

REJANE DO LIVRAMENTO FREITAS

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES NO PROMOTOR DO GENE  
*SBP2 (SUCROSE BINDING PROTEIN)* DE SOJA QUE  
CONFEREM EXPRESSÃO ESPACIAL ESPECÍFICA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

REJANE DO LIVRAMENTO FREITAS

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES NO PROMOTOR DO GENE  
*SBP2 (SUCROSE BINDING PROTEIN)* DE SOJA QUE  
CONFEREM EXPRESSÃO ESPACIAL ESPECÍFICA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia Vegetal, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de março de 2007

---

Prof<sup>a</sup> Andréa Miyasaka de Almeida  
(Co-orientadora)

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro  
(Co-orientador)

---

Prof. Luciano Gomes Fietto

---

Claudine Márcia Carvalho

---

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

*Aos grandes tesouros da minha vida:  
meus pais, Honório e Simone,  
e meus irmãos Rhonan, Riani e Ramon.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela presença constante. Obrigada, Senhor, por iluminar meus passos e me sustentar nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso. Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, professor Rolf Puschmann, às secretárias Beth e Cássia. Aos professores do departamento, pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação, competência e confiança em meu trabalho.

Aos professores Andréa Miyasaka de Almeida e Marcelo Ehlers Loureiro, pela co-orientação e pela colaboração dada ao trabalho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu atingisse meus objetivos. Devo a vocês mais essa conquista. Aos meus irmãos, pelo amor, carinho e apoio. Em especial ao Riani, pela convivência diária, paciência e compreensão.

Ao Alessandro Jaquiel Waclawovsky, pelos ensinamentos durante a Iniciação Científica. Obrigada pela boa convivência, compreensão, profissionalismo, respeito e, principalmente, pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Purificação e Expressão de Proteínas, pelo agradável convívio, amizade e colaboração para obtenção dos resultados. Em especial, ao Max e ao Pedro, pela ajuda na extração de RNA e no *Real-Time PCR*, e à Claudine, pela contribuição nos experimentos com o microscópio confocal.

À amiga Carol, pela ajuda nos experimentos, pelo agradável convívio e por dividir comigo não apenas a bancada, mas também minhas alegrias e tristezas.

Aos funcionários Serafim, Marlene e Renata, pela presteza.

Ao amigo Breno, pelo excelente convívio, apoio, pelas risadas e pela companhia nos estudos.

Aos colegas do curso de Fisiologia Vegetal. Aos amigos da Bioquímica 2001.

Aos professores da Anatomia Vegetal, Wagner e Luzimar, pela valorosa ajuda e sugestões.

Ao professor Luciano Gomes Fietto, pela ajuda e atenção.

À Wânia, funcionária da Anatomia Vegetal, pela ajuda.

Aos funcionários das estufas de soja e ao Newton, pela presteza.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos, na pessoa do professor Wagner Otoni.

Às antigas companheiras de república, Cassiana, Paula e Vanessa, que se tornaram minhas irmãs em Viçosa, pelo carinho e amizade.

Aos amigos, em especial à Francianne, Aline e Juliana, que, mesmo distante, estiveram sempre por perto, me apoiando.

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

REJANE DO LIVRAMENTO FREITAS, filha de Honório José Vicente Neto e Simone do Livramento Moreira Neto, nasceu no dia quinze de junho de 1983, em Barroso, MG.

Em março de 2001, ingressou no curso de Bioquímica, na Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em janeiro de 2005.

Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de Plantas.

Em março de 2007, submeteu-se à defesa de sua dissertação.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
Isolamento e seqüenciamento da região distal (-2000 a -700) do promotor do gene <i>SBP2</i> .....	10
Obtenção das construções do promotor <i>SBP2</i> fusionadas ao gene repórter <i>GUS</i> .....	11
Obtenção e seleção de plantas transgênicas.....	13
Análise histoquímica do padrão de expressão de <i>GUS</i> em plantas de tabaco transgênicas.....	14
Ensaio de mudança na mobilidade eletroforética (EMSA).....	14
Obtenção da construção p <i>SBP2</i> : cDNA <i>SBP2</i> : <i>GFP</i> para localização celular da proteína <i>SBP2</i> .....	15
Localização celular de <i>SBP2</i> - <i>GFP</i> .....	17
Análise da expressão dos genes <i>SBP</i> em órgãos de soja.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
Seqüências entre -2000 e -700 são essenciais para a expressão tecido vascular-específica do promotor <i>SBP2</i> .....	20
A região de -2000 a -700 (CRD-A) é capaz de promover a transcrição de <i>GUS</i> , mesmo na ausência de promotor mínimo.....	25
Elementos regulatórios em cis, relacionados à expressão tecido-específica, estão presentes na seqüência do promotor <i>SBP2</i> .....	27
O padrão de tecido-especificidade do promotor <i>SBP2</i> se deve à presença de cis-elementos em diferentes posições.....	30
As seqüências correspondentes aos cis-elementos tecido-específicos são funcionais.....	34
A proteína <i>SBP2</i> está localizada na região de tecido vascular, consistente com seu envolvimento nos processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose.....	37
Os genes <i>SBP</i> são diferencialmente expressos em órgãos de soja....	40
CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## RESUMO

FREITAS, Rejane do Livramento, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Identificação de regiões no promotor do gene *SBP2* (*sucrose binding protein*) de soja que conferem expressão espacial específica.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Orientadores: Andréa Miyasaka de Almeida e Marcelo Ehlers Loureiro.

O promotor do gene *SBP2* (*sucrose binding protein*) de soja é capaz de dirigir a expressão tecido vascular-específica de genes repórteres em plantas transgênicas de tabaco. Esta regulação se deve à presença de domínios cis-regulatórios distais (CRD-A, posição -2000 a -700) presentes no promotor. Neste trabalho, a atividade tecido-específica de CRD-A foi confirmada por meio de experimentos de ganho-de-função, nos quais o fragmento CRD-A foi diretamente fusionado ao gene repórter *GUS* e às construções -136p*SBP2-GUS* e -92p*SBP2-GUS* e sua atividade avaliada no sistema heterólogo de tabaco. CRD-A foi capaz de reduzir a atividade de *GUS* em todos os órgãos analisados, restaurando, em alguns casos, o padrão tecido-específico do promotor completo. Além disso, observou-se que CRD-A é capaz de promover a transcrição de *GUS*, independente de promotor mínimo, indicando a presença de cis-elementos capazes de promoverem a transcrição basal. De fato, nessa região (-2000 a -700) foram identificados vários elementos TATA box, localizados nas posições -790, -783 e -761, que podem potencialmente funcionar como TATA boxes alternativos. No intuito de delimitar os cis-elementos responsáveis pelo padrão tecido-específico do promotor *SBP2*, a seqüência -2000 a -700 foi dividida em cinco fragmentos, os quais foram inseridos na construção -92p*SBP2-GUS*, e utilizados para obtenção de plantas transgênicas. Análises histoquímicas revelaram que todos os fragmentos foram capazes de reduzir a atividade do

promotor *SBP2*, uma vez que sua inserção na extremidade 5' de -92p*SBP2* alterou o padrão de expressão constitutiva do mesmo. Com base nestes resultados, diversas regiões potencialmente regulatórias foram identificadas. A região compreendida entre -1765 e -945 deve conter fortes elementos repressores para o ápice caulinar, capazes de abolir totalmente a atividade do promotor, enquanto que a região entre -944 e -705 demonstrou conter elementos repressores mais fracos, que restringiram a expressão ao tecido vascular. Foram encontrados vários elementos silenciadores para a raiz, tanto para o meristema radicular (região entre -1765 e -705), quanto para a zona de alongamento (de -1765 a -1485 e de -1211 a -945). Além disso, a região de -1765 a -1485 também apresenta um forte repressor para raiz, cujo efeito deve ser atenuado por cis-elementos presentes entre -1485 e -705. Por fim, foi identificado um elemento responsável por restringir a expressão apenas ao floema interno no caule, na região entre -1485 e -1212. A funcionalidade dos cis-elementos identificados foi avaliada através do ensaio de mudança na mobilidade eletroforética (EMSA), tendo sido observada a interação seqüência-específica entre possíveis transfatores presentes em extratos nucleares de soja e de tabaco e o fragmento -1765/-1485 (fragII) de *GmSBP2*. A fim de verificar se o acúmulo da proteína SBP2 correlaciona-se com a atividade do promotor em tecidos específicos, foi obtida a proteína quimérica SBP2-GFP, sob o controle do promotor *SBP2*, em tabacos transgênicos. A análise de fluorescência revelou que a proteína SBP2 está, de fato, localizada na região de tecido vascular, consistente com o padrão de atividade do gene repórter e com seu envolvimento nos processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose.

## ABSTRACT

FREITAS, Rejane do Livramento, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march of 2007. **Identification of regions on the soybean *SBP2* (sucrose binding protein) promoter that confer tissue-specific expression.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Andréa Miyasaka de Almeida and Marcelo Ehlers Loureiro.

The soybean *SBP2* (*sucrose binding protein*) promoter is capable to drive vascular tissue-specific expression of reporter genes in tobacco transgenic lines. This vascular-specific activity of the *SBP2* promoter is confined to a distal region (-2000 to -700 sequences) designated CRD-A (cis-regulatory domain-A). Here, we first confirmed the tissue-specific activity of CRD-A through gain-of-function experiments, in which the CRD-A sequences were directly fused to 5' end of *GUS* cDNA, -136p*SBP2-GUS* and -92p*SBP2-GUS* constructs. In tobacco, CRD-A was able to reduce *GUS* activity in all organs analyzed, recapitulating in some cases the tissue-specific pattern of the full promoter. In addition, CRD-A promoted *GUS* transcription in the absence of the proximal TATA-containing region, which suggests that CRD-A may contain cis-regulatory elements to sustain basal transcription. In fact, this region (-2000 a -700) harbors several TATA box-like sequences, positions -790, -783 and -761, that potentially may function as alternative TATA boxes. To delimit the cis-regulatory elements responsible for the tissue-specific activity of *SBP2* promoter, the -2000 to -700 sequence was divided into five fragments, which were fused to -92p*SBP2-GUS* construct and used to obtain transgenic lines. Histochemical analysis revealed that all the CRD-A sub-fragments reduced the *SBP2* promoter activity, as their fusion to the 5' end of -92p*SBP2* altered its constitutive expression pattern. These results identified the presence of several potentially cis-regulatory domains. The region

encompassing the sequences -1765 to -945 may contain strong shoot apex expression-repressing elements, capable to totally abolish expression, whereas the region -944 to -705 may harbor weaker repressing elements that restricted *GUS* expression to the vascular tissue. We also found several root expression silencers, operating in the root meristem (-1765 to -705) and in the root elongation zone (-1765 to -1485 and -1211 to -945). Furthermore, the region delimited by positions -1765 to -1485 also exhibited a strong root expression-repressing element whose effect may be attenuated by cis-regulatory elements present in the -1485 to -705 region. Finally, a cis-element that confines *GUS* expression to the inner phloem of stem was identified in the region delimited by positions -1485 to -1212. The function of the identified cis-elements was evaluated through electrophoretic mobility shift assay (EMSA) that revealed sequence-specific interactions between putative transactors from soybean and tobacco nuclear extracts and the -1765/-1485 (fragII) fragment from *GmSBP2*. To determine whether the SBP2 protein accumulation correlated with the tissue-specific promoter activity, a SBP2-GFP fusion was expressed in tobacco transgenic lines under the control of *SBP2* promoter. Fluorescence analysis revealed that the SBP2 protein was, indeed, located in the vascular tissue, which was consistent with *SBP2* promoter activity and the involvement of SBP2 in physiological process dependent of sucrose translocation.

## INTRODUÇÃO

Em plantas superiores, a fixação de CO<sub>2</sub> ocorre predominantemente em células do mesofilo de folhas maduras, que agem como exportadores de açúcares, sendo, portanto, conhecidas como “fontes de carbono”. Por outro lado, células heterotróficas, presentes em raiz, estruturas reprodutivas e órgãos de armazenamento, necessitam importar açúcares, sendo conhecidas como “drenos de carbono”. Cerca de 80% do carbono assimilado durante a fotossíntese é exportado, a partir das folhas, para satisfazer as necessidades das células não-fotossintéticas. O transporte de carboidratos a longa-distância entre tecidos fonte e dreno ocorre via floema, o qual apresenta dois tipos celulares, incluindo as células companheiras e os elementos de tubo crivado. Tais células específicas do sistema vascular, chamadas de elementos de tubo crivado, se conectam para formar o tubo crivado, que oferece pouca resistência ao fluxo da seiva (van Bel, 1996). Por sua vez, as células companheiras apresentam uma importante função, no sentido de fornecer energia e proteínas aos elementos de tubo crivado (Williams et al., 2000), já que estes são desprovidos de núcleo, vacúolos e outras organelas (Lucas et al., 1993).

A sacarose representa a principal forma de carboidrato transportada no floema, e tem sido considerada como uma molécula-chave no crescimento, desenvolvimento, armazenamento, transdução de sinal e ajuste a estresses ambientais (Salerno e Curatti, 2003). Além disso, também contribui na geração do gradiente osmótico, importante para dirigir a translocação no floema, através do fluxo em massa (Lalonde et al., 1999). A translocação de sacarose a partir dos locais de síntese (células do mesofilo) para os tecidos dreno envolve o carregamento do floema nos tecidos fonte, o transporte a longa-distância por fluxo em massa e o descarregamento da sacarose, a partir do floema, para os

tecidos dreno (revisado por Frömmer e Sonnevold, 1995). O transporte de sacarose célula-a-célula ocorre simplásticamente, via plasmodesma (van Bel e Gamalei, 1992) ou apoplásticamente, via proteínas transportadoras de sacarose (Lemoine, 2000). A eficiência do descarregamento do floema está fortemente relacionada com a força dreno do órgão, ou seja, com a sua habilidade em atrair fotoassimilados, variando com a espécie, o órgão ou tecido e o estágio de desenvolvimento (Ho, 1988). As células-dreno podem importar sacarose diretamente do apoplasto, via transportadores de sacarose, ou, alternativamente, a sacarose pode ser hidrolisada em glicose e frutose, por invertases da parede celular, e captada via transportadores de monossacarídeos (Williams et al., 2000). A clivagem da sacarose nos tecidos-dreno não apenas cria um gradiente químico, mas também ajuda a manter a diferença de potencial osmótico entre o complexo elemento de tubo crivado - célula companheira (ETC-CC) e as células do parênquima de reserva (Patrick, 1997).

As plantas parecem possuir vários transportadores de sacarose para coordenar o transporte nos diversos tecidos, em diferentes estágios de desenvolvimento e sob várias condições ambientais (Williams et al., 2000). Tais transportadores devem mover os açúcares contra um gradiente, para concentrá-los nos elementos de tubo crivado, estabelecendo condições que proporcionem o mecanismo de translocação do floema. O primeiro transportador de sacarose foi isolado de espinafre, e sua atividade funcional estudada por expressão heteróloga de seu cDNA em *Saccharomyces cerevisiae* (*SoSUT1*; Riesmeier et al., 1992). Isso possibilitou a investigação do papel e da localização dos transportadores de sacarose e a elucidação do mecanismo de carregamento do floema em plantas superiores (Matsukura et al., 2000). Assim, vários outros cDNAs codificadores de co-transportadores H<sup>+</sup>-sacarose foram isolados, dentre eles: *StSUT1* de batata (Riesmeier et al., 1994), *SUC1* e *SUC2* de *Arabidopsis* (Sauer & Stolz, 1994), e *PmSUC1* e *PmSUC2* de *Plantago major* (Gahrtz et al.,

1994). Estes transportadores são proteínas altamente hidrofóbicas, cuja estrutura consiste em dois grupos de seis regiões  $\alpha$ -hélice transmembrana, que se separam por uma alça citoplasmática central (Williams et al., 2000). Sua localização no complexo ETC-CC está, provavelmente relacionada com a sua função, de mediar a captação de sacarose no floema, a partir do apoplasto (Riesmeier et al., 1992; 1993; Kuhn et al., 1996).

Outra proteína, estruturalmente não relacionada aos transportadores de sacarose SUC, que tem sido implicada em processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose, é a *sucrose binding protein* (SBP), inicialmente identificada em cotilédones de soja pela sua capacidade de ligar ao análogo de sacarose, 6'-deoxy-6'-(4-azido-2-hydroxy)-benzamide-sucrose (Ripp et al., 1988). SBP pertence à família bicupim de proteínas, sendo estruturalmente relacionada com as proteínas de reserva do tipo vicilina (Dunwell et al., 2004). Apesar do relacionamento evolucionário entre SBP e proteínas de reserva de sementes, estas proteínas possuem atividades bioquímicas distintas e divergem funcionalmente. SBP de *Glycine max* (GmSBP) liga à sacarose (Rocha et al., 2007), exibindo uma baixa atividade de transporte do dissacarídeo quando expressa em leveduras (Grimes e Overvoorde, 1996; Overvoorde et al. 1996, 1997; Elmer et al., 2003). Além disso, tem sido demonstrado que GmSBP interage com GTP de uma maneira independente de sua atividade de transporte de sacarose e que está envolvida em processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose (Delú-Filho et al., 2000; Pedra et al., 2000; Pirovani et al., 2002). De fato, estudos de repressão de *SBP* em tabaco têm demonstrado alguns fenótipos típicos causados pela inibição de translocação de sacarose entre tecidos fonte e dreno (Riesmeier et al., 1994; Kuhn et al., 1996), como acúmulo de carboidratos nas folhas fonte, inibição de fotossíntese, redução do crescimento e retardo no desenvolvimento, além de reduções significativas do conteúdo de sacarose e hexoses em órgãos dreno (Pedra et al., 2000,

Waclawovsky et al, 2006b). Além disso, a manipulação dos níveis de *SBP* em linhagens de células transgênicas foi correlacionada com a eficiência de absorção de sacarose radioativa pelas células, além de alterar as atividades de hidrólise de sacarose em uma maneira metabolicamente compensatória (Delú-Filho et al., 2000). Contudo, as variações observadas no metabolismo fotossintético, na exportação de sacarose e no crescimento das plantas de tabaco com expressão reduzida de *SBP* foram transientes e restritas à fase vegetativa de desenvolvimento (Waclawovsky et al., 2006b). Esta restrição temporal dos efeitos metabólicos resultantes da repressão de *SBP* indica que provavelmente *SBP* está funcionalmente associada a mudanças temporais da força do dreno e de desenvolvimento, ao invés de estar diretamente associada ao transporte de sacarose das folhas fonte.

*SBP/SBP2* foi localizada na membrana plasmática de células de soja ativamente engajadas no transporte de sacarose, como células do mesófilo de folhas dreno jovens, células companheiras do floema maduro e células de cotilédones em diferenciação (Grimes et al., 1992; Pedra et al., 2000). Embora esteja associada à membrana plasmática, predições com base na estrutura primária indicam que *SBP* é uma proteína hidrofílica, não apresentando domínios hidrofóbicos longos o suficiente para caracterizar um domínio transmembrana (Overvoorde e Grimes, 1994). Tais observações sugerem que *SBP* não é uma proteína integral de membrana e que, apesar de várias evidências apontarem para seu envolvimento no transporte de sacarose (Grimes e Overvoorde, 1996; Pedra et al., 2000; Delú-Filho et al., 2000; Pirovani et al., 2002), ela não realiza esta função independentemente (Grimes et al., 1992).

Análises de eletroforese em gel não-redutor de SDS-poliacrilamida mostraram que as proteínas *SBP* e *SBP2* se organizam em complexos oligoméricos, na forma de dímeros e trímeros (Overvoorde et al., 1997; Pirovani et al., 2002). Além disso, a análise da seqüência deduzida de aminoácidos

revela a presença de um provável peptídeo-sinal, um potencial sítio de glicosilação e um sítio de ligação a nucleotídeos (GTP/ATP). A caracterização bioquímica de SBP2 (Pirovani et al., 2002) demonstrou que o peptídeo-sinal pode apresentar uma dupla função, tanto de endereçamento, quanto de interação com a membrana plasmática. De fato, o peptídeo-sinal corresponde à única região hidrofóbica da proteína, tendo sido verificada sua clivagem parcial *in vivo*, uma vez que a proteína SBP2 foi detectada na fração microsomal de cotilédones de soja (Pirovani et al., 2002). Com relação à atividade de ligação a nucleotídeos, sabe-se que SBP2 apresenta maior afinidade por nucleotídeos de guanina (GTP, GDP), e que sua mutação ocasiona a perda de habilidade de ligação ao nucleotídeo, sem, porém, afetar o transporte de sacarose (Pirovani et al., 2002). Essa ligação de GTP à proteína pode estar relacionada com processos de sinalização celular.

Muitos estudos em plantas têm descrito mudanças na expressão gênica em resposta a alterações nos níveis de carboidratos (Stitt et al., 1991; Krapp et al., 1993; Sheen, 1994; Stitt et al., 1995; Graham, 1996; Koch, 1996). A demonstração de que SBP2 exibe atividade de ligação a GTP (Pirovani et al., 2002), juntamente com sua capacidade de ligar à sacarose (Ripp et al., 1988), sugere que SBP pode exercer um papel regulatório nos processos fisiológicos dependentes da translocação de sacarose em plantas. Embora os fenótipos resultantes da alteração nos níveis de SBP2 em plantas transgênicas suportem essa idéia (Pedra et al., 2000; Delú-Filho et al., 2000), o padrão de acúmulo de açúcar em folhas anti-senso *SBP2* diferiu daquele observado pela repressão anti-senso de  $H^+$ /SUT (Riesmeier et al., 1994). Tal observação sugere que SBP e SUT possuem funções distintas na translocação de sacarose e favorece o argumento de que SBP desempenha um papel regulatório no transporte de sacarose em plantas, por regular a expressão ou atividade de sistemas de captação alternativos (Pirovani et al., 2002; Waclawovsky et al., 2006b).

Consistente com essa hipótese, o aumento nos níveis de SBP2 causou um efeito muito mais intenso sobre a atividade da sintase da sacarose, em detrimento da captação do dissacarídeo propriamente dita (Delú-Filho et al., 2000).

Uma vez que as proteínas associadas à translocação de carboidratos desempenham um papel central no transporte de açúcares através das membranas, sua distribuição ao longo da planta deve ser bastante controlada de forma a garantir um suprimento adequado de açúcares em todos os órgãos-dreno (Williams et al., 2000). Sendo assim, torna-se importante a caracterização completa de seqüências regulatórias de genes envolvidos no transporte de sacarose. Estudos de promotores têm sido acelerados através de técnicas de transformação e regeneração, que permitem a introdução de genes quiméricos em plantas. Esta tecnologia tem fornecido meios de testar seqüências específicas de DNA, em função da sua habilidade em dirigir a expressão gênica em determinados tecidos, estádios de desenvolvimento ou em resposta a condições ambientais. A fim de distinguir entre transcrição de genes modificados e endógenos, genes quiméricos são construídos, contendo a região codificadora de genes repórteres, os quais são facilmente ensaiados, tais como  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*).

Em soja, SBP é codificada por uma pequena família gênica, representada por pelo menos dois genes não-alélicos, *GmSBP1* (GeneBank, acesso - L06038) e *GmSBPS64* (AF191299), também designado *GmSBP2* (Pirovani et al., 2002). Estes genes apresentam extensiva similaridade de seqüência, mas estão localizados em diferentes *loci* no genoma de soja (Contim et al., 2003). Um terceiro cDNA *GmSBP* isolado tem sido chamado também de *GmSBP2* (L06038); ele é 99% idêntico ao gene *GmSBPS64/GmSBP2* previamente isolado e deve representar uma forma alélica (Pirovani et al., 2002; Elmer et al., 2003). Para investigar a ativação transcricional do gene *GmSBP2*, seqüências de 2 kb da extremidade 5' dos clones genômicos *gsS641.1* e

*gsS641.2* foram fusionadas aos genes repórteres *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) e *GFP* (*green fluorescent protein*). O promotor dirigiu a expressão dos genes repórteres com alta especificidade para o floema de folhas, caules e raízes, sendo consistente com o envolvimento de SBP nos processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose (Contim et al., 2003). Posteriormente, foram obtidas várias deleções seriais e internas do promotor, as quais foram também fusionadas ao gene repórter *GUS*, visando identificar seqüências cis-atuantes responsáveis pela ativação e repressão espacialmente reguladas do gene *SBP* (Waclawovsky et al., 2006a). Neste trabalho, foi verificado que a expressão floema-específica do promotor *SBP2* se deve à presença de silenciadores tecido-específicos em seqüências distais (posição -2000 a -700, ou CRD-A), bem como a elementos floema-específicos dentro de seqüências proximais. Além disso, foi demonstrado que a atividade do promotor *SBP2* e sua tecido-especificidade são coordenadas por módulos combinatórios positivos e negativos, que interagem entre si de uma maneira complexa.

A regulação espacial dos genes repórteres *GmSBP2-GUS* e *GmSBP2-GFP* (Contim et al., 2003; Waclawovsky et al., 2006a) reproduziu, de uma maneira precisa, o acúmulo de SBP que tem sido observado nas células do floema de folhas de soja (Grimes et al., 1992). Similarmente, em espinafre, um homólogo de SBP foi imunolocalizado na membrana plasmática dos elementos do tubo crivado de folhas completamente expandidas, raízes e partes aéreas (Warmbrodt et al., 1989; 1991). Entretanto, o acúmulo de GmSBP no tecido vascular de órgãos vegetativos tem sido questionado recentemente em *immunoblottings* de proteínas de soja, usando anticorpos preparados contra uma versão truncada de GmSBP1 expressa em *E. coli* (Elmer et al., 2003). Baseado na especificidade do anticorpo, foi observado que a família GmSBP acumula exclusivamente no cotilédone, sendo resolvida em quatro polipeptídeos de pontos isoelétricos (pI) distintos, identificados em *immunoblottings* de géis

bidimensionais. Em contraste, perfilações proteômicas de extratos de sementes de soja em desenvolvimento, com base em análises de espectrometria de massa, identificaram pelo menos 15 isoformas de SBP (pI 5,1–8,0), que podem representar isoformas genéticas e formas de SBP diferentemente processadas, pós-transcricional ou pós-traducionalmente (Hajdich et al., 2005). Esta discrepância aparente no número de isoformas de SBP-*like*, identificadas em sementes de soja pelos experimentos distintos de eletroforese bidimensional, pode ser parcialmente explicada pela falha do anticorpo em reconhecer todos os membros da família de SBP (Elmer et al., 2003; Hajdich et al., 2005). Consistente com esta hipótese, a análise da atividade do promotor de *SBP2* em tabaco tem fornecido evidência indireta de que SBP é expressa no complexo elemento de tubo crivado-célula companheira (ETC-CC) do floema de órgãos vegetativos, como raiz, caule e folha (Contim et al., 2003; Waclawovsky et al., 2006a). Entretanto, estes resultados, baseados na expressão de fusões transcricionais de genes repórteres com o promotor *SBP2* em plantas transgênicas, não permitem eliminar a possibilidade que o acúmulo da proteína SBP2 nos tecidos de soja possa ser diferente do padrão de atividade do gene repórter, devido à ausência de elementos regulatórios transcricionais e/ou de controle pós-traducional. Esta segunda possibilidade poderia ser resolvida pela expressão da proteína quimérica SBP-GFP sob o controle do promotor *SBP2*, em tabacos transgênicos, e subsequente determinação da localização celular da proteína quimérica nos órgãos vegetativos de tabaco, por microscopia de fluorescência.

Os resultados descritos de análise de promotor indicaram que o promotor *SBP2* pode ser potencialmente usado como ferramenta molecular para direcionar a expressão heteróloga em tecidos específicos. Para tanto, faz-se necessária uma caracterização mais detalhada dessa região promotora, visando identificar cis-elementos responsáveis pelo padrão de tecido-especificidade

previamente observado (Contim et al., 2003; Waclawovsky et al., 2006a). Assim sendo, os objetivos específicos dessa dissertação foram identificar domínios cis-regulatórios presentes na região distal do promotor *SBP2*, bem como determinar a localização celular da proteína SBP2 em órgãos vegetativos, a fim de verificar se o acúmulo da proteína correlaciona-se com a atividade do promotor em tecidos específicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Isolamento e seqüenciamento da região distal (-2000 a -700) do promotor do gene SBP2*

O clone genômico *SBP2*, *pgsS-641.1*, previamente isolado, contém um inserto de 6,4 kb, com uma seqüência promotora de 2 kb (Contim et al., 2003). Em todos os clones descritos a seguir, a enumeração usada para designar as construções de DNA é relativa ao códon de iniciação de tradução ATG. O clone pUFV335, também designado -2000p*SPB2-GUS*, foi previamente descrito (Contim et al., 2003) e contém um fragmento do promotor *SBP2* de 2 kb fusionado ao gene repórter *GUS*, em pCAMBIA1381Z. A região promotora de interesse foi isolada, utilizando pUFV335 como molde, em reação de polimerização em cadeia (PCR). Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos pS642000F (5'- GTCGTGCTCCACCATGTTGGG-3', que anela no vetor pCAMBIA1381Z, próximo a um sítio de *EcoRI*) e pS64Hd700R (5'- CATCTCAAGCTTAAGACTCAAATT-3', coordenadas -688 e -711, que cria um sítio para *HindIII* na posição -694), gerando um produto de cerca de 1,3 kb. Esse fragmento, correspondente à região de -2000 a -700 do promotor (CRD-A), foi purificado e submetido à reação de seqüenciamento. A identificação de prováveis cis-elementos foi conduzida utilizando o *software PLACE – Plant Cis-acting Regulatory DNA elements* (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

## Obtenção das construções 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.* (2003). Para obtenção das novas construções, foram utilizadas as técnicas padrões de clonagem, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). O fragmento -2000 a -700p*SBP2* (CRD-A), obtido como descrito anteriormente, foi digerido com enzimas de restrição apropriadas (*EcoRI* e *HindIII*) e clonado nos sítios correspondentes do vetor binário de expressão em plantas, pCAMBIA1381Z, originando o clone pUFV744 (CRD-A:*GUS*). Da mesma forma, tal fragmento foi inserido em duas construções previamente existentes, -136p*SBP2*-*GUS* (Contim *et al.*, 2003) e -92p*SBP2*-*GUS* (Waclawovsky *et al.*, 2006a), originando os clones pUFV651 (CRD-A/-92p*SBP2*-*GUS*) e pUFV652 (CRD-A/-136p*SBP2*-*GUS*) (Figura 1).

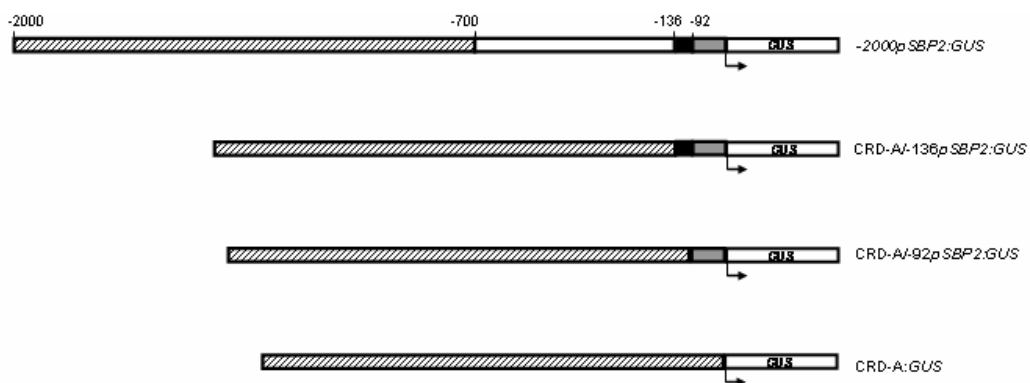


Figura 1- Representação esquemática das construções contendo a seqüência de -2000 a -700 (CRD-A) do promotor *SBP2* (*gsS641.1*) fusionada a *GUS*. O fragmento foi gerado por PCR e clonado nos sítios apropriados das construções -136p*SBP2*:*GUS* e -92p*SBP2*:*GUS*, bem como no vetor pCAMBIA1381Z. Os números indicam a posição relativa ao códon de início de tradução, o qual é indicado por uma seta direcional.

Deleções do promotor foram obtidas por meio de PCR, usando *Taq platinum* e *pgsS-641.1* como molde. Os diferentes fragmentos, correspondentes às regiões de -2000 a -1766 (fragI), -1765 a -1485 (frag II), -1484 a -1212 (fragIII), -1211 a -945 (fragIV) e -944 a -705 (fragV) do promotor *SBP2* foram amplificados utilizando oligonucleotídeos adequados, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Listagem dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção dos cinco fragmentos do promotor *SBP2* e para confirmação dos clones

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Sítio criado
pS64-2000/-1766HdR	CCC <u>AAGCTT</u> TAGGACCAACTGCCAAAAATG	<i>HindIII</i>
pS642000F	GTCGTGCTCCACCATGTTGGG	-
pS64-1765/-1485HdR	CCC <u>AAGCTT</u> CCTAGGCATGATAACAGTTAAAC	<i>HindIII</i>
pS64-1765/-1485EcF	CCG <u>GAA</u> TCTTAGTGCTAGAGAAGACTTG	<i>EcoRI</i>
pS64-1484/-1212HdR	CCC <u>AAGCTT</u> GACATGTGAGAAGACTGATC	<i>HindIII</i>
pS64-1484/-1212EcF	CCG <u>GAA</u> TTCATGCCTAGGAGTTGAATAAC	<i>EcoRI</i>
pS64-1211/-945HdR	CCC <u>AAGCTT</u> TAGGTCCGAAATATCATAAGTGG	<i>HindIII</i>
pS64-1211/-945EcF	CCG <u>GAA</u> TTCATCCAGTTCCAACAAAC	<i>EcoRI</i>
pS64-944/-705HdR	CCC <u>AAGCTT</u> GCATCTCAATCAGAAGACTC	<i>HindIII</i>
pS64-944/-705EcF	CCG <u>GAA</u> TTCGACCTAAATGCAAAATGGTTTG	<i>EcoRI</i>

Após purificação, os fragmentos foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas (*EcoRI* e *HindIII*) e inseridos nos mesmos sítios presentes na construção -92p*SBP2-GUS* (Waclawovsky et al., 2006a), originando os clones pUFV796 (fragI/-92p*SBP2-GUS*), pUFV797 (fragII/-92p*SBP2-GUS*), pUFV798 (fragIII/-92p*SBP2-GUS*), pUFV799 (fragIV/-92p*SBP2-GUS*) e pUFV800 (fragV/-92p*SBP2-GUS*), conforme esquematizado na Figura 2.

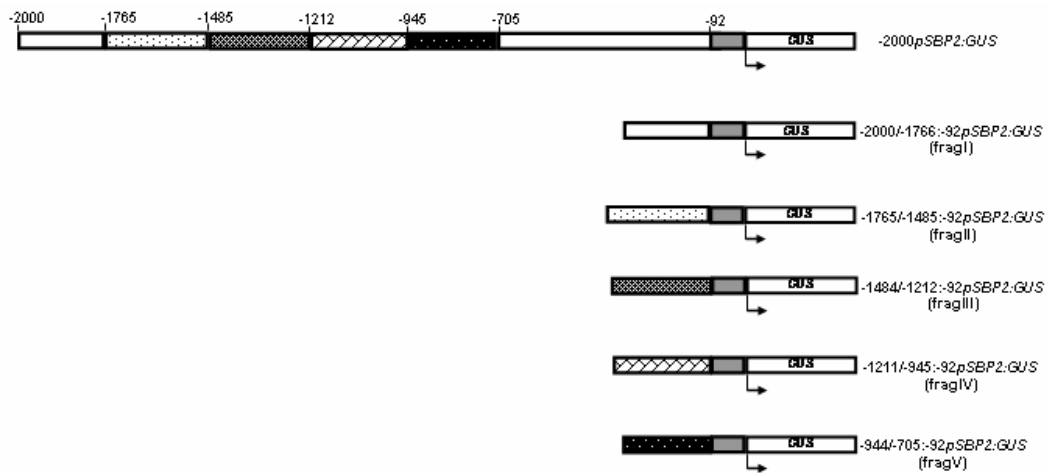


Figura 2 - Representação esquemática das construções contendo diferentes deleções do promotor *SBP2*. Os fragmentos (I, II, III, IV e V), contendo os sítios de restrição (*EcoRI* e *HindIII*), foram gerados por PCR e clonados na construção -92p*SBP2*:*GUS*. A posição do primeiro códon ATG é representada por uma seta direcional.

### Obtenção e seleção de plantas transgênicas

Os plasmídios recombinantes derivados do vetor binário pCAMBIA1381Z ou o vetor binário vazio intacto foram utilizados para transformar plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana, por meio de transformação de discos foliares mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Alvim et al., 2001). 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). Os regenerantes foram testados pela incorporação dos genes *hptII* (resistência à higromicina) e *SBP2* (dados não mostrados). As plantas positivas para a incorporação de ambos os genes foram então utilizadas para ensaios posteriores de expressão do transgene. Os transformantes primários (T<sub>0</sub>) foram mantidos *in vitro* ou transferidos para o solo e crescidos em condições controladas em casa de vegetação para obtenção de sementes.

### *Análise histoquímica do padrão de expressão de GUS em plantas de tabaco transgênicas*

As plantas transformadas foram submetidas ao ensaio histoquímico, conforme McCabe et al. (1988), utilizando-se cinco transformantes independentes de cada construção. Os tecidos (folha, caule e ápice caulinar) foram coletados e seccionados, usando um micrótomo manual. As seções dos tecidos, bem como raízes inteiras e discos foliares, 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 1mM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D glucuronide (X-Gluc) e incubados a 37°C, por 4 horas, no escuro. Os pigmentos foliares foram extraídos dos tecidos corados através de várias lavagens com solução de metanol:acetona (3:1). 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. A presença de uma coloração azulada identificou a atividade positiva da enzima  $\beta$ -glucuronidase e, portanto, a atividade do promotor em estudo.

### *Ensaio de mudança na mobilidade eletroforética (EMSA)*

Visando identificar possíveis interações entre cis-elementos presentes no promotor *SBP2* e transfatores, procedeu-se ao EMSA. Extratos nucleares foram preparados a partir de folha e caule de soja, e de folha de tabaco. O processo consistiu em uma etapa inicial de lise, seguida por centrifugações sucessivas, e por uma etapa de purificação, para recuperação dos núcleos isolados (Polanco Oteíza, 2005). A presença de proteínas no extrato foi confirmada por meio de um gel de SDS-PAGE.

Para obtenção das sondas, os fragmentos de interesse (II, III, IV e V) foram marcados com  $^{32}\text{P}$ , usando o kit *Ready.To.Go<sup>TM</sup> DNA Labelling Beads(-dCTP)* (Amersham Biosciences), conforme recomendações do fabricante. O excesso de  $^{32}\text{P}$  não incorporado foi removido através de uma etapa de purificação em colunas de cromatografia Micro-Bio Spin® (Bio-Rad). A sonda marcada, o extrato nuclear e DNA de esperma de salmão (ssDNA) foram incubados na presença do tampão de ligação (Hepes 12 mM, pH 7,9; Tris-Cl 4 mM, pH 7,9; KCl 60 mM; EDTA 1 mM; DTT 1mM; glicerol 12%), sendo o volume final ajustado para 15  $\mu\text{L}$ . Como controle, foi feita uma reação na ausência de extrato, apenas com a sonda. A reação prosseguiu por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Em seguida, adicionaram-se 3 $\mu\text{L}$  do corante azul de bromofenol aos 15 $\mu\text{L}$  de reação, e procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, a 35mA, por cerca de 4 horas. O tampão de corrida (Tris-Cl 6,7 mM, pH 7,9; acetato de sódio 3,3 mM; EDTA 1 mM) foi trocado a cada 20 minutos, para promover sua recirculação. Terminada a corrida, o gel foi seco no aparelho "Gel Dryer", por 2 horas e revelado por auto-radiografia à temperatura ambiente, por cerca de 6 horas.

#### *Obtenção da construção pSBP2: cDNA SBP2: GFP para localização celular da proteína SBP2*

Inicialmente, o fragmento de 2 kb, correspondente à região promotora de *SBP2*, foi amplificado por PCR, utilizando-se o pUFV335 como molde, e os oligonucleotídeos pS642000F (5'-GTCGTGCTCCACCATGTTGGG-3', o qual anela no vetor pCAMBIA1381Z, próximo a um sítio de *EcoRI*) e pS64SmaR (5'-CATGCCCCGGGTCAGTGAGGACAGTGAG-3', que anela na posição -27 a +1 relativo ao códon de início da tradução e que cria um sítio de *SmaI* na posição -

9). Tal fragmento foi tratado com enzimas de restrição apropriadas (*EcoRI* e *SmaI*), em seguida purificado, e clonado nos mesmos sítios presentes no vetor binário de expressão em plantas pCAMBIA1381Z, gerando o clone pUFV674. O fragmento correspondente à GFP (*green fluorescent protein*) foi amplificado a partir de um DNA molde (pK7FWG2), com uso dos oligonucleotídeos eGFPPstR (5'-GCATGCCTGCAGGTCAGTGGATTTTGG-3', coordenadas 8 a 34 do vetor pK7FWG2, que cria um sítio para *PstI* na posição 14) e eGFPSaIF (5'-GTGGTGGTCGACATGGTGAGCAAGGGC-3', coordenadas 978 a 951 do vetor pK7FWG2, que cria um sítio para *Sall* na posição 966), digerido com enzimas de restrição adequadas (*Sall* e *PstI*), purificado e clonado nos sítios correspondentes do vetor pUC118, originando o clone pUFV714. O fragmento foi então liberado com as enzimas *Sall/PstI* e inserido nos mesmos sítios presentes no clone previamente construído, pUFV674, rendendo o clone pUFV760 (-2000p*SBP2*:*GFP*). Da mesma forma, o fragmento correspondente ao cDNA de *SBP2* foi amplificado a partir de um DNA molde (pUFV30), com uso dos oligonucleotídeos S64BamF (5'-AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTC-3', coordenadas 93 a 116, que cria um sítio para *BamHI* na posição 96) e S64SaINSR (5'-CCTCCACACGTCGACCGCAACAGCGCG-3', coordenadas 1499 a 1473, que cria um sítio para *Sall* na posição 1484), digerido com enzimas de restrição adequadas (*Sall* e *BamHI*), purificado e clonado nos sítios correspondentes do vetor pUC118, originando o clone pUFV713. O fragmento foi liberado com as enzimas *Sall/BamHI* e inserido nos mesmos sítios presentes no clone previamente construído, pUFV760, resultando no clone pUFV763 (-2000p*SBP2*:cDNA *SBP2*:*GFP*), que contém o cDNA de *SBP2* fusionado ao cDNA de *GFP*, sob o controle do promotor do gene *SBP2*, conforme esquematizado na Figura 3.

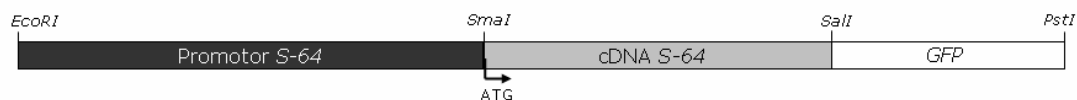


Figura 3 - Diagrama esquemático da construção contendo o cDNA de *SBP2* sob controle do promotor *SBP2*, e fusionado ao gene *GFP*. Os sítios de restrição utilizados para as clonagens são mostrados, e a posição do primeiro códon ATG é representada por uma seta direcional.

### *Localização celular de SBP2-GFP*

A transformação de tabaco foi feita basicamente como descrito por Alvim et al. (2001). Os regenerantes foram testados pela incorporação do gene *hptII*, bem como de genes da construção (cDNA *SBP2* e *GFP*). Plantas positivas foram, então, utilizadas para verificar se a proteína SBP2 também acumula nos locais onde o promotor foi capaz de dirigir altos níveis de expressão do gene repórter *GUS* (Waclawovsky et al., 2006a). Para tanto, essas plantas foram submetidas à análise microscópica, para detecção de fluorescência. Foram utilizados 10 transformantes independentes, e a presença de fluorescência foi analisada em diferentes órgãos e tecidos das plantas. Devido à autofluorescência do xilema de raiz, a análise se restringiu ao caule, ao ápice caulinar e à folha. Para caule e ápice caulinar, foram obtidos cortes através de um micrótomo manual. Para folha, foram obtidos explantes (cerca de 1 cm<sup>2</sup>), dos quais se observou principalmente a região da nervura. Considerando a interferência das células epidérmicas na visualização da fluorescência, optou-se por remover a epiderme inferior da folha antes de proceder às análises no microscópio.

As imagens de confocal foram obtidas utilizando-se o sistema LSM 510 META invertido (ZEISS) com *argon laser*. Para caule e ápice caulinar utilizou-se a objetiva de 10x1,4, enquanto que, para folha, foi utilizada a objetiva de imersão

de óleo de 40x1,4. GFP foi excitada a 488 nm, e sua emissão foi coletada a 500-530 nm. O *pinhole* foi usualmente fixado, fornecendo uma faixa óptica de 1 a 1,5 µm. Foram utilizados controles, a fim de evitar a detecção de autofluorescência. As imagens foram processadas com auxílio do *software* “LSM Image Browser 4” (ZEISS).

### *Análise da expressão dos genes SBP em órgãos de soja*

A expressão dos genes *SBP1* e *SBP2/S-64* foi analisada em diferentes tecidos de soja (*Glycine max*), variedade CAC-1, e em diferentes estádios de desenvolvimento, através da reação de polimerização em cadeia em tempo real (*Real-Time PCR*). Para tanto, foram construídos oligonucleotídeos específicos para as isoformas de *SBP*, utilizando o programa *Primer Express 3.0*. As seqüências foram obtidas através de banco de dados de soja (*soybase*) e o alinhamento feito através do CLUSTALW ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Foi construído um par de oligonucleotídeos específico para a isoforma *SBP1*, um outro par específico para *SBP2*, e um terceiro par que anela em ambas as seqüências, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Listagem dos oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão dos genes *SBP* de soja, através do *Real-Time PCR*

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Posição de anelamento no gene
SBP1322Rvs	TTGTCCTTCCCTGCAAACGTAA	1322 a 1301 (nas 2 isoformas)
SBP1200Fwd	GTTTGTGTCCCTCCTGGTCATC	1200 a 1222 (nas 2 isoformas)
SBP1Rvs1507	TTCCTATCAATTTCCGTTGAGG	1507 a 1485 (apenas em <i>SBP1</i> )
SBP1Fwd1408	CTGGACAACGTTGCTAAGGAGC	1408 a 1429 (apenas em <i>SBP1</i> )
SBP2Rvs1514	CGTTATCAGCCACCTCCACACT	1514 a 1493 (apenas em <i>SBP2</i> )
SBP2Fwd1398	ATGGTGAACGGAGTCTTCGAAAG	1398 a 1420 (apenas em <i>SBP2</i> )

O RNA foi extraído a partir de folha fonte, folha dreno, caule e raiz, tanto de planta na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva, além de plântula intacta. Foram também utilizadas sementes em diferentes estádios de desenvolvimento, de acordo com a massa fresca (Lanna, 2002), sendo o primeiro estágio correspondente à semente com até 75 mg; o segundo estágio, de 75 a 150 mg; o terceiro, de 151 a 225 mg; o quinto, de 301 a 375 mg; e semente madura, superior a 450 mg. O processo de extração de RNA consistiu na utilização de Trizol (Invitrogen), seguido por precipitação com isopropanol. A qualidade e a integridade do RNA foram monitoradas, respectivamente, por espectrofotômetro e por eletroforese em gel de agarose. Cerca de 3 µg de RNA foram tratados com DNase (Promega, Madison, WI) e utilizados para obtenção do cDNA, usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT(18), de acordo com recomendações do fabricante.

As reações de *Real-Time PCR* foram realizadas no equipamento ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos específicos para as isoformas de *SBP* (*SBP1* e *SBP2*). As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. A análise da expressão gênica foi quantificada usando o método  $2^{-\Delta C_T}$ . O RNA da helicase foi usado como controle endógeno, para normalização dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Seqüências entre -2000 e -700 são essenciais para a expressão tecido vascular-específica do promotor SBP2.*

O promotor *SBP2* foi capaz de dirigir a expressão de genes repórteres (*GUS* e *GFP*) com alta especificidade para o tecido vascular de plantas de tabaco (Contim et al., 2003). Assim, independentemente de fatores externos, a expressão tecido-específica é controlada por elementos regulatórios presentes no promotor *SBP2* (Waclawovsky et al., 2006a). Deleções progressivas do promotor *SBP2*, a partir de sua extremidade 5', mapearam elementos silenciadores tecido-específicos em seqüências distais (posição -2000 a -700), uma vez que a deleção dessa região resultou em forte incremento da atividade do promotor, observada pela atividade da enzima *GUS*, através de ensaio histoquímico e fluorimétrico. Esse resultado indicou que a região de -2000 a -700 (CRD-A) do promotor *SBP2* contém seqüências repressoras, as quais restringem a atividade do promotor ao tecido vascular de órgãos vegetativos, prevenindo a expressão gênica em outros tecidos. A deleção dessa região de-reprimiu o promotor *SBP2* em todos os tecidos analisados, indicando que todos os elementos cis-atuantes necessários para a expressão constitutiva de *SBP2* devem estar localizados *downstream* de -700 (Waclawovsky et al., 2006a).

Para confirmar que as seqüências CRD-A eram capazes de direcionar a expressão no tecido vascular, foram conduzidos experimentos de ganho-de-função. Para tanto, a região de interesse, contendo 1,3 kb, foi amplificada por PCR e inserida em duas construções previamente existentes, -136p*SBP2*-*GUS* (Contim et al., 2003) e -92p*SBP2*-*GUS* (Waclawovsky et al., 2006a), as quais haviam demonstrado alto nível de expressão da enzima *GUS* e, portanto, alta atividade do promotor *SBP2* (Waclawovsky et al., 2006a). De fato, tem sido

demonstrado que as seqüências do promotor *SBP2* delimitadas até a posição -92 representam um promotor mínimo de planta em potencial, já que contêm um TATA box em um contexto favorável para a transcrição, a 21 nucleotídeos *downstream* do sítio +1 (Contim et al., 2003), além de serem capazes de dirigir a expressão constitutiva de *GUS* em todos os tecidos analisados (Waclawovsky et al., 2006a). Similarmente, plantas contendo a construção -136p*SBP2-GUS* apresentaram alto nível de expressão da enzima GUS nos tecidos analisados, com exceção do meristema radicular. Essas observações indicaram que a região entre -136 e -92 contém um elemento repressor da expressão no meristema radicular (Waclawovsky et al., 2006a). A Figura 1 esquematiza as construções obtidas, as quais foram denominadas CRD-A/-136p*SBP2-GUS* e CRD-A/-92p*SBP2-GUS*. Além disso, o fragmento foi inserido diretamente no vetor pCAMBIA1381Z, na ausência de qualquer região promotora com elementos necessários para a transcrição basal (CRD-A:*GUS*). Como controle, foi utilizado o vetor pCAMBIA1381Z vazio.

Plantas transgênicas de tabaco foram geradas a partir destas construções, via transformação por *Agrobacterium tumefaciens*. Foram também utilizadas plantas contendo as construções -2000p*SBP2-GUS*, -136p*SBP2-GUS* (Contim et al., 2003) e -92p*SBP2-GUS* (Waclawovsky et al., 2006a). A atividade de GUS foi verificada em folha, caule, ápice caulinar e raiz, utilizando cinco transformantes independentes de cada construção. Todas as construções foram capazes de expressar a enzima GUS, embora a intensidade da coloração do produto obtido tenha sido diferente entre elas, ilustrando um padrão de expressão tecido-específico bastante complexo. Para as construções -2000p*SBP2-GUS* e -136p*SBP2-GUS*, foi observado o mesmo padrão previamente descrito por Contim et al. (2003). O promotor completo foi capaz de dirigir a expressão do gene repórter preferencialmente para os feixes vasculares de folha, caule, ápice caulinar e raiz (Figura 4, a1, b1, c1, d1 e e1). Por outro

lado, -136p*SBP2* foi responsável por um alto nível de expressão de *GUS* em todos os tecidos analisados, com exceção do meristema radicular e da zona de alongamento da raiz (Figura 4, a2, b2, c2, d2 e e2). Assim também, o padrão de expressão da construção -92p*SBP2-GUS* foi o mesmo verificado por Waclawovsky et al. (2006a), apresentando um alto nível de expressão basal em todos os órgãos analisados (Figura 4, a4, b4, c4, d4 e e4).

O fragmento (-2000 a -700) inserido na região 5' de -136p*SBP2-GUS* foi capaz de reduzir a atividade de *GUS* em todos os órgãos analisados. Em folha, essa redução ficou evidente quando analisada a superfície foliar, na qual a expressão foi restrita ao tecido vascular (Figura 4, a3), embora no corte transversal, na região do mesofilo, também tenha sido possível observar uma menor intensidade da coloração azulada em relação ao -136p*SBP2-GUS* (Figura 4, b3 e b2, respectivamente). No caule, a expressão de *GUS* foi mais concentrada na região do feixe vascular (Figura 4, c3), embora as células adjacentes do parênquima tenham apresentado também uma coloração azulada, porém mais fraca do que aquela observada para -136p*SBP2-GUS* (Figura 4, c2). Também no ápice caulinar e na raiz houve redução da atividade de *GUS*, com uma tendência de maior expressão no tecido vascular (Figura 4, d3 e e3, respectivamente).

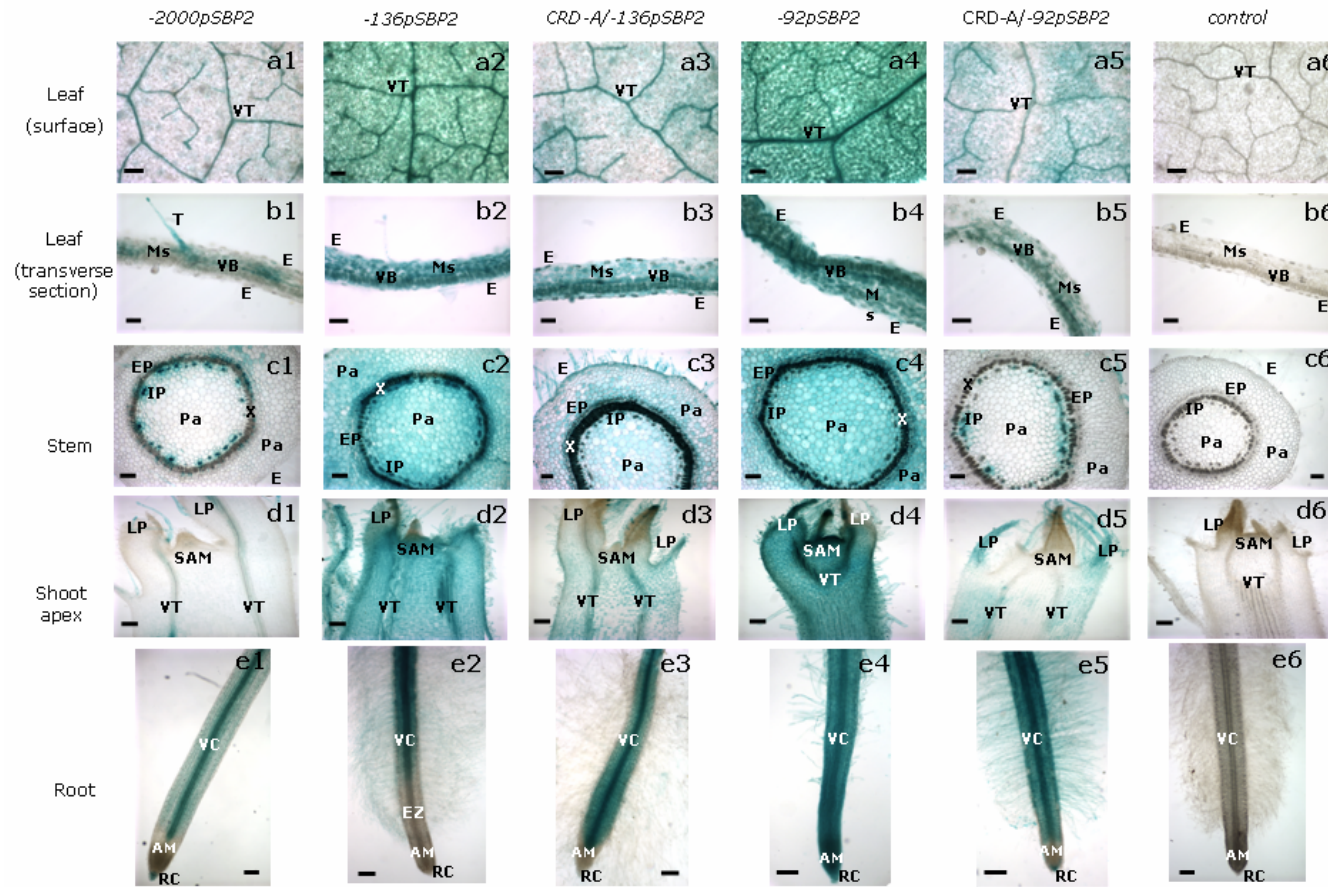


Figura 4 - Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor *SBP2* fusionado a *GUS*, em plantas transgênicas contendo as construções quiméricas -2000p*SBP2*:*GUS*, -136p*SBP2*:*GUS*, CRD-A/-136p*SBP2*:*GUS*, -92p*SBP2*:*GUS* e CRD-A/-92p*SBP2*:*GUS*. Plantas transformadas com o vetor pCAMBIA1381Z vazio foram usadas como controle. a1-a6: superfície foliar; b1-b6: corte transversal de folha; c1-c6: caule; d1-d6: ápice caulinar; e1-e6: raiz. Epiderme, E; Mesofilo, Ms; Bainha vascular, VB; Tricoma, T; Parênquima, Pa; Xilema, X; Floema interno, IP; Floema externo, EP; Meristema apical caulinar, SAM; Primórdio foliar, LP; Tecido vascular, VT; Meristema apical radicular, AM; Cilindro vascular, VC; Coifa, RC; Zona de alongamento, EZ. Barras em a1-a6 e b1-b6 = 100  $\mu$ m; c1-c6, d1-d6, e1-e6 = 200 $\mu$ m.

A inserção do fragmento (-2000 a -700) na região 5' de -92p*SBP2-GUS* reduziu drasticamente a atividade de *GUS* nos tecidos analisados (Figura 4, a5, b5, c5, d5 e e5), restaurando o padrão de expressão tecido-específico observado para o promotor completo, exceto para o ápice caulinar (Figura 4, d5). Neste caso, houve redução da atividade de *GUS*, com redução da intensidade de coloração azulada, mas a expressão não foi restrita ao tecido vascular, como verificado para o promotor completo (Figura 4, d1). Na folha, tanto na superfície (disco foliar) quanto no corte transversal, foi possível observar a expressão de *GUS* mais restrita ao feixe vascular, em detrimento dos demais tecidos (Figura 4, a5 e b5). Também no caule, a expressão de *GUS* foi tecido-específica, estando restrita ao floema interno (Figura 4, c5). A análise da raiz mostra que o maior efeito ocorreu na região do meristema, onde a expressão de *GUS* foi totalmente abolida, quando comparada com a construção -92p*SBP2-GUS* (Figura 4, e5 e e4, respectivamente), além de ter havido uma maior expressão no tecido vascular (Figura 4, e5).

Coletivamente, estes resultados confirmam a natureza regulatória negativa de CRD-A, que foi capaz de promover drástica redução da atividade do promotor *SBP2* na maioria dos tecidos analisados. No entanto, tal regulação diferiu entre as duas construções em estudo, em alguns órgãos analisados. No caule, por exemplo, para a construção CRD-A/-136p*SBP2-GUS*, houve redução da expressão de *GUS* nos tecidos parenquimáticos e uma maior concentração no feixe vascular (Figura 4, c3). Já para a construção CRD-A/-92p*SBP2-GUS*, a expressão de *GUS* foi bastante reduzida, ficando restrita apenas ao floema interno (Figura 4, c5). Isso indica que a região compreendida entre -136 e -92 deve possuir algum elemento positivo capaz de atenuar, mas não anular, o efeito negativo e tecido-específico de CRD-A. De fato, a região entre -136 e -92 possui um elemento CAAT box (Contim et al., 2003), relacionado com a ativação da transcrição e responsável por altos níveis de transcrição em promotores de

plantas (Kusnetsov et al., 1999). Analisando a raiz, em ambos os casos, CRD-A promoveu uma maior expressão no feixe vascular (Figura 4, e3 e e5), de acordo com sua natureza tecido-específica. No caso de CRD-A/-136pSBP2-GUS, o fragmento de-reprimiu a atividade do promotor na zona de alongamento, indicando a presença de possíveis cis-elementos positivos, cujo efeito se sobrepõe ao efeito repressor da seqüência -136 para essa região. No entanto, no meristema radicular, a repressão observada para -136pSBP2-GUS foi mantida para CRD-A/-136pSBP2-GUS. Para a construção CRD-A/-92pSBP2-GUS, houve repressão da expressão de GUS no meristema radicular, indicando que CRD-A possui elementos silenciadores para o meristema radicular, semelhantes àquele presente na região -136 a -92 (Waclawovsky et al., 2006a). Estes resultados ilustram a complexidade acerca da regulação do promotor SBP2.

*A região de -2000 a -700 (CRD-A) é capaz de promover a transcrição de GUS, mesmo na ausência de promotor mínimo.*

A dependência das seqüências distais (CRD-A) do promotor basal proximal foi investigada por meio de uma construção de DNA, na qual esse fragmento foi inserido diretamente no vetor pCAMBIA1381Z, sem qualquer região promotora (Figura 1). A construção foi transferida para *Agrobacterium tumefaciens* e utilizada para obtenção de plantas de tabaco transgênicas. Plantas regeneradas foram testadas pela incorporação do gene *hptII* e do promotor SBP2, e utilizadas em ensaios de atividade de GUS. Para tanto, seis transformantes independentes foram submetidos ao ensaio histoquímico, sendo a análise realizada em folha, caule, ápice caulinar e raiz. O fragmento foi capaz de promover a transcrição de GUS, independente de promotor mínimo, com padrão tecido-específico semelhante àquele observado para o promotor inteiro,

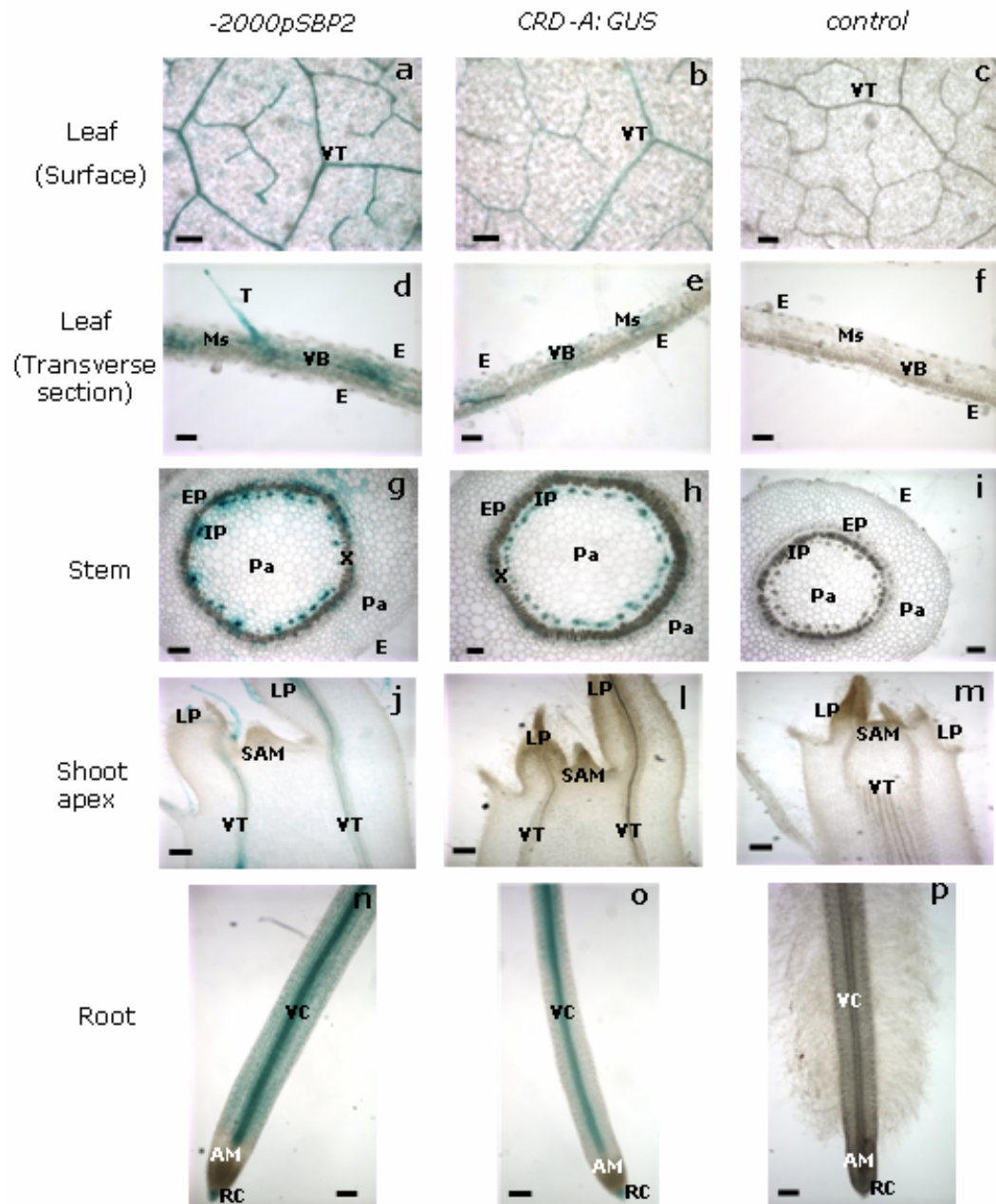


Figura 5 - Análise histoquímica da expressão da enzima GUS em plantas transgênicas contendo o fragmento -2000 a -700 (CRD-A) do promotor *SBP2* fusionado diretamente a *GUS*. O padrão de expressão do promotor completo (-2000p*SBP2*) é mostrado na segunda coluna. Plantas transformadas com o vetor pCAMBIA1381Z vazio foram usadas como controle (primeira coluna). a-c: superfície foliar; d-f: corte transversal de folha; g-i: caule; j-m: ápice caulinar; n-p: raiz. Epiderme, E; Mesofilo, Ms; Bainha vascular, VB; Tricoma, T; Parênquima, Pa; Xilema, X; Floema interno, IP; Floema externo, EP; Meristema apical caulinar, SAM; Primórdio foliar, LP; Tecido vascular, VT; Meristema apical radicular, AM; Cilindro vascular, VC; Coifa, RC. Barras em a, b, c, d, e, f = 100  $\mu$ m; g, h, i, j, l, m, n, o = 200 $\mu$ m.

exceto para o ápice caulinar. Em folha (Figura 5, c e f) e raiz (Figura 5, p), a expressão foi restrita ao tecido vascular, enquanto que, no caule, houve expressão apenas no floema interno (Figura 5, i). Entretanto, no ápice caulinar não houve expressão de *GUS* (Figura 5, m). Estes resultados indicam que a região CRD-A possui cis-elementos capazes de promoverem a transcrição basal. De fato, nessa região foram identificados vários elementos TATA box, localizados nas posições -790, -783 e -761 (Figura 6), que podem potencialmente funcionar como TATA boxes alternativos. Além disso, foi possível confirmar que a região CRD-A é suficiente para direcionar a expressão do gene repórter para o tecido vascular, independentemente do contexto de seqüências, uma vez que o padrão tecido-específico foi mantido. Adicionalmente, observou-se que seqüências *downstream* a -92 devem ser importantes para a expressão no ápice caulinar, já que na sua ausência, essa expressão foi abolida (Figura 5, m).

*Elementos regulatórios em cis, relacionados à expressão tecido-específica, estão presentes na seqüência do promotor SBP2.*

Uma vez que a região de -2000 a -700 foi capaz de promover a transcrição de *GUS*, independente de promotor mínimo e de maneira tecido-específica, procurou-se identificar possíveis cis-elementos presentes, responsáveis por esse padrão de expressão. A análise da região promotora do gene *SBP2* foi realizada com auxílio do programa computacional *PLACE* (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

Diversos sítios, possivelmente envolvidos na regulação tecido-específica, foram identificados na sua seqüência (Figura 6). Dentre eles, destaca-se o elemento GLUB1 (AACAAAC), na posição -1181 a -1175, relacionado ao controle negativo da expressão endosperma-específica do gene glutelina de

arroz (Yoshihara et al., 1996). O elemento GATA box, envolvido no controle da expressão tecido-específica e à regulação por luz, foi localizado em diversas posições no promotor *SBP2* (-849 a -846, -964 a -961, -1122 a -1119, -1844 a -1841 e -1900 a -1897).

Foram identificados vários sítios relacionados com a proteína regulatória DOF no promotor *SBP2* (posições -734 a -731, -834 a -831, -1013 a -1010, -1091 a -1088, -1238 a -1235, -1336 a -1333, -1344 a -1341, -1599 a -1596, -1847 a -1844 e -1892 a -1889). As proteínas DOF são uma família de fatores de transcrição, identificadas em associação com diversos promotores de genes específicos de plantas, envolvidas em diferentes funções no controle da expressão gênica (Yanagisawa e Schmidt, 1999). Por exemplo, 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. Adicionalmente, foram identificados no promotor *SBP2* três motivos NTBBF1 (ACTTTA), nas posições -1458 a -1453, -1567 a -1562 e -1700 a -1695, os quais podem ser sítios de ligação de proteínas DOF, tendo sido reportados como responsáveis pela expressão tecido-específica em tabaco (Baumann et al., 1999).

Uma seqüência também encontrada no promotor *SBP2* consiste no elemento *Inr* (*initiator*), YTCANTYY, localizado nas posições -1365 a -1358, -1791 a -1784 e -1976 a -1969. Tal elemento é responsável pela transcrição do gene *psaDb* de tabaco em resposta à luz, independente de TATA box.

Desta forma, o padrão de expressão do gene *SBP2* parece ser regulado por um grande número de fatores de transcrição acessórios, indicando um sistema complexo e cooperativo no controle da expressão gênica.



*O padrão de tecido-especificidade do promotor SBP2 se deve à presença de cis-elementos em diferentes posições.*

Com o objetivo de delimitar os cis-elementos responsáveis pelo padrão tecido-específico do promotor *SBP2*, a sequência -2000 a -700 foi dividida em cinco fragmentos, contendo cerca de 280 pb cada um. Os diferentes fragmentos, correspondentes às regiões de -2000 a -1766 (fragI), -1765 a -1485 (frag II), -1484 a -1212 (fragIII), -1211 a -945 (fragIV) e -944 a -705 (fragV) do promotor *SBP2* foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* e inseridos nos mesmos sítios presentes na construção -92p*SBP2*-*GUS* (Waclawovsky et al., 2006a). As construções obtidas (Figura 2) foram então utilizadas para obtenção de plantas de tabaco transgênicas. Para a construção fragI/-92p*SBP2* não foram obtidos regenerantes positivos, sendo as análises posteriores realizadas apenas para os demais fragmentos (II, III, IV e V). A atividade de *GUS* foi analisada, histoquimicamente, em folha, caule, ápice caulinar e raiz, utilizando cinco transformantes independentes de cada construção.

Todos os fragmentos foram capazes de reduzir a atividade do promotor *SBP2*, uma vez que sua inserção na extremidade 5' de -92p*SBP2* alterou o padrão de expressão constitutiva do mesmo (Figura 7). Entretanto, a intensidade do efeito repressor variou entre os quatro fragmentos em estudo, e de acordo com o órgão analisado. Em folha, todos eles promoveram redução da expressão de *GUS* (Figura 7, a3-a6 e b3-b6), embora o maior efeito tenha sido observado para o fragmento III (-1484/-1212), e o menor para o fragmento V (-944/-705). Em caule (Figura 7, c3-c6), o fragmento III foi o que reduziu mais drasticamente a expressão de *GUS*, restringindo-a apenas ao floema interno. Os demais fragmentos, II (-1765/-1485), IV (-1211/-945) e V também reduziram a atividade do promotor, concentrando-a mais na região do tecido vascular, embora as células parenquimáticas tenham também apresentado uma coloração azulada,

porém mais fraca que aquela observada para a construção -92p*SBP2* (Figura 7, c2). A expressão no ápice caulinar foi totalmente abolida para os fragmentos II, III e IV (Figura 7, d3-d5), enquanto que, para o fragmento V, houve apenas uma redução dessa expressão, com uma maior concentração no feixe vascular (Figura 7, d6). Finalmente, em raiz, todos os fragmentos aboliram a expressão de *GUS* na região meristemática (Figura 7, e3-e6). Os fragmentos II e IV foram capazes de reprimir a expressão também na zona de alongamento (Figura 7, e3 e e5). Além disso, o fragmento II restaurou o padrão de tecido-especificidade do promotor completo, havendo expressão apenas no tecido vascular da raiz (Figura 7, e3).

Estes resultados ilustram a natureza regulatória das seqüências em estudo e mostram a complexidade da regulação do promotor *SBP2*. Diversos cis-elementos estão presentes na sua seqüência, sendo responsáveis por diferentes níveis de expressão, de acordo com órgão analisado. Dentre os quatro fragmentos, o fragmento V (-944/-705) foi o que apresentou um efeito repressor mais atenuado, com pequena redução da expressão de *GUS*, exceto para o meristema radicular, onde a expressão foi totalmente abolida. A análise de seqüência desse fragmento (Figura 6) revela a presença de vários sítios DOF e de um GATA box, envolvidos na regulação tecido-específica. Além disso, estão presentes três elementos TATA box (posições -790, -783 e -761), os quais devem ser responsáveis pela expressão observada. Os demais fragmentos (II, III e IV) foram mais eficientes em reduzir a expressão de *GUS*, conforme observado na Figura 7.

A análise dos resultados nos permite identificar possíveis cis-elementos e seu efeito sobre a regulação da atividade do promotor *SBP2*. Sendo assim, a região compreendida entre -1765 e -945 deve conter elementos repressores para o ápice caulinar, uma vez que os três fragmentos (II, III e IV) foram capazes de abolir a expressão de *GUS* nesse tecido. Da mesma forma, a região entre -

1765 e -705 contém elementos silenciadores para o meristema radicular, onde a expressão foi abolida por todos os fragmentos em estudo. Além disso, duas regiões, de -1765 a -1485 e de -1211 a -945, correspondentes aos fragmentos II e IV, aboliram a expressão de *GUS* também na zona de alongamento da raiz. A região de -1765 a -1485, correspondente ao fragmento II, apresenta um forte repressor para expressão na raiz, já que a atividade do promotor foi detectada apenas no tecido vascular. Por fim, foi possível identificar um elemento silenciador da expressão no caule, na posição -1485 a -1212 (fragmento III), responsável pela expressão de *GUS* apenas no floema interno.

A comparação destes resultados com aqueles obtidos para a construção CRD-A/-92p*SBP2-GUS* nos permite algumas inferências acerca da regulação do promotor *SBP2*. O fragmento de -2000 a -700 (CRD-A), inserido na extremidade 5' de -92p*SBP2-GUS* reduziu drasticamente a atividade de *GUS* nos tecidos analisados (Figura 4, a5, b5, c5, d5 e e5). No caule, a expressão ficou restrita ao floema interno; no ápice caulinar, houve redução da expressão de *GUS*; e na raiz, houve redução da expressão de uma forma geral, além de haver repressão no meristema radicular. Coletivamente, estes resultados apontam para a existência de diversos elementos, cujo efeito se sobrepõe ao de outros elementos presentes, e nos permite identificar regiões potencialmente regulatórias. Sendo assim, a região compreendida entre -1765 e -705 contém vários elementos silenciadores para o meristema radicular. A região entre -944 e -705 (correspondente ao fragmento V) foi capaz de atenuar o efeito silenciador da região entre -1765 e -945, para o ápice caulinar. Da mesma forma, a região entre -1485 e -705 deve conter cis-elementos que atenuam o efeito repressor na raiz, causado pelo fragmento -1765 a -1485. Por fim, o elemento responsável em restringir a expressão apenas ao floema interno no caule, está localizado na região entre -1485 e -1212.

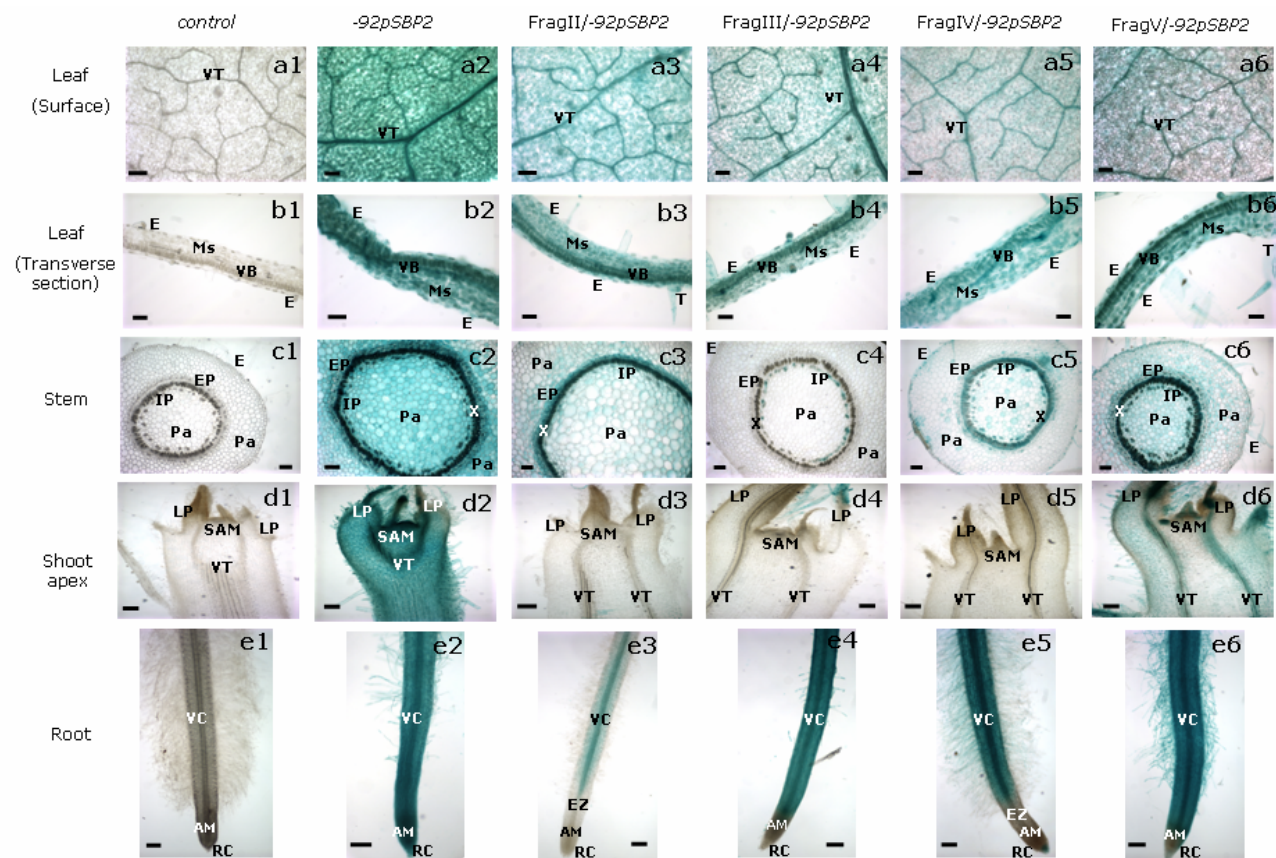


Figura 7 - Análise histoquímica da expressão tecido-específica do promotor *SBP2* fusionado a *GUS*, em plantas transgênicas contendo as construções quiméricas -92p*SBP2*:*GUS*, -1765/-1485:-92p*SBP2*:*GUS*, -1484/-1212:-92p*SBP2*:*GUS*, -1211/-945:-92p*SBP2*:*GUS* e -944/-705:-92p*SBP2*:*GUS*. Plantas transformadas com o vetor pCAMBIA1381Z vazio foram usadas como controle (primeira coluna). a1-a6: superfície foliar; b1-b6: corte transversal de folha; c1-c6: caule; d1-d6: ápice caulinar; e1-e6: raiz. Epiderme, E; Mesofilo, Ms; Bainha vascular, VB; Tricoma, T; Parênquima, Pa; Xilema, X; Floema interno, IP; Floema externo, EP; Meristema apical caulinar, SAM; Primórdio foliar, LP; Tecido vascular, VT; Meristema apical radicular, AM; Cilindro vascular, VC; Coifa, RC; Zona de alongamento, EZ. Barras em a1-a6 e b1-b6 = 100 µm; c1-c6, d1-d6, e1-e6 = 200µm.

Os resultados da análise do padrão de expressão do promotor *SBP2* obtidos para as diferentes construções através do ensaio histoquímico estão dispostos, resumidamente, na Tabela 3.

*As seqüências correspondentes aos cis-elementos tecido-específicos são funcionais.*

Uma vez que a análise do promotor do gene de soja procedeu-se no sistema heterólogo de tabaco, foi de interesse avaliar se o padrão de expressão observado pudesse refletir expressão endógena em soja. Esta possibilidade foi avaliada de duas maneiras. O acúmulo dos transcritos de SBP foi avaliado por *Real-Time PCR* nos órgãos vegetativos de soja, correspondentes àqueles de tabaco em que se detectou atividade do promotor *SBP2* (vide abaixo). Além disso, a funcionalidade dos cis-elementos identificados foi comparada por meio de ensaio de mudança na mobilidade eletroforética (EMSA), usando extratos nucleares obtidos de folha e caule de soja, e de folha de tabaco. A qualidade do extrato foi monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, revelando um perfil de bandas característico de extrato nuclear (Figura 8).

Os quatro fragmentos (II, III, IV e V) em estudo foram marcados com  $^{32}\text{P}$  e utilizados como sonda no ensaio. Nas condições utilizadas de adstringência, apenas para o fragmento II (-1765/-1485) foi possível verificar o retardamento na presença de proteínas nucleares (Figura 9). Os extratos nucleares de folha e caule de soja, bem como o extrato de folha de tabaco, foram eficientes em promover o retardamento, sugerindo a presença de transfatores capazes de interagir de maneira seqüência-específica com o promotor *SBP2*.

Tabela 3 – Resumo do padrão de expressão conferido pelos diferentes domínios do promotor *SBP2* em diferentes tecidos e órgãos.

Expressão (tecido/órgão)					Referência	Padrão de expressão
	-1765	-1485	-1212	-945		
Constitutiva (folha)	+	+	+	+	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Tecido Vascular (folha)	++	+++	+	++	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Constitutiva (caule)	+	-	-	+	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Tecido Vascular (caule)	++	-	+	++	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Floema Interno (caule)	+++	+++	+++	+++	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Ápice caulinar	-	-	-	+	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Constitutiva (raiz)	-	-	-	-	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Tecido Vascular (raiz)	+++	+++	+++	+++	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Zona de alongamento (raiz)	-	+++	-	+++	Waclawovsky et al., 2006a	+++
Meristema radicular	-	-	-	-	Waclawovsky et al., 2006a	+++

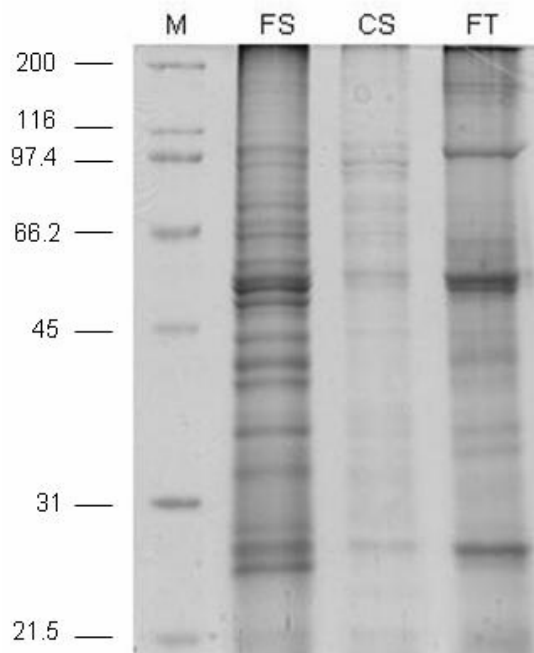


Figura 8 - Extratos nucleares obtidos a partir de folha de soja (FS), caule de soja (CS) e folha de tabaco (FT). M representa o marcador de massa molecular.

As mobilidades eletroforéticas dos complexos formados entre o fragmento II e extratos nucleares de folha e caule de soja foram idênticas (linhas 2 e 3), sugerindo similar identidade de atividades de ligação ao DNA envolvidas. O fragmento II formou com extratos nucleares de folhas de tabaco (linha 4) um complexo de maior peso molecular, cuja mobilidade eletroforética foi superior aos complexos formados pelos extratos de soja. Esta diferença de mobilidade não implica, necessariamente, que os complexos retardados pelos diferentes extratos nucleares possuam composição diferente. É possível que as proteínas homólogas de cada sistema possuam diferentes massas moleculares.

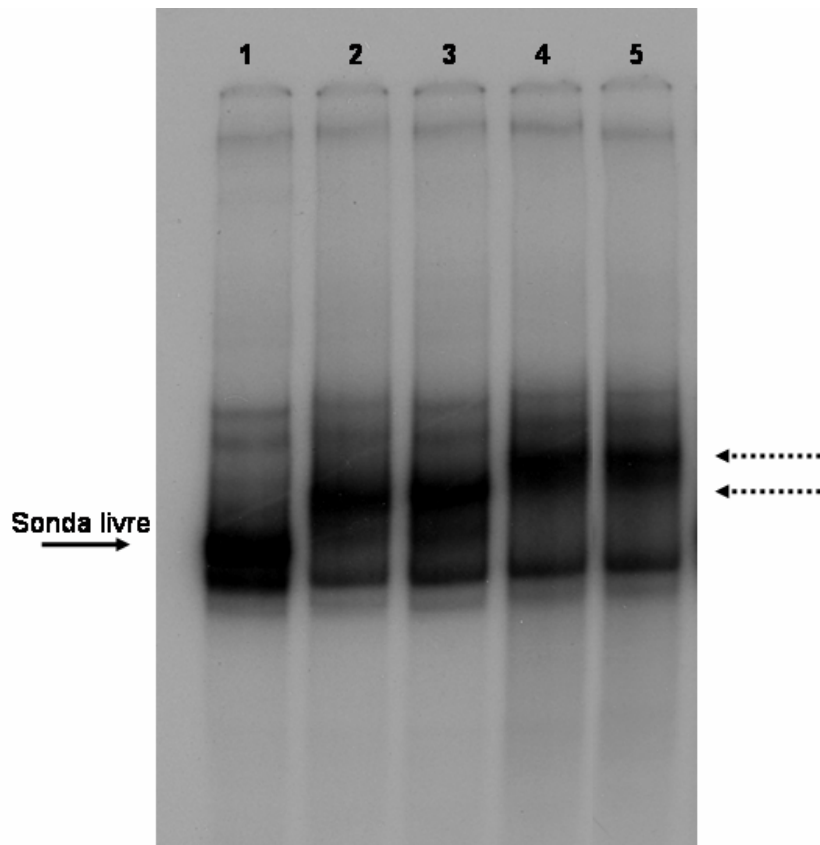


Figura 9 - Ensaio de mudança na mobilidade eletroforética. O fragmento -1765/-1485 do promotor *SBP2* (fragII) foi utilizado como sonda para verificar possíveis interações com proteínas presentes em extratos nucleares (EN) de folha (F) e caule (C) de soja (S) e de folha de tabaco (FT). 1: sonda sem extrato; 2: sonda + EN FS; 3: sonda + EN CS; 4: sonda + EN FT; 5: sonda + EN FT + sonda fria. A seta preenchida indica a sonda livre, enquanto que as setas pontilhadas indicam onde houve retardamento.

*A proteína SBP2 está localizada na região de tecido vascular, consistente com seu envolvimento nos processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose.*

Estudos de imunofluorescência indicam que SBP está associada às células companheiras do floema de tecidos vasculares completamente desenvolvidos (Grimes et al., 1992). No intuito de confirmar a localização celular da proteína SBP2 e verificar se seu acúmulo correlaciona-se com a atividade do

promotor *SBP2* em tecidos específicos, seu cDNA foi fusionado ao gene repórter *GFP* (*green fluorescent protein*), sob controle da região de 2 kb do promotor *SBP2* (Figura 3). Plantas de tabaco foram transformadas com a construção, selecionadas e confirmadas por meio de PCR (dados não mostrados). O acúmulo da proteína *SBP2* foi monitorado através da fluorescência emitida pela proteína *GFP*, através da microscopia confocal, em 10 transformantes independentes. Plantas de tabaco tipo selvagem (WT) foram usadas como controle (Figura 10, l-p). As imagens foram processadas com auxílio do *software* “LSM Image Browser 4” (ZEISS). Foram obtidas imagens com luz de transmissão e laser *argon* ligados simultaneamente, para as plantas *SBP2:GFP* e WT (Figura 10, a-e e l-p, respectivamente). Além disso, para plantas *SBP2:GFP* foram feitas imagens apenas com o laser *argon* ligado (Figura 10, f-j). O laser foi ajustado para se evitar a detecção da autofluorescência do xilema nas plantas controle, e essas mesmas condições foram usadas para a detecção do *GFP*.

No caule, a fluorescência foi detectada na região de tecido vascular, tanto nas células de condução do xilema quanto nas células de sustentação do floema (Figura 10, a e f).

No ápice caulinar, a expressão foi evidente na região do procâmbio, responsável pela formação dos tecidos xilema e floema. Intensa fluorescência foi observada nos tecidos em diferenciação (Figura 10, b e g). O floema pode ser identificado pela presença da placa crivada entre as células (Figura 10, g, indicada pela seta), enquanto que o xilema aparece como uma região de vasos espiralados (Figura 10, g). Em folha, as análises foram feitas na região de nervura, tanto na folha intacta (Figura 10, c, h e n) quanto na folha com a epiderme inferior removida (Figura 10, d, e, i, j, o, p). Nas plantas *SBP2:GFP*, a expressão de *GFP* foi muito intensa na região do xilema, mais precisamente nas

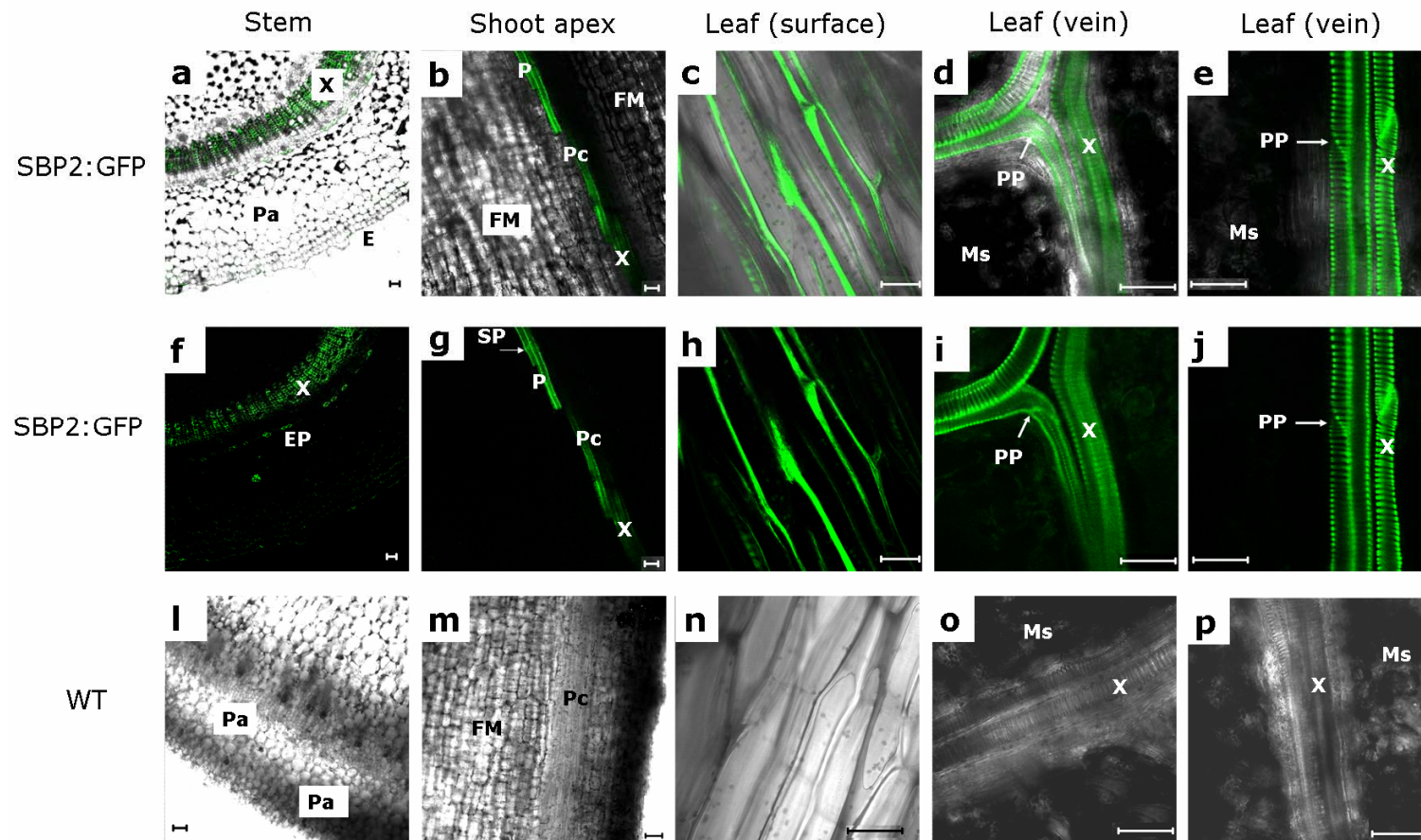


Figura 10- Análise da localização da proteína SBP2 em plantas transgênicas de tabaco. A expressão da proteína SBP2 foi monitorada através da fluorescência emitida pela proteína GFP (*green fluorescent protein*), por meio de microscopia confocal, em caule (a, f, l), ápice caulinar (b, g, m), folha com epiderme (c, h, n) e folha sem epiderme (d, e, i, j, o, p). Pa: parênquima; X: xilema; EP: floema externo; P: floema; Pc: procâmbio; SP: placa crivada; FM: meristema fundamental; Ms: mesofilo; PP: placa de perfuração. Barras = 50  $\mu$ m.

paredes secundárias. Também na placa de perfuração (Figura 10, i e j, indicada pela seta), local de comunicação entre dois elementos de vaso adjacentes, foi observado alto grau de fluorescência.

Coletivamente, esses resultados confirmam que a proteína SBP2 está, de fato, localizada na região de tecido vascular, consistente com o padrão de atividade do gene repórter e com seu envolvimento nos processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose. No entanto, a sua localização precisa, a nível de célula, não foi conclusiva, embora os dados sugiram que SBP2 esteja localizada na região do apoplasto.

#### *Os genes SBP são diferencialmente expressos em órgãos de soja.*

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* é controlada durante o desenvolvimento da planta e obedece à transição de órgãos dreno para fonte (Riesmeier et al., 1993; Truernit and Sauer, 1995). O gene *SBP* é detectado em altos níveis em tecidos dreno, incluindo folhas jovens e cotilédones em diferenciação (Grimes et al., 1992). Por sua vez, o acúmulo da proteína é coordenado com a captação ativa de sacarose (Grimes et al., 1992), embora a proteína seja degradada em sementes de soja em germinação, semelhante às proteínas de reserva (Overvoorde et al., 1997). Da mesma forma, tanto a proteína SBP2 (Pirovani et al., 2002) quanto o seu mRNA (Fontes, dado não publicado), acumulam-se ao longo do desenvolvimento em sementes de soja, indicando que SBP2 está sob o controle temporal durante esse desenvolvimento.

Neste trabalho, a expressão dos genes *SBP1* e *SBP2/S-64* foi analisada em diferentes tecidos de soja (*Glycine max*), variedade CAC-1, e em diferentes

estádios de desenvolvimento, através da reação de polimerização em cadeia em tempo-real (*Real-Time PCR*). Os oligonucleotídeos específicos para *SBP1* não foram efetivos, por problemas de dimerização, e não foram utilizados no experimento. Assim, a análise foi realizada apenas com os oligonucleotídeos gerais para ambas as isoformas (*SBP*) e com os oligonucleotídeos específicos para *SBP2* (*SBP2*). Embora em baixos níveis, foi possível confirmar a expressão dos genes *SBP* nos diferentes órgãos de soja analisados (Figura 11A).

De uma forma geral, a expressão em planta na fase reprodutiva foi superior àquela observada para planta jovem (fase vegetativa). Tal resultado contrasta com a observação de que *SBP* funciona predominantemente no estágio inicial de desenvolvimento da planta, onde a relação dreno:fonte é alta (Waclawovsky et al., 2006b). Entretanto, em planta na fase reprodutiva, a maior expressão ocorreu em folha dreno e raiz, consistente com o envolvimento de *SBP* predominantemente na força do dreno. Provavelmente, a maior eficiência dos oligonucleotídeos *SBP* na quantificação dos transcritos correspondentes está relacionada com sua capacidade em detectar todas as isoformas do gene.

Em semente, os transcritos dos genes *SBP* foram detectados em níveis bastante elevados, havendo um aumento da expressão ao longo do desenvolvimento, com um máximo no quinto estágio, seguido por redução da expressão na semente madura (Figura 11B). Isto indica a existência de um controle temporal da expressão dos genes *SBP* durante o desenvolvimento. Estes resultados quantitativos correlacionam com a alta atividade do promotor *SBP2* em sementes, conforme demonstrado por Contim et al. (2003).

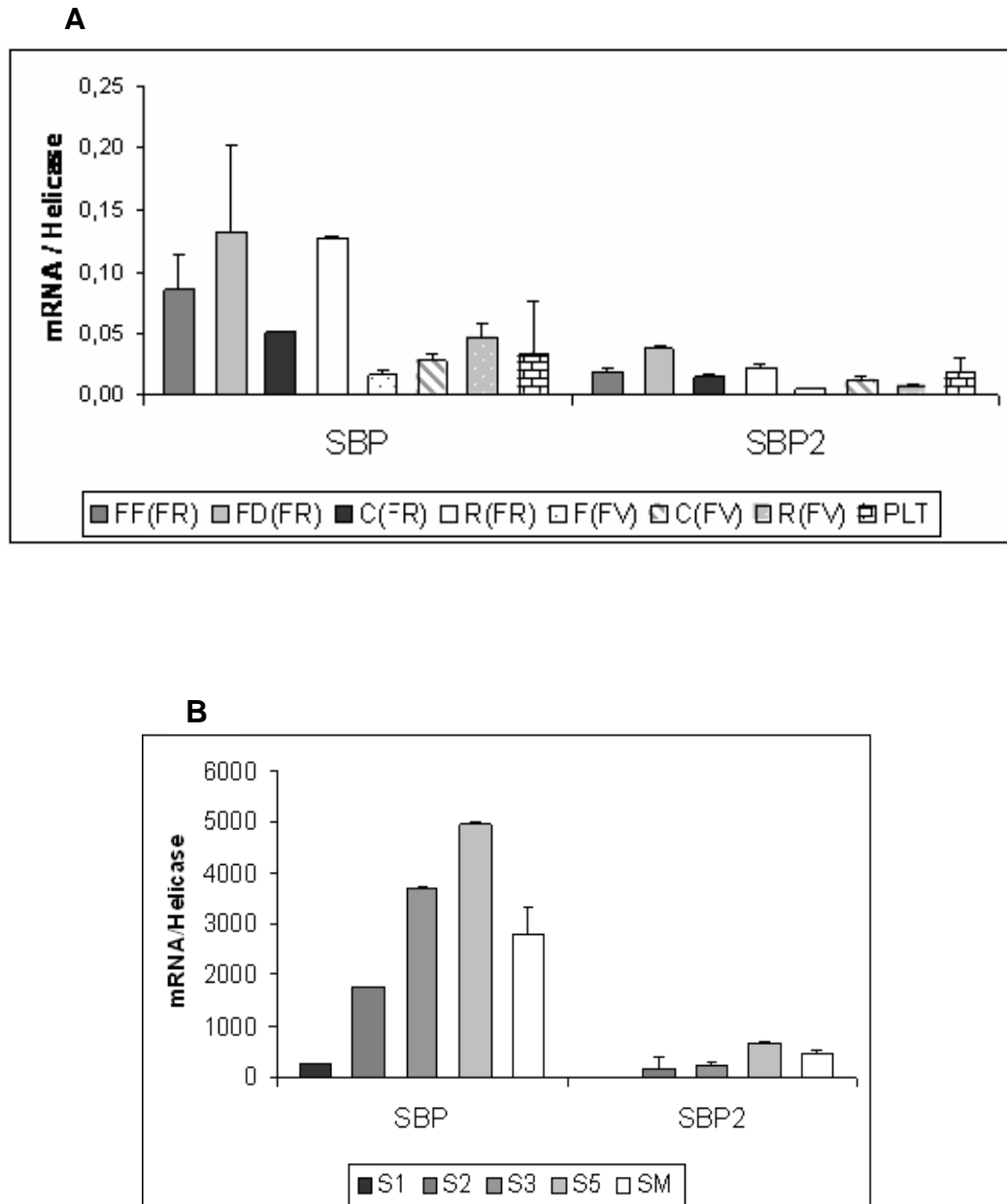


Figura 11 - Análise da expressão dos genes *SBP* em diferentes órgãos de soja, por meio de *Real-Time PCR*. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *SBP2* (*SBP2*) e para ambas as isoformas do gene (*SBP*).

A: A expressão dos genes *SBP* foi verificada em planta na fase reprodutiva (FR) e em planta na fase vegetativa (FV). FF: folha fonte; FD: folha dreno; C: caule; R: raiz; F: folha; PLT: plântula.

B: Expressão de *SBP* em semente de soja em diferentes estádios de desenvolvimento. S1 (primeiro estágio); S2 (segundo estágio); S3 (terceiro estágio); S5 (quinto estágio); SM (semente madura).

## CONCLUSÕES

O promotor do gene *SBP2* (*sucrose binding protein*) de soja apresenta uma estrutura funcional característica de promotores eucarióticos, contendo cis-elementos gerais para atividade do promotor, além de elementos cis-regulatórios, os quais interagem entre si de uma maneira complexa. A região de -2000 a -700 (CRD-A) do promotor *SBP2* contém fortes seqüências repressoras, que restringem a atividade do promotor ao tecido vascular de órgãos vegetativos, prevenindo a expressão gênica em outros tecidos. Experimentos de ganho-de-função revelaram a existência de diversas regiões potencialmente regulatórias no promotor *SBP2*. Na região compreendida entre -1765 e -945 foram encontrados fortes elementos silenciadores para o ápice caulinar, capazes de abolir totalmente a atividade do promotor, enquanto que a região entre -944 e -705 demonstrou conter elementos repressores mais fracos, que restringiram a expressão ao tecido vascular. Para a raiz, foram encontrados silenciadores para o meristema radicular (região entre -1765 e -705) e para a zona de alongamento (de -1765 a -1485 e de -1211 a -945), capazes de abolir a expressão do gene repórter *GUS*, além de um outro repressor, na região de -1765 a -1485, responsável em restringir a expressão ao tecido vascular. Outro cis-elemento negativo foi identificado na região entre -1485 e -1212, tendo sido capaz de restringir a expressão de *GUS* apenas ao floema interno no caule. A análise de funcionalidade dos cis-elementos identificados revelou a interação seqüência-específica entre possíveis transfatores presentes em extratos nucleares de soja e de tabaco e o fragmento -1765/-1485 (fragII) de *GmSBP2*. Finalmente, a correlação entre a atividade do promotor e a localização da proteína *SBP2* foi avaliada. De fato, a proteína *SBP2* está localizada na região de tecido vascular, consistente com o padrão de atividade do gene repórter e com seu envolvimento

nos processos fisiológicos dependentes de translocação de sacarose. No entanto, a sua localização precisa, a nível de célula, não foi conclusiva, embora os dados sugiram que SBP2 esteja localizada na região do apoplasto.

## 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 Physiology**, 126: 1042-1054, 2001.
- 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.
- 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 Molecular Biology**, 50: 757-771, 2002.
- CONTIM, L.A.S., WACLAWOVSKY, A.J., 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 of the *SBP2* promoter. **Journal of Experimental Botany**, 54: 2643-2653, 2003.
- 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.
- DUNWELL, J.M., PURVIS, A., KHURI, S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? **Phytochemistry**, 65: 7-17, 2004.
- ELMER, A., CHAO, W., GRIMES, H. Protein sorting and expression of a unique soybean cotyledon protein, GmSBP, destined for the protein storage vacuole. **Plant Molecular Biology**, 52: 1089-1106, 2003.
- FRÖMMER, W.B., SONNEVALD, U. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. **Journal of Experimental Botany**, 46: 587-607, 1995.
- GAHRTZ, M., STOLZ, J., SAUER, N. A phloem-specific sucrose-H<sup>+</sup> symporter from *Plantago major* L. supports a model of apoplastic phloem loading. **Plant Journal**, 6: 697-706, 1994.

- GRAHAM, I.A. Carbohydrate control of gene expression in higher plants. **Research in Microbiology**, 147: 572-580, 1996.
- GRIMES, H.D., OVERVOORDE, P.J. Functional characterization of sucrose binding protein-mediated sucrose uptake in yeast. **Journal of Experimental Botany**, 47: 1217–1222, 1996.
- GRIMES, H.D., OVERVOORDE, P.J., RIPP, K., FRANCESCHI, V.R., HITZ, W.D. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **The Plant Cell**, 4 (12): 1561-1574, 1992.
- HAJDUCH, M., GANAPATHY, A., STEIN, J.W., THELEN, J.J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiology**, 137: 1397–1419, 2005.
- HO, L.C. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 39: 355-378, 1988.
- KOCH, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 47: 509-540, 1996.
- KRAPP, A., HOLFMANN, B., SCHAFFER, C., STITT, M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis. **Plant Journal**, 3: 817-828, 1993.
- KÜHN, C., QUICK, W.P., SCHULTZ, A., SONNEWALD, U., FROMMER, W.B. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. **Plant, Cell and Environment**, 19: 1115-1123, 1996.
- 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. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 36009-36014, 1999.
- LALONDE, S.L., BOLES, E., HELLMANN, H., BARKER, L., PATRICK, J.W., FROMMER, W.B., WARD, J.M. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. **The Plant Cell**, 11: 707–726, 1999.
- LANNA, A. C. **Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja**. Viçosa: UFV, 84p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

- LEMOINE, R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1465 (1-2): 246-262, 2000.
- LUCAS, W., OLESINSKI, A., HULL, R.J., HAUDENSHIELD, J.S., DEOM, C.M., BEACHY, R.N., WOLF, S. Influence of the tobacco mosaic virus 30 kDa-movement protein on carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. **Planta**, 190: 88-96, 1993.
- MATSUKURA, C., SAITOH, T., HIROSE, T., OHSUGI, R., PERATA, P., YAMAGUCHI, J. Sugar Uptake and Transport in Rice Embryo. Expression of Companion Cell-Specific Sucrose Transporter (OsSUT1) Induced by Sugar and Light. **Plant Physiology**, 124: 85-94, 2000.
- 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.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 5: 473-498, 1962.
- 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. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 15898-15904, 1997.
- OVERVOORDE, P.J., FROMMER, W.B., SPENCER, D. A soybean sucrose binding protein independently mediates non-saturable sucrose uptake in yeast. **The Plant Cell**, 8: 271-280, 1996.
- OVERVOORDE, P.J. & GRIMES, H.D. Topographical analysis of the plasma membrane-associated sucrose binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, 269: 15154-15161, 1994.
- PATRICK, J.W. Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48: 191-222, 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 Science**, 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. **European Journal of Biochemistry**, 269: 3998–4008, 2002.
- POLANCO OTEIZA, R.E. **Identificación y caracterización de proteínas que reconocen a las secuencias promotoras de los genes CS-LCSL y CSMNP1 en forma dependiente de metales en el hongo basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora***. Universidad de Chile. Tese (Doutorado). Universidad de Chile, 2005.
- RIESMEIER, J.W., WILLMITZER, L., FROMMER, W.B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **EMBO Journal**, 13: 1-7, 1994.
- RIESMEIER, J.W., HIRNER, B., FROMMER, W.B. Expression of the sucrose transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. **The Plant Cell**, 5: 1591–1598, 1993.
- RIESMEIER, J.W., WILLMITZER, L., FROMMER, W.B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **EMBO Journal**, 11: 4705–4713, 1992.
- RIPP, K.G., VIITANEN, P.V., HITZ, W.D., FRANCESCHI, V.R. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, 88: 1435–1445, 1988.
- ROCHA, C.S., LUZ, D.F., OLIVEIRA, M.L., PEREIRA, M.C., MEDRANO, F.J., FONTES, E.P.B. Expression of the sucrose binding protein from soybean: Renaturation and stability of the recombinant protein. **Phytochemistry**, 68: 802-810, 2007.
- SALERNO, G.L., CURATTI, L. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? **Trends in Plant Science**, 8: 63-69, 2003.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning - A Laboratory Manual, Ed.2, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1989.
- SAUER, N., STOLZ, J. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*, expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. **Plant Journal**, 6: 67-77, 1994.
- SHEEN, J. Feedback-control of gene-expression. **Photosynthesis Research**, 39: 427-438, 1994.

- STITT, M., KRAPP, A., KLEIN, D., ROPER-SCHWARZ, U., PAUL, M. Carbon partitioning and source-sink interactions in plants. **Currents topics in plant physiology**, 13: 68-77, 1995.
- STITT, M. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plant, Cell and Environment**, 14: 741-762, 1991.
- 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.
- 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. **Journal of Experimental Botany**, 47: 1129-1140, 1996.
- VAN BEL, A.J.E., GAMALEI, Y.V. Ecophysiology of phloem loading in source leaves. **Plant, Cell and Environment**, 15: 265-270, 1992.
- WACLAWOVSKY, A.J., FREITAS, R.L., ROCHA, C.S., CONTIM, L.A.S., FONTES, E.P.B. Combinatorial regulation modules on *GmSBP2* promoter: A distal cis-regulatory domain confines the *SBP2* promoter activity to the vascular tissue in vegetative organs. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1759: 89-98, 2006 (a).
- WACLAWOVSKY, A.J., LOUREIRO, M.E., FREITAS, R.L., ROCHA, C.S., CANO, M.A.O, FONTES, E.P.B. Evidence for the sucrose-binding protein role in carbohydrate metabolism and transport at early developmental stage. **Physiologia Plantarum**, 128: 391-404, 2006 (b).
- WARMBRODT, R.D., VANDERWOUDE, W.J., HITZ, W.D. Studies on the localization of a protein, immunologically similar to a 62 kD sucrose-binding protein isolated from developing soybean cotyledons, in the shoot and root of spinach. **New Phytologist**, 118: 501-512, 1991.
- WARMBRODT, R.D., BUCKHOUT, T.J., HITZ, W.D. Localization of a protein, immunologically similar to a sucrose-binding protein from developing soybean cotyledons, on the plasma membrane of sieve-tube membranes of spinach leaves. **Planta**, 180: 105-115, 1989.
- WILLIAMS, L.E., LEMOINE, R., SAUER, N. Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. **Trends in Plant Science**, 5: 283-290, 2000.

YANAGISAWA, S., SCHMIDT, R.J. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. **Plant Journal**, 17: 209-214, 1999.

YOSHIHARA, T., WASHIDA, H., TAKAIWA, F. A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene, *GluA-3*. **FEBS Letter**, 383: 213-218, 1996.