusnetsov et al, 1999; Mena et al., 1998). O fragmento de 363 pb, além dos elementos presentes no fragmento de 131 pb, possuem em acréscimo um sítio DOF e um elemento CCAAT box, também relacionados com a ativação transcricional de genes de plantas, suportando os níveis elevados de atividade da enzima GUS nestes transformantes.



**Figura 5.**

Análise histoquímica da expressão da enzima GUS, nas plantas transgênicas, contendo as construções quiméricas -2000pSBP2-GUS, -489pSBP2-GUS, -363pSBP2-GUS, -131pSBP2-GUS.

A-D, meristemas apicais caulinares; E-H, caules; I-L, folhas; M-P, raízes. As colunas representam respectivamente as plantas -2000pSBP2-GUS, -489pSBP2-GUS, -363pSBP2-GUS, -131pSBP2-GUS. Epiderme, E; Mesófilo, Ms; Bainha vascular, VB; Tricomas, T; Parenquima, Pa; Xilema, X; Procâmbio, PC; floema interno, IP; Floema externo, EP; Meristema caulinar apical, SAM; primórdio foliar, LP; Tecido vascular, VT; Meristema apical, AM; Cilindro vascular, VC; Coifa, RC; (A, B, C, D, E, F e G = 200µm; H, I, K, L, M, N, O e P = 100µm; J = 50µm).

*A construção -489pSBP2-GUS possui uma região silenciadora forte em sua seqüência que suprime os elementos positivos.*

O promotor *SBP2* é capaz de dirigir a expressão dos genes repórteres *GUS* e *GFP* especificamente para as células do floema, em plantas de tabaco transgênicas (Contim et al., 2002). Deste modo, independente de fatores externos ao promotor, a expressão tecido-específica é controlada por seqüências regulatórias restritas à região promotora *SBP2*. Diversos elementos regulatórios identificados no promotor *SBP2* estão relacionados com a expressão tecido-específica em soja e em outras plantas, como o fator R52, DOF/PBF, O2 e GCN4. Estes fatores podem atuar sozinhos, como o fator R52 de soja (Jofuku et al., 1987) e o fator PBF de milho (Yanagisawa e Sheen, 1998), ou em associação, PBF e O2 de milho (Vicente-Carbajosa et al., 1997) e DOF/PBF e GCN 4 de cereais (Müller et al., 1995).

Diferentes órgãos das plantas contendo as construções quiméricas foram seccionados e submetidos a um ensaio histoquímico, para a localização da expressão de *GUS* nos tecidos. As plantas transgênicas mostraram um padrão de expressão tecido-específico bastante complexo, como mostrado na Figura 5.

As plantas transgênicas contendo a construção -489p*SPB2-GUS* perderam completamente a capacidade de dirigir a expressão do gene repórter *GUS* para o meristema caulinar apical (Figura 5B) e para as raízes (Figura 5N), em comparação com as plantas -2000p*SPB2-GUS* (Figura 5A e 5M). Este padrão indica a perda de elementos positivos ou a presença de uma região silenciadora forte para estes órgãos, presente em um contexto diferente daquele encontrado no promotor completo. Interessantemente, o fragmento de -489 pb foi capaz de dirigir a expressão do gene repórter especificamente para o floema interno, mas não para o floema externo do caule (Figura 5F), em contraste com o padrão do promotor completo, que dirigiu a expressão do gene repórter tanto para o floema interno, quanto para o floema externo no caule (Figura 5E). Esta diferenciação entre a expressão no floema interno e externo do caule de tabaco indica que existe alguma diferença entre o conjunto de fatores transcricionais existentes nestes tecidos. A existência do feixe bicolateral em plantas não é uma regra geral, mas é encontrado em um grande número de espécies, entre elas o tabaco (Esaú, 1969).

Similarmente ao observado na folha dos transformantes -2000pSPB2-GUS (Figura 5I), o fragmento de -489 pb foi capaz de dirigir a expressão preferencialmente para os feixes vasculares das folhas dos transformantes -489pSPB2-GUS (Figura 5J). Alguma coloração, muito fraca e dispersa, foi observada nos tecidos adjacentes, mas não é representativa do padrão de expressão. Os dados histoquímicos dos cortes de folhas e caules, associados à quantificação da atividade da enzima GUS na folha, fornecem evidências concretas de que a expressão gênica, controlada pelo fragmento de -489 pb, é silenciada pela presença de elementos em *cis*, presentes entre as posições -489 e -364, envolvidos com a expressão tecido-específica no floema.

*As construções -363pSPB2-GUS e -131pSPB2-GUS dirigem a expressão do gene repórter de modo generalizado e com altos níveis em todos os órgãos da planta.*

Os transformantes -363pSPB2-GUS e -131pSPB2-GUS apresentam um padrão de expressão generalizado, com coloração muito forte, em todos os órgãos analisados (Figuras 5C, 5G, 5K, 5O, 5D, 5H, 5L e 5P). A única exceção foi encontrada na raiz, onde o transformante -131pSPB2-GUS falhou em dirigir a expressão para o meristema radicular. Este padrão de expressão, forte e generalizado, é o produto da interação acumulativa dos sítios regulatórios positivos presentes nestas regiões do promotor. Ao mesmo tempo em que esta regulação positiva é extremamente ativa, parece não existir qualquer tipo de regulação tecido-específica nestas regiões, não havendo distinção alguma entre os tecidos analisados, exceto o meristema radicular do transformante -131pSPB2-GUS. Estas observações são evidências fortes de que os elementos responsáveis pela regulação tecido específica se encontram entre as posições -489 e -364 associados com outros elementos acessórios upstream à posição -489.

A falha do transformante -131pSPB2-GUS em dirigir a expressão do gene repórter para o meristema radicular provavelmente está relacionado com a perda de um elemento em *cis* essencial para a ligação do fator específico do meristema radicular. Consistente com esta possibilidade, a ligação do fator tipo

DOF, NtBBF1, nos promotores de plantas, é essencial para a expressão no meristema radicular em plantas de tabaco. O fragmento de -131 pb possui um sítio do tipo DOF/PBF que se sobrepõe ao TATA box, o que indica que não seja funcional, provavelmente por competir com a ligação com o fator TFIIB do aparato da RNA polimerase II.

## Discussão

A expressão gênica de proteínas transportadoras de sacarose pode ser regulada em níveis diferentes. A regulação transcricional das enzimas envolvidas na biossíntese de sacarose e amido é bem coordenada e dependente das condições de luz, do estágio de desenvolvimento dos órgãos e das condições nutricionais da planta (Kuhn et al., 1999). O padrão de expressão dirigido pelo promotor *SBP2*, específico das células do floema, é semelhante ao observado em outros genes envolvidos no transporte de sacarose em plantas (Contim et al, 2002; Grimes et al., 1992; Truernit e Sauer, 1995; Riesmeier et al, 1993). O promotor *SBP2* apresenta uma estrutura funcional característica de promotores eucarióticos, contendo elementos regulatórios gerais e um conjunto de elementos regulatórios adicionais, específicos de genes de plantas, característicos de um sistema complexo de regulação gênica, semelhante àquele encontrado em genes envolvidos no metabolismo e transporte de açúcares em plantas (Contim et al., 2002; Figura 1A).

O promotor *SBP2* dirige a expressão do gene repórter *GUS* preferencialmente para órgãos jovens em crescimento de plantas de tabaco transgênicas, como meristema apical caulinar e folhas jovens (Figura 2). Estes órgãos, em início de desenvolvimento, possuem alta taxa de divisão celular, com alta demanda de carboidratos para serem utilizados tanto como fonte de energia, quanto como matéria prima para a síntese de compostos estruturais celulares. Estes dados indicam que a expressão do gene *SBP2* acontece em tecidos-dreno, de acordo como descrito por Grimes et al. (1992), que

localizaram o mRNA de *SBP* especificamente em cotilédones de soja, em início de desenvolvimento. Similarmente, a expressão no nível transcricional de transportadores de sacarose, em batata e *Arabidopsis*, é controlada em função do nível de desenvolvimento do órgão/tecido, seguindo a transição de tecidos-dreno para fonte (Truernit e Sauer, 1995). Outros transportadores possuem padrões de expressão muito específico, relacionados especificamente com tecidos-dreno. O mRNA do transportador AtSUC1 é detectado em grãos de pólen em desenvolvimento, enquanto que a proteína apenas é detectada após a germinação do grão de pólen, indicando um padrão de expressão específico de órgão, induzido pela germinação e controlado a nível de transcrição e tradução (Stadler et al., 1999). No promotor *SBP2*, este padrão de expressão pode estar relacionado com a presença do sítio CAAT box, identificado como alvo para a proteína regulatória tipo CBF-C em *Arabidopsis*, em que a atividade de ligação é regulada por luz, especificidade de órgão e estágio de desenvolvimento (Kusnetsov et al, 1998).

Consistente com seu envolvimento no transporte de açúcares em plantas, o promotor do gene *SBP2* é capaz de responder a alterações da disponibilidade de açúcares no meio de cultura de células de tabaco transgênicas em suspensão (Figura 3). A resposta tanto pode ser modulada pela presença de sacarose ou glicose + frutose (Figura 3A), quanto pela concentração de sacarose disponível (Figura 3B). As rotas de sensoriamento de sacarose podem modular o transporte deste açúcar, em função das alterações de suas concentrações de sacarose, regulando a expressão e a atividade dos transportadores de sacarose nos diferentes órgãos da planta (Chiou e Bush, 1998). Açúcares metabolizáveis normalmente reprimem genes de componentes da fotossíntese, e simultaneamente ativam a expressão de genes específicos envolvidos com o metabolismo dreno (Sinha et al., 2002). O elemento SURE, essencial para a indução gênica em resposta à sacarose em alguns genes, foi identificado na posição -182 a -174, da região promotora do gene da patatina (Grierson et al., 1994). Na posição -185 a -183 do promotor *SBP2* foi identificado um sítio do tipo SURE, muito similar ao contexto encontrado no gene da patatina (Figura 1A). Elementos tipo SURE também foram identificados nos promotores dos genes da esporamina e  $\beta$ -amilase de batata, que também são induzidos por sacarose (Ishiguro et al., 1992) e no

promotor do gene *rbc52* de *Phaseolus vulgaris*, que responde diferencialmente à presença de sacarose ou glicose e frutose (Urwin e Jenkins, 1997). A presença do elemento SURE, possivelmente relacionado com a dinâmica de resposta do promotor *SBP2* à disponibilidade de sacarose, demonstra a existência de uma rota regulatória específica de sacarose. Esta rota foi demonstrada em folhas destacadas e discos foliares de beterraba, onde a atividade do sistema de transporte de sacarose foi inibida com a adição de 100 mM de sacarose. Este efeito, específico para sacarose em órgãos-fonte e dependente da concentração, foi correlacionado com alterações ao nível de transcrição e mostrou ser reversível quando alteradas as concentrações de açúcar (Chiou e Bush, 1998). Adicionalmente, o fator que se liga ao sítio CCAAT box, um ativador transcricional, é expresso em folhas sob autotrofia, mas não sob heterotrofia, possivelmente relacionado com genes envolvidos no metabolismo energético na planta (Edwards et al., 1998). O promotor *SBP2* possui dois sítios do tipo CCAAT, localizados nas posições -558 a -554 e -339 a -335, potencialmente atuando no controle da expressão de *SBP2*.

Plantas transgênicas contendo construções quiméricas com deleções do promotor *SBP2*, fusionadas ao gene repórter *GUS* (Figura 1B), apresentaram padrões diferentes de expressão da enzima GUS, quando comparadas à expressão controlada pelo promotor inteiro (Figura 4, A e B). A expressão gênica, em regiões diferentes do promotor, é controlada pela interação entre um conjunto de elementos em *cis*, positivos e negativos. Os fragmentos de 131 pb (-131p*SBP2-GUS*) e o de 363 pb (-363p*SBP2-GUS*) apresentam níveis de expressão bastante superiores daquele verificado com o transformante -2000p*SBP2-GUS* (Figura 4A e 4B). Esta maior taxa nos níveis de transcrição pode estar relacionada com a ausência de elementos silenciadores ou a presença, além dos elementos basais de transcrição, de dois potenciais sítios de ativação transcricional, um CAAT box e um DOF/PBF, *upstream* ao TATA box (Kusnetsov et al., 1999; Mena et al., 1998). O fator DOF nesta construção se encontra associado ao TATA box, existindo a possibilidade de competição alostérica entre eles para a ligação dos fatores associados. Assim sendo, a localização desses sítios pode estar relacionada com um tipo de controle competitivo da transcrição, quanto à montagem do aparato basal da transcrição, ou também significar que este sítio DOF não é ativo. Esta segunda

hipótese é mais provável, suportada pelo fato dos transformantes -131p*SBP2-GUS* falharem na expressão do gene repórter no meristema radicular (Figura 5P). A ligação da proteína regulatória da classe DOF específica do meristema radicular, NtBBF1, é essencial para a expressão do promotor *rolB* no meristema radicular de plantas de tabaco transgênicas (Baumann et al., 1999). Adicionalmente, a construção -363p*SBP2-GUS* possui em sua seqüência um sítio DOF adicional, mostrando uma forte coloração no meristema radicular. Esta é uma forte evidência que a construção -131p*SBP2-GUS* falha na ligação de um fator DOF, possivelmente NtBBF1, em plantas de tabaco transgênicas, mostrando que o sítio não é ativo.

A construção -363p*SBP2-GUS* mostrou um padrão com alto nível de expressão (Figuras 4A e 4B), em todos os tecidos dos órgãos analisados (Figuras 5C, 5G, 5K e 5O), possivelmente relacionado com a presença de elementos positivos adicionais em sua seqüência e a ausência de elementos negativos (Figura 1A). Além do sítio ativador CAAT box na posição -114 a -111, outros dois sítios ativadores estão presentes nesta seqüência, um CCAAT box (-339 a -335) e um elemento DOF (-322 a -299). O elemento CCAAT possivelmente atua como um ativador transcricional, pois plantas cultivadas sob autotrofia mostram altos níveis de expressão do fator ativador que se liga a CCAAT (Edwards et al., 1998). Além disto, os sítios DOF são uma classe bem conhecida de ativadores transcricionais, altamente conservados no reino vegetal e possuem uma função fundamental na expressão de diversos genes de plantas (Yanagisawa e Schmidt, 1999). Deste modo, provavelmente o conjunto de elementos positivos, possivelmente atuando em associação, conferem altos níveis de atividade da construção -363p*SBP2-GUS*.

Em contraste com as construções -131p*SBP2-GUS* e -363p*SBP2-GUS*, a construção -489p*SBP2-GUS* dirige a expressão do gene repórter *GUS* com níveis muito baixos em plantas de tabaco transgênicas (Figura 4A e 4B). A expressão foi completamente abolida do meristema apical caulinar e dos tecidos radiculares (Figura 5B e 5N), ficando restrita ao floema interno do caule maduro (Figura 5F) e aos feixes vasculares das folhas (Figura 5J), mostrando um padrão de tecido especificidade mais próximo daquele verificado com o promotor completo (Figura 5E e 5I). O fragmento de 489 pb contém em sua seqüência três sítios DOF adicionais, além de um sítio O2 e um sítio GCN4,

envolvidos com o padrão de tecido-especificidade em diversos genes de plantas (Yanagisawa e Sheen, 1988; Yanagisawa e Schmidt, 1999; Vicente-Carbajosa et al., 1997; Mena et al., 1998). Em *Arabidopsis* foram identificados pelo menos 40 genes para fatores DOF. O fator DOF de *Arabidopsis*, DAG1, é expresso especificamente no floema da semente, e está envolvido com a expressão de genes específicos do floema durante a germinação da semente (Papi et al., 2002). Em plantas de milho, foram estimadas de 10 a 20 cópias de genes de fatores do tipo DOF por *Southern blot*, sendo que pelo menos a interação entre dois deles é bem caracterizada, DOF1 e DOF2 (Yanagisawa e Schmidt, 1999). O fator DOF1 atua como um ativador da transcrição, enquanto que DOF2 atua como um repressor, com afinidade para os mesmos sítios, reprimindo a transcrição por competição pela ligação ao sítio alvo. O padrão de expressão tecido-específico dos genes controlados pelos fatores DOF1/DOF2 é uma função da razão de expressão entre estes dois fatores, nos diferentes tecidos. Por exemplo, em folhas, DOF2 é expresso em baixos níveis e DOF1 é expresso de modo constitutivo, ativando a expressão dos genes controlados, enquanto que altos níveis de DOF2 impedem a expressão dos genes controlados em caules e raízes (Yanagisawa e Sheen, 1988). Deste modo, os fatores DOF sozinhos podem controlar o padrão de tecido-especificidade de alguns genes de plantas, em que razões de expressão diferentes dos fatores relacionados, num mecanismo de interação competitiva, podem modular o efeito da ativação transcricional.

De maneira similar, os fatores DOF também podem interagir com outros fatores não relacionados, que se ligam a sítios próximos. A proteína OBP1 de *Arabidopsis*, um fator tipo DOF, foi isolada com base na sua interação proteína-proteína com o fator bZIP que se liga ao sítio ocs (Zhang et al., 1995). Um fator DOF do endosperma de milho, PBF (*prolamin-box binding factor*), interage com a o fator Opaque2 (O2), do tipo bZIP, que ativa a expressão dos genes das zeínas especificamente no endosperma. O2 e PBF são co-expressos especificamente no tecido do endosperma e possuem padrões idênticos de acúmulo temporal durante o desenvolvimento do endosperma (Vicente-Carbajosa et al., 1997). Outro exemplo da interação dos fatores DOF em milho, controlando o padrão tecido-específico, é a interação do fator PBF com o fator GLM, um fator tipo GCN4. A interação positiva entre estes dois elementos é

necessária para altos níveis de expressão dos genes das prolaminas no endosperma. PBF sozinho ativa a transcrição, mas a máxima expressão é obtida quando ocorre a interação entre PBF e GLM (Müller et al., 1995). Como os fatores DOF são específicos de plantas e estão presentes em praticamente todas as espécies estudadas até o momento, parece que eles possuem um papel muito importante na regulação gênica tecido-específica em plantas, o que inclui o promotor *SBP2*. A seqüência do promotor *SBP2* possui um total de sete sítios DOF, possivelmente sendo seis funcionais, um sítio tipo O2 e um sítio tipo GCN4, adjacentes aos sítios DOF, em um contexto muito similar àquele descrito em outros genes, controlados pela interação destes fatores. Na construção -489p*SBP2*-*GUS*, parece que a presença dos sítios DOF adicionais, com uma possível interação com os sítios tipo O2 e/ou GCN4, provocam uma alteração drástica no padrão de expressão tecido-específico, restringindo a expressão para o floema do caule (Figura 5F) e o tecido vascular da folha (Figura 5J), chegando a abolir completamente a expressão no meristema apical caulinar e em raízes (Figura 5B e 5N). Estes resultados sugerem a existência de um sistema de controle transcricional associado à ligação de fatores DOF, com uma possível cooperação de outros fatores não relacionados, identificados em outras plantas.

O padrão de expressão do promotor *SBP2* de soja, em plantas de tabaco transgênicas, é consistente com o padrão esperado para um gene de um transportador de sacarose. O promotor controla um padrão de expressão dinâmico, altamente regulado nos diferentes órgãos da planta e capaz de responder a alterações da disponibilidade de sacarose na planta. Adicionalmente tem um padrão de expressão específico do floema, controlado por um sistema complexo de expressão gênica. Em soja, parece ser expresso especificamente no floema, durante o início do desenvolvimento da semente, um órgão-dreno forte neste estágio de desenvolvimento (Grimes et al., 1992). Neste caso, outros fatores específicos da planta de soja, como o fator R52, responsável pela expressão específica de semente, dos genes das lectinas (Jofuku et al., 1987), podem estar envolvidos, restringindo a expressão no floema dos cotilédones de soja.

## Referências Bibliográficas

- Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiol** 126, 1042-1054, 2001.
- Arp, W.J., Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub>. **Plant Cell Environ** 14, 869-875, 1991.
- Assmann, S.M. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. **Plant Cell**, S355-S373, 2002.
- Baumann, K., De Paolis, A., Costantino, P., Gualberti, G. The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the *rolB* oncogene in plants. **Plant Cell** 11, 323-334, 1999.
- Barker, L., Kühn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J.M., Frommer, W.M. SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. **Plant Cell** 12, 1153-1164, 2000.
- Behnke, H. Structure of the phloem. In: Baker D, Milburn J, eds. **Transport of photoassimilates**. Harlow: Longman Scientific, 1989.
- Bick, J.A., Neelam, A., Smith, E., Nelson, S.J., Hall, J.L., Williams, L.E. Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*. **Plant Mol Biol** 38, 425-435, 1998.
- Blackwood, E.M., Kadonaga, J.T. Going the distance: A current view of enhancer action. **Science** 281, 60-63, 1998.
- Boles, E., Hollenberg, C.P. The molecular genetics of hexose transport in yeast. **FEMS Microbiol Rev** 21, 85-111, 1997.
- Bürkle, L., Hibberd, J.M., Quick, W.P., Kühn, C., Hirner, B., and Frommer, W.B. The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sucrose export from tobacco leaves. **Plant Physiol** 118, 59-68, 1998.
- Bush, D.R. Sugar transporters in plant biology. **Curr Opin Plant Biology** 2, 187-191, 1999.
- Buzeli R.A.A., Cascardo J.C.M., Rodrigues L.A.Z., Andrade M.O., Loureiro M.E., Otoni W.C., Fontes E.P.B. Tissue-specific regulation of *Bip/Grp78*

- genes: a cis-acting regulatory domain is required for *BiP* promoter activity in plant meristems. **Plant Mol Biol** 50, 757-771, 2002.
- Cereghino, G.P., Scheffler, I.E. Genetic analysis of glucose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: control of transcription versus mRNA turnover. **EMBO J** 15, 363-374, 1996.
- Cheng, W., Taliercio, E.W., Chourey, P.S. Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. **Proc Natl Acad Sci USA** 96, 10512-10517, 1999.
- Chiou, T.J., Bush, D.R. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. **Proc Natl Acad Sci USA** 95, 4784-4788, 1998.
- Contim, L.A.S., Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Clarindo, W.R., Loureiro, M.E., Carvalho, C.R., Fontes, E.P.B. The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number and tissue-specific expression. **Gene**, submetido em 25/09/2002.
- Curtis, P.S., Vogel, C.S., Pregitzer K.S., Zak, D.R., Teeri, J.A. Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO<sub>2</sub> on leaf area growth and carbon gain physiology in *Populus x euramericana* (Dodc) Guinier. **New Phytol** 129, 253-263, 1995.
- Delrot, S., Atanassova, R., Maurousset, L. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. **Biochim Biophys Acta** 1465, 281-306, 2000.
- Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Pedra, J.H.F., Matrangolo, F.S.V., Macêdo, J.N.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. A sucrose binding protein homologue from soybean affects sucrose uptake in transgenic tobacco suspension-cultured cells. **Plant Physiol Biochem** 38, 353-361, 2000.
- Dijkwel, P.P., Huijser, C., Weisbeek, P.J., Chua, N.H., Smeekeens, S.C.M. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 9, 583-595, 1997.
- Edwards, D., Murray, J.A.H., Smith, A.G. Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 117, 1015-1022, 1998.

- Efrat, S., Tal, M., Lodish, H.F. The pancreatic  $\beta$ -cell glucose sensor. **Trends Biochem Sci** 19, 535-538, 1994.
- Esaú, K. 1969. The phloem. In: Zimmermann W, Ozenda P, Wulf H, eds. **Encyclopedia of Plant Anatomy**. Berlin: Borntraeger. 1965.
- Flügge, U., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F. The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. **EMBO J** 8, 39-46, 1989.
- Frommer, W.B., Ninnemann, O. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. **Annu Rev Plant Phys** 46, 419-444, 1995.
- Gancedo, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol Mol Biol Rev** 62, 334-361, 1998.
- Graham, I.A., Denby, K.J., Leaver, C.J. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene repression in cucumber. **Plant Cell** 6, 761-772, 1994.
- Graham, I.A. Carbohydrate control of gene expression in higher plants. **Res Microbiol** 147, 572-580, 1996.
- Gribnau, J., de Boer, E., Trimborn, T., Wijgerde, M., Milot, E., Grosveld, F., Fraser, P. Chromatin interaction mechanism of transcriptional control in vivo **EMBO J** 17, 6020–6027, 1998.
- Grierson, C., Du, J-S., Zabala, M.T., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M., Bevan, M. Separate *cis* sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. **Plant J** 5, 815-826, 1994.
- Griffin, K.L., Seemann, J.R. Plants, CO<sub>2</sub> and photosynthesis in the 21<sup>st</sup> century. **Chem Biol** 3, 245-254, 1996.
- Griggs, D.W., Johnston, M. regulated expression of the GAL4 activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. **Proc Natl Acad Sci USA** 88, 8597-8601, 1991.
- Grimes, H. D., Overvoorde, P. J., Hipp, K. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **Plant Cell** 4, 1561-1574, 1992.

- Gubler, F., Raventos, D., Keys, M., Watts, R., Mundy, J., Jacobsen, J.V. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. **Plant J** 17, 1-9, 1999.
- Halford, N.G., Purcell, P.C., Hardie, D.G. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? **Trends Plant Sci** 4, 117-120, 1999
- Hardie, D.G., Carling, D., Carlson, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annu Rev Biochem** 67, 821-855, 1998.
- Harms, K., Wöhner, R.V., Schulz, B., Frommer, W.B. Isolation and characterization of P-type H<sup>+</sup>-ATPase genes from potato. **Plant Mol Biol** 26, 979-988, 1994.
- Heim, U., Wang, Q., Kurz, T., Borisjuk, L., Golombek, S., Nelbohn, B., Adler, K., Gahrtz, M., Sauer, N., Weber, H., Wobus, U. Expression patterns and subcellular localization of a 52 KDa sucrose-binding protein homologue of *Vicia faba* (VfSBPL) suggest different functions during development. **Plant Mol Biol** 47: 461-474, 2001.
- Heineke, D., Wildenberg K., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Heldt, H.W. Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: studies with transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplast. **Planta** 194: 29-33, 1994.
- Ho, S-L., Chao, Y-C., Tong, W-F., Yu, S-M. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. **Plant Physiol** 125, 877-890, 2001.
- Ishiguro, S., Nakamura, K. The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. **Plant Mol Biol** 14, 995-1006, 1992.
- Jang, J.C., León, P., Zhou, I., Sheen, J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. **Plant Cell** 9, 5-19, 1997.
- Jang, J.C., Sheen, J. Sugar sensing in higher plants. **Plant Cell** 6, 1665-1679, 1994.
- Jang, J.C., Sheen, J. Sugar sensing in higher plants. **Trends Plant Sci** 2, 169-174, 1997.

- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M. *GUS*-fusions:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J** 6, 3901-3907, 1987.
- Jofuku, K.D., Okamoto, J.K., Goldberg, R.B. Interaction of an embryo DNA binding protein with a soybean lectin gene upstream region. **Nature** 328, 734-737, 1987.
- Koch, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annu Rev Plant Physiol** 47, 509-540, 1996.
- Krapp, A., Holfmann, B., Schafer, C., Stitt, M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis. **Plant J** 3, 817-828, 1993.
- Kühn, C., Quick, W.P., Schulz, A., Sonnewald, U. & Frommer, W.B. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. **Plant Cell Environ** 19, 1115-1123, 1996.
- Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R., Frommer, W.B. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. **Science** 275, 1298-1300, 1997.
- Kusnetsov, V., Herrmann, R.G., Kulaeva, O.N., Oelmüller, R. Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expression of the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase. **Mol Gen Genet** 259, 21-28, 1998.
- Kusnetsov, V., Landsberger, M., Meurer, J., Oelmüller, R. The assembly of the CAAT-box binding complex at a photosynthesis gene promoter is regulated by light, cytokinin, and the stage of the plastids. **J Biol Chem** 274, 36009-36014, 1999.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrich, J.W., Frommer, W.B., Ward, J.M. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. **Plant Cell** 11, 707-726, 1999.
- Lu, J.M.Y., Bush, D.R. His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 95, 9025-9030, 1998.
- Martin, T., Hellman, H., Schmidt, R., Wilmitzer, L., Frommer, W.B. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. **Plant J** 11, 53-62, 1997.

- McCabe, D. E.; Swain, W. F.; Martinell, B. J.; Christou, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. **Biotechnology** 6, 923-926, 1988.
- McElroy, M.B., Climate of the earth: an overview. **Environ Pollut** 83: 3-21, 1994.
- Mena, M., Vicente-Carbajosa, J., Schmidt, R., Carbonero, P. An endosperm-specific Dof protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. **Plant J** 16, 53-62, 1998.
- Müller, M., Muth, J.R., Gallusci, P. Regulation of storage protein synthesis in cereal seeds: developmental and nutritional aspects. **J Plant Physiol** 145, 606-613, 1995.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plantarum** 15: 473-497, 1962.
- Oesterhelt, C., Gross, W. Different sugar kinases are involved in the sugar sensing of *Galdieria sulphuraria*. **Plant Physiol** 128, 291-299, 2002.
- Overvoorde, P. J., Frommer, W.B., Grimes, H. D. A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. **Plant Cell** 8, 271-280, 1996.
- Overvoorde, P. J., Chao, W. S., Grimes, H. D. A plasma membrane sucrose-binding protein that mediates sucrose uptake shares structural and sequence similarity with seed storage proteins but remains functionally distinct. **J Biol Chem** 272, 15898-15904, 1997.
- Papi, M., Sabatini, S., Altamura, M.M., Hennig, L., Schäfer, E., Costantino, P., Vittorioso, P. Inactivation of the phloem-specific Dof zinc finger gene DAG1 affects response to light and integrity of the testa of *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiol** 128, 411-417, 2002.
- Pego, J.V., Kortstee, A.J., Huijser, C., Smeekens, S.C.M. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. **J Exp Bot** 51, 407-416, 2000.
- Pedra, J.H.F., Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Contim, L.A.S., Dewey, R.E., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. **Plant Sci** 152: 87-98, 2000.

- Perroud, P.F., Diogon, T., Crevecoeur, M., Greppin, H. Molecular cloning, spatial and temporal characterization of spinach SOGA1 cDNA, encoding an  $\alpha$  subunit of G protein. **Gene** 248, 191-201, 2000.
- Pirovani, C.P., Macêdo, J.N.A., Contim, L.A.S., Fabiana S. V. Matrangelo, F.S.V., Loureiro, M.E., Fontes, E.P.B. A sucrose binding protein homologue from soybean exhibits GTP-binding activity that functions independently of sucrose transport activity. **Eur J. Biochem** 269, 3998-4008, 2002.
- Purcell, P.C., Smith, A.M., Halford, N.G. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose syntase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose syntase transcripts in leaves. **Plant J** 14, 195-202, 1998.
- Rentsch, D., Boorer, K., Frommer, W.B. Structure and function of plasm membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. **J Membrane Biol** 162, 177-190, 1998.
- Roitsch, T., Bittner, M., Godt, D.E. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue-specific expression suggest a rule in sink-source regulation. **Plant Physiol** 108, 285-294, 1995.
- Rook, F., Gorris, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeck, P., Smeekens, S. Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. **Plant J** 15, 253-263, 1998.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., Frömmer, W. B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **EMBO J** 11, 4705-4713, 1992.
- Riesmeier, J. W., Hirner, B., Frömmer, W. B. Expression of the sucrose transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. **Plant Cell** 5, 1591-1598, 1993.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., and Frommer, W.B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **EMBO J** 13, 1-7, 1994.
- Ripp, K. G., Viitanen, P. B., Hitz, W. D. L. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiol** 88, 1435-1445, 1988.

- Rose, M., Albig, W., Entian, K.D. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinase PI and PII. **Eur J Biochem** 199, 511-518, 1991.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, E. F. T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 3v.
- Schulze, W., Weise, A., Frommer, W.B., Ward, J.M. Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. **FEBS Lett** 485, 189-194, 2000.
- Sheen, J., Feedback-control of gene-expression. **Photosynth Res** 39, 427-438, 1994.
- Shen, Y., Tye, B.K. The yeast Mcm1 protein is regulated posttranscriptionally by the flux of glycolysis. **Mol Cell Biol** 15, 4631-4639, 1995.
- Sinha, A.K., Hofmann, M.G., Römer, U., Köckenberger, W., Elling, L., Roitsch, T. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. **Plant Physiol** 128, 1480-1489, 2002.
- Smeekens, S., Rook, F. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. **Plant Physiol** 115, 7-13, 1997.
- Stadler, R., Truernit, E., Gahrtz, M., Sauer, N. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. **Plant J** 19, 269-278, 1999.
- Stitt, M. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plant Cell Environ** 14: 741-762, 1991.
- Stitt, M., Krapp, A., Klein, D., Roper-Schwarz, U., Paul, M. **Carbon partitioning and source-sink interactions in plants, corrents topics in plant physiology**, eds. Madore, M.A., Lucas, W.J. (Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD), vol. 13, pag 68-77, 1995.
- Stitt, M. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. **Plant Cell** 8, 565-571, 1996.
- Taiz, L., Zeiger, E. **Plant physiology**. Second Edition. By Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA, 1998. 792p.
- Tegeder, M., Wang, X.D., Frommer, W.B., Offler, C.E., Patrick, J.W. Sucrose transporter into developing seeds of *Pisum sativum* L. **Plant J** 18, 151-161, 1999.

- Thomaz, B.R., Rodriguez, R.L. Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. **Plant Physiol** 106, 1235-1239, 1994.
- Thorne, J.H. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. **Annu Rev Plant Phys** 36, 317-343, 1985.
- Thevelein, J.M., Hohmann, S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? **Trends Biochem Sci** 20, 3-10, 1995.
- Truernit, E., Stadler, R., Baier, K., Sauer, N. A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. **Plant J** 17, 191-201, 1999.
- Truernit, E., Sauer, N., The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of  $\beta$ -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. **Planta** 196, 564-570, 1995.
- Tung, K.S., Norbeck, L.L., Nolan, S.L., Atkinson, N.S., Hopper, A.K. *SRN1*, a yeast gene involved in RNA processing, is identical to HEX2/REG1, a negative regulator in glucose repression. **Mol Cell Biol** 12, 2673-2680, 1992.
- Ullmann, A. Catabolite repression: a story without end. **Res Microbiol** 147, 455-458, 1996.
- Urwin, N.A.R., Jenkins, G.I. A sucrose repression element in the *Phaseolus vulgaris rbcS2* gene promoter resembles elements responsible for sugars stimulation of plant and mammalian genes. **Plant Mol Biol** 35, 929-942, 1997.
- van Bel, A.J.E. Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons. **J Exp Bot** 47, 1129-1140, 1996.
- van Bel A.J.E., Gamalei, Y.V. Ecophysiology of phloem loading in source leaves. **Plant Cell Environ** 15, 265-270, 1992.
- Van Oosten, J.J., Besford, R.T. Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO<sub>2</sub>: rapid downregulation of RuBisCO small subunit transcripts, but not of the large subunit transcripts. **J Plant Physiol** 143, 306-312, 1994.

- Van Oosten, J.J., Besford, R.T. Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO<sub>2</sub>: rapid downregulation of RuBisCO small subunit transcripts, but not of the large subunit transcripts. **J Plant Phystol** 143: 306-312, 1995.
- Vicente-Carbajosa, J., Moose, S.P., Parsons, R.L., Schmidt, R.J. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. **Proc Natl Acad Sci USA** 94, 7685-7690, 1997.
- Ward, J.M., Kühn, C., Tegeder, M., Frommer, W.B. Sucrose transporter in higher plants. **Int Rev Cytol** 178, 41-71, 1998.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N., Wobus, U., A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in *Faba bean* seeds. **Plant Cell** 9: 895-908, 1997.
- Weber, H., Golombek, S., Heim, S., Borisjuk, L., Panitz, R., Manteuffel, R., Wobus, U. Integration of carbohydrate and nitrogen metabolism during legume seed development: implications for storage product synthesis. **J Plant Physiol** 152, 641-648, 1998.
- Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neubohn, B., Weber, H., Wobus, U. Sucrose transporter into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. **Plant J** 21, 455-467, 2000.
- Williams, L.E., Lemaoine, R., Sauer, N. Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. **Trends Plant Sci** 5, 283-290, 2000.
- Wullschleger S.D., Norby, R.J., Hendrix, D.L. Carbon exchange rates, chlorophyll content, and carbohydrate status of two forest tree species exposed to carbon dioxide enrichment. **Tree Phystol** 10: 21-31, 1992.
- Yanagisawa, S., Schmidt, R.J., Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. **Plant J** 17, 209-214, 1999.
- Yanagisawa, S., Sheen, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. **Plant Cell** 10, 75-99, 1988.

- Ylstra, B., Garrido, D., Busscher, J., van Tunen, A.J.B. Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. **Plant Physiol**, 118, 297-304, 1998.
- Yokohama, R., Hirose, T., Fujii, N., Aspuria, E.T., Kato, A., Uchimiya, H. The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* RI plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. **Mol Gen Genet** 244, 15-22, 1997.
- Zhang, B., Chen, W., Foley, R., Büttner, M., Singh, K. Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. **Plant Cell** 7, 2241-2252, 1995.
- Zimmer, T., Ohkuma, M., Ohta, A., Takagi, M., Schunck, W.B. The *CYP52* multigene family of *Candida maltosa* encodes functionally diverse n-alkane-inducible cytochromes P-450. **Biochem Bioph Res Co** 224, 784-789, 1996.

## Resumo e Conclusões Gerais

Recentemente, um novo membro da família gênica *SBP* da soja foi isolado e designado *S64* ou *SBP2*. A análise comparativa das seqüências dos cDNAs *SBP2* e *SBP* revelou 91% de identidade, evidenciando uma relação funcional/evolutiva estreita entre estes genes. Existe uma conservação de seqüência moderada entre *SBP* e proteínas tipo vicilinas, provavelmente originada como resultado de uma evolução divergente, derivada de uma proteína ancestral comum.

O cDNA *SBP2* foi utilizado como sonda para o screening em uma biblioteca genômica de soja e dois clones positivos foram isolados, *pgS641.1* e *pgS641.2*. O clone *pgS641.1* corresponde ao gene completo, contendo a região promotora 5', a região codificadora e a extremidade terminadora 3', enquanto que o clone *pgS641.2* corresponde a um fragmento do gene, contendo um sítio para a enzima *EcoRI* no interior da região codificadora. O alinhamento das seqüências entre os dois clones genômicos revelou que eles correspondem a formas alélicas do mesmo gene. Com exceção do sítio *EcoRI* presente no clone *pgS641.2*, o restante das seqüências entre os dois clones são idênticas, incluindo a região promotora.

O número de cópias do gene *SBP2* em soja foi estimado por meio de Southern blot e FISH (hibridização *in situ* fluorescente), utilizando o cDNA de *SBP2* e o clone genômico *pgS641.2* como sondas, em núcleos interfásicos de soja. O padrão de hibridização obtido corresponde a duas cópias gênicas, com alta homologia entre si, provavelmente correspondendo aos genes *SBP* e *SBP2*. Coletivamente, estes dados caracterizam a família *SBP* como uma família gênica pequena, composta por apenas dois componentes distintos em soja, podendo estar envolvida em um processo fisiológico muito específico.

A funcionalidade da seqüência promotora do gene *SBP2* foi verificada através da utilização de genes repórteres. Os genes *GUS* e *GFP* foram fusionados à região promotora *SBP2*, de aproximadamente 2 kb, e essas construções foram utilizadas para transformação de plantas de tabaco. O ensaio histoquímico de *GUS* e a detecção fluorescente de *GFP* demonstraram

que o promotor *SBP2* dirige a expressão dos genes repórteres especificamente para o floema de todos os órgãos analisados nas plantas transgênicas de tabaco. Entretanto, altos níveis de expressão foram observados predominantemente no meristema apical caulinar e em folhas-dreno (folhas jovens), contrastando com os baixos níveis de expressão observados em folhas maduras, caule e raiz. Estes resultados indicam que o promotor de *SBP2* está sujeito à regulação temporal, associada com o estágio de desenvolvimento do órgão. Adicionalmente, foi observado que o promotor *SBP2* regula a expressão do gene repórter *GUS* de modo dependente do tipo e da concentração de açúcar disponível no meio de cultura de células em suspensão de tabaco transgênico. Coletivamente estes resultados indicam que o promotor *SBP2* possui um padrão de expressão coerente com seu envolvimento no metabolismo ou translocação de sacarose.

Deleções do promotor *SBP2* foram fusionadas ao gene repórter *GUS* e sua atividade foi quantificada por ensaios fluorimétricos nas plantas transgênicas, permitindo a identificação de regiões do promotor que possuam em sua seqüência elementos regulatórios em *cis*, positivos e negativos. Ensaios histoquímicos com plantas transgênicas contendo as construções quiméricas com as deleções do promotor demonstraram que o padrão tecido-específico do gene *SBP2* é coordenado pela interação entre os elementos regulatórios positivos e negativos. A região contida entre as posições -2000 e -490 possui elementos positivos que potencializam a expressão no floema, uma vez que a deleção dessa região causou um decréscimo substancial na atividade do promotor. A deleção adicional do promotor até a posição -364 restaurou a atividade do promotor em todos os tecidos analisados. Como conseqüência, a atividade quantitativa de *GUS* foi muito superior àquela observada para o promotor intacto. Estes resultados indicam a presença de pelo menos um elemento silenciador, na região delimitada pelas posições -489 a -364. Além disso, a região de -363 a -132 possui um elemento positivo, responsável pela expressão no meristema radicular, uma vez que a deleção deste fragmento silencia a expressão de *GUS* no meristema radicular. O padrão de expressão tecido-específico, das construções quiméricas das deleções do promotor, se correlaciona com a distribuição dos elementos *DOF* na seqüência do promotor, em associação com os elementos *O2* e *GCN4*.

Deste modo, o promotor *SBP2* se apresenta como uma poderosa ferramenta biotecnológica para uso em plantas transgênicas. O padrão de tecido especificidade e a flexibilidade para manipulação dos níveis de expressão pelo uso de deleções no promotor *SBP2*, permite sua utilização no controle da expressão transgênica para fins de engenharia genética de plantas.