

JOÃO HELBERT FERREIRA PEDRA

**ESTUDOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA S-64 DA SOJA (*Glycine max*)
POR MEIO DA INIBIÇÃO ANTI-SENDO E SUPEREXPRESSION
SENDO EM TABACO (*Nicotiana tabacum*)
TRANSGÊNICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
DEZEMBRO - 2000

JOÃO HELBERT FERREIRA PEDRA

**ESTUDOS FUNCIONAIS DA PROTEÍNA S-64 DA SOJA (*Glycine max*)
POR MEIO DA INIBIÇÃO ANTI-SENSO E SUPEREXPRESSION
SENSO EM TABACO (*Nicotiana tabacum*)
TRANSGÊNICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 5 de julho de 2000.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Conselheiro)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

Prof. Maurílio Alves Moreira

Prof^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

À minha namorada, Elisa Peixoto.

Aos meus pais, João e Mércia.

Ao meu irmão, Flávio.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao BIOAGRO, pela oportunidade de realizar este Programa.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação, pela valiosa colaboração, pelo respeito demonstrado e pela grande pessoa humana que é.

Aos conselheiros, professor Wagner Campos Otoni e Luiz Orlando de Oliveira, pelas críticas e sugestões.

Aos professores Maurílio Alves Moreira e Marcelo Ehlers Loureiro, membros da banca examinadora, pela disposição, pelas críticas e pelas sugestões.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À minha namorada, Elisa Peixoto, pela paciência e pelo carinho.

Aos funcionários e colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular de Plantas, Cultura de Tecidos e Fisiologia Vegetal, pela valorosa colaboração e pelo companheirismo.

Aos amigos Reginaldo Buzeli e Aloísio Stein, pelo companheirismo e pelo apoio.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JOÃO HELBERT FERREIRA PEDRA, filho de João Diniz Pedra e Mércia Ferreira Pedra, nasceu em 19 de agosto de 1976, em Diamantina - MG.

Em março de 1998, iniciou o Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, obtendo o título de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas em outubro de 1998.

Em outubro de 1998, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 5 de julho de 2000.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Importância da sacarose	5
2.2. O transporte de sacarose em plantas	7
2.3. Transportadores de sacarose	11
2.4. Translocadores de carboidratos nos plastídeos	19
2.5. Metabolismo de sacarose e sua relação com a biossíntese de amido .	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 1	41
EXPRESSÕES SENSO E ANTI-SENSO DE UM GENE HOMÓLOGO À PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À SACAROSE DA SOJA EM TABACOS TRANSGÊNICOS AFETAM O CRESCIMENTO E O PARTICIONAMENTO DE CARBOIDRATOS NAS FOLHAS	41
1. INTRODUÇÃO	41

	Página
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Isolamento de um cDNA homólogo de SBP e construção de seus plasmídeos	45
2.2. Transformação de tabaco	47
2.3. Confirmação da transgenicidade das plantas de fumo por PCR	47
2.4. Produção de anticorpo	48
2.5. SDS-PAGE e análises de “immunoblotting”	49
2.6. Expressão da proteína S-64 em leveduras	49
2.7. Medições fisiológicas	50
2.8. Determinação do teor de açúcares em folhas de tabaco	50
2.9. Determinação de atividades enzimáticas de invertases	50
3. RESULTADOS	51
3.1. Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> com o gene homólogo da proteína de ligação à sacarose da soja	51
3.2. Fenótipos relacionados ao crescimento das plantas transgênicas senso e anti-senso	55
3.3. As expressões senso e anti-senso do gene homólogo de SBP afetam a taxa fotossintética das plantas transgênicas	57
3.4. As expressões senso e anti-senso do gene homólogo de SBP alteram a alocação de carbono em folhas maduras	59
3.5. A atividade enzimática da invertase é alterada em folhas transgênicas	61
4. DISCUSSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPÍTULO 2	74
ANÁLISE FENOTÍPICA DA INIBIÇÃO ANTI-SENDO DO GENE HOMÓLOGO DE SBP NA GERAÇÃO R1 DE TABACOS TRANSGÊNICOS E ESTUDOS DE ENXERTIA	74
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1. Aclimação das plantas transformadas	77

	Página
2.2. Análises de “immunoblotting”	77
2.2.1. Isolamento de proteínas	77
2.2.2. “Western blot”	78
2.3. Determinação dos parâmetros de crescimento e desenvolvimento .	79
2.4. Determinação da matéria seca das partes aérea e radicular dos tabacos transgênicos	79
2.5. Análise de segregação das plantas transgênicas	79
2.6. Obtenção do porta-enxerto contendo plantas transgênicas de tabaco	79
2.7. Avaliação do florescimento em plantas transgênicas de tabaco	80
2.8. Determinação da atividade da enzima redutase do nitrato	80
2.9. Análises estatísticas	81
3. RESULTADOS	82
3.1. Segregação e incorporação do transgene s-64 na geração R1s64 ...	82
3.2. Repressão anti-senso do gene homólogo de SBP	82
3.3. Efeitos fenotípicos da inibição do homólogo de SBP	85
3.4. Análises fisiológicas das linhagens anti-senso R1	87
3.5. Experimentos de enxertia recíproca	90
4. DISCUSSÃO	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
3. RESUMO E CONCLUSÕES	99

EXTRATO

PEDRA, João Helbert Ferreira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2000. **Estudos funcionais da proteína S-64 da soja (*Glycine max*) por meio da inibição anti-senso e superexpressão senso em tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgênico.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Luiz Orlando de Oliveira.

Os processos que regulam a alocação de carbono para os órgãos vegetais e as sementes em desenvolvimento são muito importantes no desenvolvimento das plantas. Na maioria dos vegetais, o nutriente translocado mais importante é a sacarose, e a compreensão da biologia molecular, da bioquímica e da fisiologia de seu transporte é um problema central na biologia vegetal. Recentemente, foi isolado, em um laboratório da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, um cDNA de uma biblioteca de expressão de sementes de soja que codifica um homólogo da proteína de ligação à sacarose (SBP), denominado S-64. Para analisar a função desse homólogo de SBP, tabacos transgênicos foram obtidos, introduzindo-se genes quiméricos que continham a região codificadora do gene s-64, ligado ao promotor 35S-CaMV, na orientação senso ou anti-senso via transformação mediada por *Agrobacterium* sp. O acúmulo do homólogo de SBP aumentou em tabacos que superexpressaram o gene s-64, assim como a expressão anti-senso do gene s-64 levou ao decréscimo nos níveis da proteína endógena. As

plantas anti-senso desenvolveram sintomas característicos de uma inibição do transporte de sacarose à longa distância e apresentaram crescimento e desenvolvimento vegetal reduzidos. Em contraste, as plantas que continham a construção senso revelaram tendência de crescimento mais rápido e aceleração do desenvolvimento floral. O desempenho no desenvolvimento das plantas transgênicas foi correlacionado com a taxa fotossintética, sob condições normais de irradiância. Enquanto a taxa de fotossíntese nas linhagens anti-senso diminuiu, nas linhagens senso ela aumentou. Além disto, tanto a repressão anti-senso quanto a superexpressão senso do homólogo de SBP alteraram o particionamento de carboidratos em folhas maduras. Na geração seguinte, as plantas transgênicas senso e anti-senso revelaram diferentes padrões de expressão do gene s-64. Enquanto nas plantas senso não foi observado aumento no acúmulo da proteína, nas plantas anti-senso uma forte inibição de S-64/SBP persistiu. Além disto, as plantas transgênicas anti-senso R1 tiveram um reduzido crescimento vegetativo e radicular, acompanhado de um florescimento tardio. Seguindo esse padrão, a taxa fotossintética das folhas jovens e maduras diminuiu, o que evidencia uma possível diminuição no carregamento e, ou, descarregamento do floema. Um reduzido peso seco total e radicular, assim como experimentos de enxertia, forneceu evidências de que o gene s-64 está diretamente envolvido no descarregamento do floema. Coletivamente, esses resultados indicam que a proteína S-64 é funcionalmente análoga à proteína de ligação à sacarose e representa um importante componente da via de translocação de sacarose em plantas.

ABSTRACT

PEDRA, João Helbert Ferreira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2000. **Functional studies of the S-64 protein from soybean (*Glycine max* L. Merrill) using the antisense inhibition and overexpression techniques in tobacco transgenic plants (*Nicotiana tabacum*)** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee Members: Wagner Campos Otoni and Luiz Orlando de Oliveira.

The processes that regulate carbon allocation to various organs in the developing seed is very important in plant development. In most plants, the most important translocated nutrient is sucrose and, thus, understanding the molecular biology, biochemistry, and physiology of sucrose transport is a central problem in plant biology. A sucrose binding protein (SBP) homologue, designated S-64, was isolated and transgenic tobacco plants were obtained by introducing chimeric genes containing the S-64 coding region linked to the 35S CaMV promoter, either in the sense or antisense orientation, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The accumulation of the SBP homologue was increased in transgenic plants expressing the heterologous sbp gene, whereas those expressing the antisense construct had reduced levels of the protein. The antisense transgenic plants developed symptoms characteristic of an inhibition of sucrose translocation and displayed a reduction in plant growth and development.

In contrast, overexpression of the protein accelerated plant growth and the onset of flowering induction. The overall developmental performance of the transgenic plants was correlated with their photosynthetic rate under normal conditions. While photosynthesis in the antisense lines was decreased, in the sense lines photosynthetic rates were increased. Furthermore, both antisense repression and overexpression of the SBP homologue in transgenic lines altered carbohydrate partitioning in mature leaves. On the following generation, both sense and antisense plants revealed different S-64 expression patterns. While the sense plants had no overexpression when compared to control plants, the antisense plants was significantly inhibited by the SBP homologue gene. According to previous results, the antisense plants have a reduced vegetative growth accompanied by a late flowering. The photosynthesis was reduced on young and mature leaves from antisense plants supporting a possible decrease on loading and/or unloading of the phloem. A reduced root growth and dry weight, associated with grafting experiments showed strong evidences that gene is directly involved on phloem unloading. Taken together, these results indicate that S-64 protein is functionally analogous to sucrose binding protein, representing an important component of the sucrose translocation pathway in plants.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, no início da década de 70, associado à melhoria de outras técnicas como fermentação, cultura de células e tecidos, transformação e regeneração de plantas, abriu novas possibilidades para a manipulação genética de plantas (MARCATTO, 1997). Atualmente, as universidades e os centros de pesquisas governamentais e privados têm investido nessas tecnologias, para desenvolver produtos melhorados e colocá-los no mercado consumidor (LEWONTIN e BERLAN, 1990). Sendo assim, organismos que secretam fármacos, plantas resistentes a insetos, tomate com maior conservação pós-colheita, microrganismos que produzem hormônios de crescimento humano ou animais transgênicos resistentes a doenças são exemplos de produtos melhorados e, recentemente, lançados no mercado (MARCATTO, 1997).

A engenharia genética de plantas tem sua aplicabilidade na ciência básica, sendo utilizada para a elucidação de funções gênicas, envolvidas em processos celulares básicos. A fisiologia molecular de plantas utiliza as ferramentas advindas da genética e da bioquímica para isolar ou criar mutantes específicos. Essa tentativa tem sido muito empregada para estudar diversos eventos metabólicos que ocorrem na célula vegetal, como fotossíntese, metabolismo de ácidos graxos e carboidratos (SOMMERVILLE, 1986; GIBSON

et al., 1994; STITT, 1995). O isolamento e o seqüenciamento dos genes permitem seu uso direto para alteração dos níveis de expressão *in vivo*. Particularmente relevantes são os resultados obtidos quando são empregados genes identificados como essenciais em determinada rota metabólica. Plantas geneticamente modificadas podem ser produzidas por expressão aumentada ou repressão anti-senso de um certo gene em plantas transgênicas, e o resultado da incorporação é monitorado por genes repórteres e, ou, marcadores de seleção. No caso de expressão aumentada, são empregados, principalmente, genes heterólogos para evitar um fenômeno denominado de co-supressão (JORGENSEN, 1990).

Com base no conhecimento bioquímico do metabolismo de carboidratos e, principalmente, em modelos que discutem os fatores importantes no particionamento de carboidratos entre tecido-fonte e dreno, têm sido identificados passos-chave que controlam o metabolismo de carboidratos. Portanto, por meio de técnicas de biologia molecular associadas à regeneração de plantas, a importância relativa desses pontos regulatórios no metabolismo celular vegetal tem sido avaliada e diagnosticada (STITT, 1995). Os principais trabalhos nessa área estão voltados para a assimilação de carbono nos cloroplastos, a exportação para o citoplasma, a síntese de sacarose, o transporte a curtas distâncias e o carregamento e descarregamento do floema (FRÖMMER e SONNEWALD, 1995; SONNEWALD e WILLMITZER, 1995).

Uma das maiores contribuições para o melhoramento de plantas, visando o aumento da produção, é a alteração nas relações fonte-dreno. Consideráveis avanços têm sido obtidos no sentido de entender a regulação da fotossíntese pelo metabolismo do carbono. O crescimento e o desenvolvimento de organismos superiores dependem de sua capacidade de coordenar processos de desenvolvimento e de se adaptar a mudanças no ambiente. A capacidade que as plantas têm de modular a expressão gênica e o desenvolvimento é um fenômeno ainda pouco conhecido, embora intensivamente pesquisado (BOWLER e CHUA, 1994).

A quantidade de carboidratos é uma fonte de sinalização interna. Altos níveis de carboidratos inibem a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na fotossíntese (SHEEN, 1990) e gluconeogênese (GRAHAM et al., 1994). Por outro lado, ocorre o aumento da expressão de genes envolvidos na assimilação de nitrato, no crescimento, no armazenamento (GRIERSON et al., 1994) e na remobilização de amido durante a germinação (THOMAS e RODRIGUEZ, 1994). As técnicas de biologia molecular e de transformação de plantas tornam possíveis a manipulação específica de certos passos enzimáticos importantes no particionamento de carboidratos, o que pode ser conseguido ao reduzir a expressão de genes endógenos ou ao introduzir genes heterólogos. As relações fonte-dreno podem ser manipuladas quando se modifica a capacidade de armazenamento de carboidratos e altera a distância e o transporte de fotoassimilados. Dentro desse contexto, a identificação e o isolamento de componentes do processo de translocação de sacarose na planta tornam-se relevantes.

O processo que regula a alocação de carbono para os vários órgãos e o desenvolvimento da semente tem impacto direto no desenvolvimento da planta. Na maioria das plantas, a sacarose é o principal nutriente translocado e o entendimento de sua síntese e degradação e de seus mecanismos de transporte à longa distância é um problema central. Em um menor número de espécies vegetais, outros açúcares são transportados, os quais são classificados em dois grupos: os açúcares álcoois (manitol e sorbitol) e as séries de rafinoses (rafinose, estaquiase e verbascose) (ZAMSKI e SCHNAFFER, 1996).

Recentemente, foi isolado de uma biblioteca de expressão de sementes de soja um cDNA que codifica a proteína S-64 (MATRANGOLO, 1998), altamente homóloga à proteína SBP (“Sucrose Binding Protein”), previamente descrita em cotilédones de soja (GRIMMES et al., 1992). Similar à SBP, a proteína S-64 está associada à membrana plasmática, e o gene S-64 provavelmente exibe uma regulação temporal na semente em germinação, coordenada com o período de maior assimilação de sacarose (PIROVANI, 1999). No entanto, a função

biológica de S-64 e seu homólogo SBP na translocação de açúcares ainda não foi completamente elucidada. A identificação de proteínas transportadoras em membranas dentro de um contexto funcional aumentará o conhecimento bioquímico a respeito de transportadores associados a membranas de plantas.

O presente trabalho teve como objetivo principal elucidar a função da proteína S-64 no metabolismo de carboidratos, por meio da tecnologia de inibição anti-senso e superexpressão senso. Diante disto, foi necessária a obtenção de plantas de tabaco transgênicas, pela incorporação do gene S-64 da soja nas orientações senso e anti-senso, para avaliação do efeito da expressão do transgene sobre parâmetros fisiológicos relacionados ao metabolismo de açúcares, crescimento e desenvolvimento da planta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância da sacarose

Sabe-se que essas moléculas são fontes de energia e constituintes estruturais de membranas biológicas. Além disto, podem participar como elementos-chave em vários processos de reconhecimento molecular, incluindo respostas a infecções virais e bacterianas, adesão celular em inflamações e metástase, diferenciação, desenvolvimento, regulação e muitas outras intercomunicações celulares e eventos de transdução de sinal (SEARS e WONG, 1996). A regulação por açúcares proporciona à planta mecanismos valiosos de ajuste às condições ambientais e permite controlar os processos fisiológicos e de desenvolvimento (fotossíntese e florescimento). Recentemente, foi demonstrado que a sacarose, assim como as hexoses, é uma molécula sinalizadora e, ou, reguladora da expressão gênica em diversos processos do metabolismo celular em plantas (Figura 1) (THOMAS e RODRIGUES, 1994; STITT, 1995; CHAN e YU, 1998; CHENG et al., 1999; FARRAR et al., 2000).

Os genes para a fotossíntese são induzidos quando o nível de carboidratos é baixo, enquanto o aumento da concentração de açúcares estimula a expressão de genes envolvidos na sua utilização e no seu armazenamento (ROCHA-SOSA et al., 1989; THOMAS e RODRIGUES, 1994; KOCK, 1996). A sacarose pode

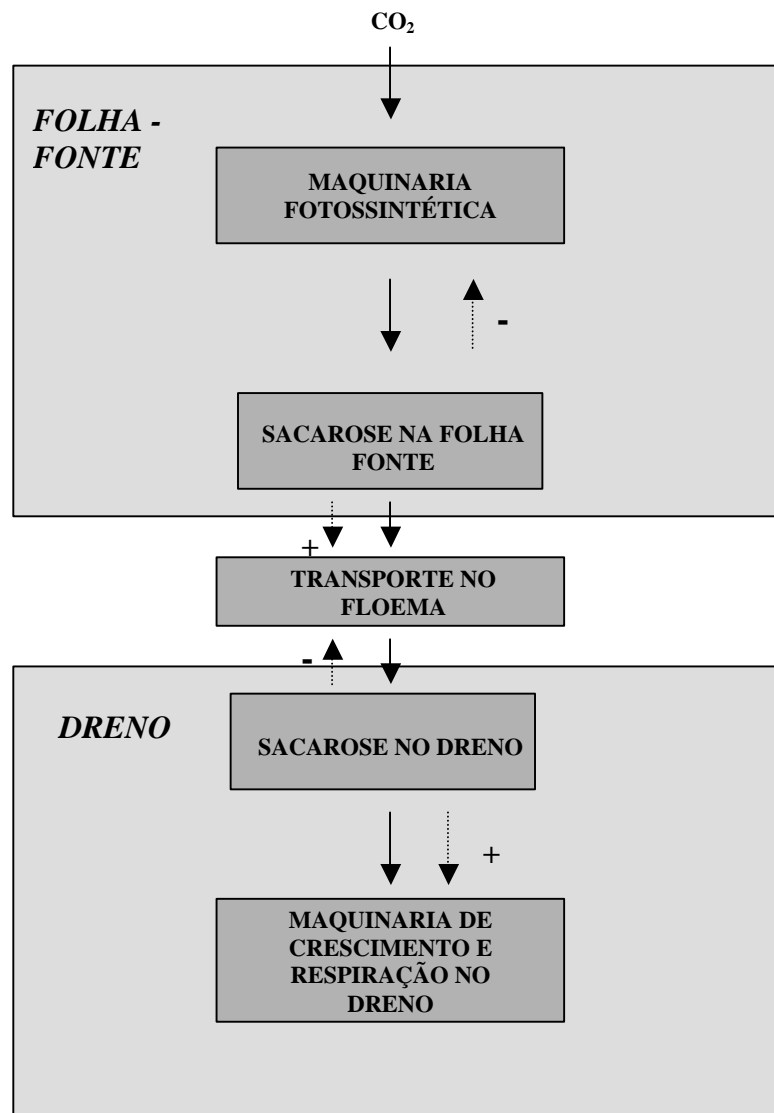


Figura 1 - Hipótese do controle dos processos celulares por sacarose em plantas. As setas não-pontilhadas mostram o fluxo de carbono do ambiente ao tecido-dreno. As setas pontilhadas mostram onde o controle do fluxo pode ocorrer. Os altos níveis de sacarose nas folhas-fonte reduzem a expressão de genes codificadores para proteínas da fotossíntese. Em drenos, os altos níveis de sacarose aumentam a expressão de genes codificadores para a hidrólise de sacarose, a respiração e o crescimento. Esquema modificado de FARRAR et al. (2000).

também reprimir a transcrição de genes fotossintéticos, como a proteína de ligação à clorofila a/b (CAB), ao RUBISCO e à plastocianina (DIJKWELL et al., 1996, 1997).

A sacarose, em especial, tem uma grande importância econômica na agricultura e, como nutriente, na maioria dos organismos vivos. Existe interesse especial nas suas características químicas, na tecnologia de sua produção e no seu uso na alimentação. Trata-se de um açúcar não-redutor, altamente solúvel e quimicamente inerte, quando em contato com proteínas, porque não forma ligações co-valentes com grupos aminos livres. Além disto, em plantas, serve como fonte de energia e substrato para a síntese da parede celular e outros glicosídeos, como amido e frutanos. Embora o excesso de sacarose possa, algumas vezes, se acumular nas folhas, esse dissacarídeo se acumula principalmente nos tecidos de reserva, na forma de amido (STITT, 1990). Os carboidratos de reserva são mobilizados e utilizados durante a germinação, o crescimento e o desenvolvimento de plantas.

2.2. O transporte de sacarose em plantas

Os tecidos e órgãos não-fotossintéticos, incluindo a parte aérea e a raiz, precisam ser abastecidos com carbono fixado. Os açúcares sintetizados nas células do mesófilo servem como o principal produto exportado. Para acomodar o transporte de açúcares à longa distância da fonte para o dreno, as plantas terrestres desenvolveram um tecido vascular especializado (floema). O floema de angiospermas consiste de vários tipos de células, que são intimamente associadas com o xilema nos feixes vasculares (OPARKA e TURGEON, 1999). Existem dois tipos celulares relacionados: as células companheiras e os elementos crivados, que são interconectados pelos plasmodesmos. Enquanto os elementos crivados não possuem núcleo, vacúolos e outras organelas, as células companheiras são caracterizadas pelo denso protoplasma, pelo núcleo e pelas numerosas mitocôndrias (LUCAS et al., 1993).

O transporte de açúcares a longas distâncias, em plantas, depende do estabelecimento e da manutenção de um gradiente de pressão entre o floema da fonte e o floema do dreno. Nesse modelo, amplamente aceito em angiospermas, o deslocamento do açúcar é relativamente passivo, enquanto o carregamento e o descarregamento do floema são ativos e governam a intensidade e a direção do transporte e do fluxo de sacarose. Embora evidências demonstrem a importância da rota simplástica em alguns passos do transporte de fotoassimilados (SCHMALSTIG e GEIGER, 1985; MADORE e LUCAS, 1986), o transporte dos açúcares através do apoplasto tem um importante papel, na maioria dos processos fisiológicos, como transporte extracelular. Nestes casos, as proteínas carreadoras são fundamentais para o transporte de sacarose através da membrana plasmática, desempenhando uma importante função fisiológica na distribuição de carboidratos e, indiretamente, na mobilidade de todos os solutos translocados por fluxo de massa no floema (GALLET et al., 1992).

O influxo de sacarose em cotilédones de soja em desenvolvimento parece apresentar características fisiológicas semelhantes ao influxo de sacarose em discos foliares, em que prótons ou o gradiente eletroquímico são requeridos para a operação e, aparentemente, envolvem uma proteína carreadora (LICHTNER e SPANSWIDK, 1981). Consistente com este mecanismo, tem sido demonstrado que, em espécies que fixam $^{14}\text{CO}_2$, altos níveis de ^{14}C -sacarose são encontrados no apoplasto foliar e que estes níveis são diretamente proporcionais à taxa de fotossíntese (GEIGER et al., 1973).

Além disso, a adição de sacarose no apoplasto (WRIGHT e FISHER, 1981) e no floema isolado (DAIE, 1987; DELROT, 1989) resulta em rápida despolarização da membrana plasmática, o que evidencia que existe um co-transportador sacarose- H^+ na membrana plasmática (WILLIAMS et al., 1990). Esta hipótese foi reforçada com a identificação de uma H^+ -ATPase (AHA3) de *Arabidopsis thaliana*, localizada nas células companheiras do floema e que, provavelmente, gera energia para a atividade secundária de transporte (DEWITT et al., 1991).

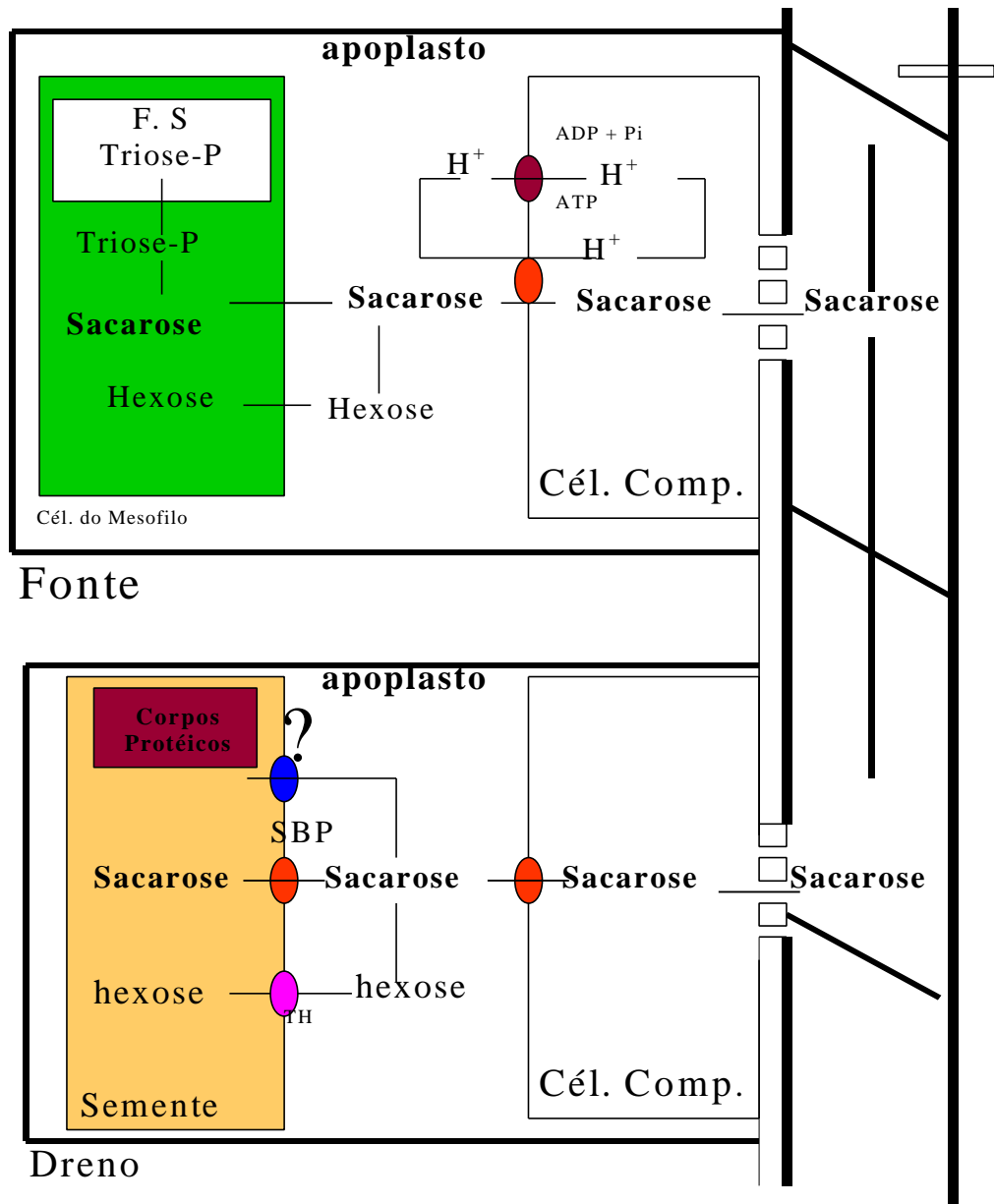


Figura 2 - Translocação de sacarose nos tecidos vegetais em leguminosas. O transporte ocorre basicamente dos tecidos-fonte em direção aos tecidos-dreno e é mediado por proteínas transportadoras, entre elas SBP, pertencente a um grupo de proteínas transportadoras que são independentes de H⁺. Esquema adaptado de FRÖMMER e SONNEWALD (1995).

Outras evidências diretas que suportam um transporte ativo de sacarose através da membrana foram fornecidas por experimentos em que foi usado o impermeabilizante ácido sulfônico p-cloromercuriobenzeno (PCMBS), inibidor da translocação de sacarose durante a fotossíntese (GIAQUINTA, 1976, 1983). Nestes experimentos, PCMBS inibiu fortemente o transporte de sacarose, o que indica que a sacarose é deslocada do apoplasto para o simplasto do floema e que uma proteína está envolvida nesse processo. Complementar a estas observações, estudos em que foram usadas vesículas isoladas de membranas demonstraram que a translocação de sacarose para o interior das vesículas foi dependente de ΔpH e $\Delta\Psi$, coerentemente com o mecanismo de transporte ativo (BUCKHOUT, 1989; BUSH, 1989, 1990; SLONE e BUCKHOUT, 1991). Além disto, a expressão de invertase exógena no compartimento apoplástico de folhas resulta em decréscimo do nível de sacarose no apoplasto do floema (SONNEWALD et al., 1991). Neste caso, a sacarose é clivada em hexoses nas folhas, desaparece o exsudato no tubo de seiva e resulta num fenótipo de crescimento reduzido, em virtude da ineficiência da planta em realizar o carregamento para o floema.

Coletivamente, esses experimentos indicam que ocorrem carreadores ativos de sacarose em plantas superiores. De fato, os genes que codificam para co-transportadores próton/sacarose têm sido isolados, usando um sistema artificial de complementação de função em leveduras mutantes para o gene da invertase (RIESMEIER et al., 1992, 1993; GAHRTZ et al., 1994; SAUER et al., 1994; KUHN et al., 1997; BURCKLE et al., 1998). Entretanto, a existência dessa rota de carregamento apoplástico não exclui a existência de translocação simplástica de sacarose, conforme demonstrado para algumas espécies de plantas, como cucurbitáceas e algumas árvores tropicais de grande porte (MADORE e LUCAS, 1986; VAN BEL et al., 1992).

O cultivo de tecidos foliares por muitas horas em meio simples que contém sacarose induz ao aparecimento de novos sistemas de absorção de sacarose. A localização e a sensibilidade a agentes químicos desses transportadores diferem daqueles encontrados em tecidos frescos (SAKR et al.,

1993). A produção de sacarose nos órgãos-fonte, como folhas maduras, parece regular a taxa e a direção do transporte de assimilados em plantas superiores. Similarmente, a remoção de sacarose nos órgãos-dreno em crescimento é o que fornece a força para a importação de sacarose e determina a taxa relativa de crescimento de órgãos-dreno em competição na planta (STITT, 1996). Uma característica agrônômica das plantas cultivadas que merece atenção é a capacidade de enchimento de grãos, que depende da capacidade de produção de assimilados das folhas maduras e da atividade dos transportadores envolvidos no carregamento e descarregamento do floema. Embora o mecanismo de efluxo de sacarose não seja tão compreendido, os estudos com vesículas de membranas plasmáticas evidenciam que as proteínas que mediam esse efluxo não são as mesmas que mediam a absorção ativa de sacarose (LALOI et al., 1993).

2.3. Transportadores de sacarose

A identificação e a caracterização de proteínas responsáveis pelo transporte de sacarose, através da membrana plasmática de células vegetais, são importantes para o entendimento da regulação do transporte de sacarose. Existem três grupos de proteínas envolvidas no transporte de sacarose. O primeiro é um grupo de proteínas de 36 a 50 kDa, identificado, inicialmente, por DELROT et al. (1991). O segundo é representado por uma proteína com massa estimada em 55 kDa, identificada em ensaios de complementação em levedura deficiente em invertase e que continha o gene para sintase da sacarose da batata. O gene que codifica para essa proteína foi seqüenciado, e verificou-se que a estrutura primária da proteína deduzida apresenta 12 domínios transmembranas (RIESMEIER et al., 1992, 1994). O terceiro grupo é constituído por uma proteína de 62 kDa, inicialmente identificada pela sua forte afinidade de ligação ao análogo de sacarose, 6'-deoxi-6'-(4-azido-2-hidróxi)-benzamido-sacarose e denominada SBP (6'-HABS) (RIPP et al., 1988).

A marcação diferencial com NEM (N-etilmaleimida) indicou a presença de um polipeptídeo de 42 kDa, protegido por sacarose, em frações membranosas de feijão graúdo (PICHELIN-POITEVIN et al., 1987) e folhas de beterraba (GALLET et al., 1989). Os anticorpos contra os polipeptídeos da faixa de 42 kDa da membrana plasmática de beterraba inibiram o transporte de sacarose em protoplastos de feijão graúdo (LEMOINE et al., 1989) e em vesículas de membrana plasmática de beterraba (GALLET et al., 1992). A separação de proteínas da membrana plasmática por filtração gélida e cromatografia de troca iônica, seguida por reconstituição em proteolipossomos, também mostrou que a mais alta atividade de transporte de sacarose estava associada à fração enriquecida com a banda de 42 kDa (LI et al., 1994). Além disso, a transição fonte-dreno em folha de beterraba é acompanhada pelo aparecimento do transportador de sacarose sensível à NEM e da banda adicional da região de 42 kDa da membrana plasmática (LEMOINE et al., 1992). Em bases funcionais, o peptídeo de 42 kDa está envolvido no transporte de sacarose, em raízes e folhas de beterraba (GALLET et al., 1992).

Recentemente, foram isolados cDNAs codificadores de potenciais co-transportadores de próton/sacarose, como: SoSUT1 de espinafre (RIESMEIER et al., 1992), StSUT1 de batata (RIESMEIER et al., 1994), SUC1 e SUC2 de *Arabidopsis thaliana* (SAUER e STOLZ, 1994), e PmSUC1 e PmSUC2 de *Plantago major*, isolados a partir de uma biblioteca de cDNA de tecidos vasculares (GAHRTZ et al., 1994). Todos esses genes são expressos no floema, sendo a expressão de PmSUC2 e StSUT1 restrita especificamente às células companheiras (RIESMEIER et al., 1994; STADLER et al., 1995), conforme demonstrado por hibridização *in situ*. Além disto, a expressão de PmSUC1 é coordenada com o desenvolvimento da semente (GAHRTZ et al., 1996).

A inibição anti-senso do transportador StSUT1 da batata demonstrou que este gene apresenta função vital no carregamento do floema e no particionamento de carboidratos e que ele é essencial para o crescimento e o desenvolvimento normal de plantas de batata (HEINECKE et al., 1992; RIESMEIER et al., 1994).

As plantas de batata que continham a construção anti-senso apresentaram aumento nos níveis de amido e carboidratos solúveis nas folhas e fotossíntese reduzida, quando comparadas com as plantas-controle (RIESMEIER et al., 1994). Por meio da expressão de StSUT1 da batata em oócitos de *Xenopus* sp., combinado com métodos eletrofisiológicos e fluxo de radiotraçadores, foram determinados os efeitos do potencial de membrana e as concentrações externas de sacarose e H^+ na cinética de transporte de StSUT1. O potencial de membrana afetou a taxa máxima de transporte e a afinidade aparente do transportador por sacarose e H^+ . As propriedades cinéticas são consistentes com um modelo ordenado, simultaneamente, com oito estádios, com H^+ ligado ao transportador antes da sacarose, devendo-se ressaltar que ambos são transportados, ao mesmo tempo, através da membrana (BOORER et al., 1996).

Ensaio funcionais de complementação de um mutante artificial de levedura deficiente em invertase de sacarose foram usados para isolar o gene SUT1 do tomate, que codifica um co-transportador próton/sacarose (KÜHN et al., 1996). Diversas linhas de evidência estabeleceram que a função de SUT1 está no carregamento do floema e no transporte à longa distância. Quando expresso em levedura, SUT1 apresentou propriedades bioquímicas similares às aquelas apresentadas pelos transportadores de sacarose envolvidos na absorção de sacarose, em vesículas de membranas plasmáticas de folhas (RIESMEIER et al., 1992,1993). SUT1 é expresso no floema e sua indução é coordenada com o desenvolvimento da capacidade de exportação das folhas. Além disto, a repressão anti-senso de SUT1 em plantas transgênicas inibe a exportação de sacarose das folhas, o que leva ao acúmulo de carboidratos nas folhas e ao comprometimento da dinâmica de crescimento (LEMOINE et al., 1989; DELROT et al.,1989; RIESMEIER et al., 1992). A repressão anti-senso de SUT1 com promotor específico das células companheiras fornece evidência que SUT1 é transcrito nas células companheiras (RIESMEIER et al., 1994).

O padrão de expressão de SUC2 foi avaliado por meio da fusão do promotor de SUC2 com o terminal 5' da β -glucuronidase (TRUERNIT e

SAUER, 1994). Os resultados confirmaram a teoria do carregamento apoplástico do floema, o que evidencia que o promotor do gene SUC2 dirige a expressão para o floema em folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* e que a proteína SUC2 pode estar envolvida não somente no carregamento, como também no descarregamento do floema.

A análise da seqüência de aminoácidos de oito membros da família de transportadores SUT1 de plantas (grupo de transportadores de aproximadamente 55 kDa) (Quadro 1) revelou que eles possuem características estruturais comuns de transportadores de metabólitos. Esta família de proteínas é altamente hidrofóbica, sendo constituída de 12 domínios transmembrana (WARD et al., 1998). A caracterização bioquímica dos transportadores SUT indica que, provavelmente, eles são os componentes do sistema de absorção de sacarose de alta afinidade identificados em plantas (BUSH, 1990). A atividade de transportadores SUT é dependente do pH e é inibida por protonóforos, agentes modificadores de grupos tióis e dietilpirocarbamato.

Um representante do terceiro grupo de proteínas envolvidas no transporte (62 kDa) foi identificado por marcação fotolítica com o derivado da sacarose, 6'-deoxi-6'-(4-azido-2-hidróxi)-benzamido-sacarose (6'-HABS). Esse composto foi sintetizado e utilizado por RIPP et al. (1988), para identificar proteínas de membrana que se ligam à sacarose em preparações microssomais de cotilédones de soja em desenvolvimento (dez dias após florescimento). Os autores demonstraram, previamente, que 6'-HABS se comportava como um inibidor competitivo do influxo de [¹⁴C]sacarose, em protoplastos isolados de cotilédones em desenvolvimento de soja. A marcação fotolítica de proteínas de membrana com ¹²⁵I-6'-HABS resultou na identificação predominante de uma proteína de cerca de 62 kDa, denominada SBP ("Sucrose Binding Protein") (RIPP et al., 1988). A proteína foi purificada de frações membranosas de cotilédones e empregada na produção de anticorpos policlonais. Segundo eles, os anticorpos reconheceram, especificamente, uma proteína da membrana plasmática em sessões preparadas de cotilédones. Em soja, o polipeptídeo de 62 kDa parece

Quadro1 - Família de transportadores de sacarose *SUT1* em plantas

Nome	Fonte	Identidade (%)	Comprimento (aminoácidos)	Número de acesso	Referência
<i>StSUT1</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	100	516 aa	542087	RIESMEIER et al. (1993)
<i>LeSUT1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	94,7	511 aa	575299	FRÖMMER et al., dados não-public.
<i>NtSUT1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	85,8	507 aa	1076644	FRÖMMER et al., dados não-public.
<i>SoSUT1</i>	SPINACEA OLERACEA	65,9	525 aa	549000	RIESMEIER et al. (1992)
<i>BvSUT1</i>	<i>Beta vulgaris</i>	65,1	523 aa	1076259	FRÖMMER et al., dados não-public.
<i>PmSUC2</i>	<i>Plantago</i>	64,7	510 aa	1086253	GAHRTZ et al. (1994)
<i>RcSCR1</i>	<i>Ricinus comunis</i>	64,5	533 aa	542020	WEIG et al. (1996)
<i>AtSUC2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	64,1	512 aa	481131	SAUER e STOLZ (1994)

Fonte: WARD et al. (1998).

estar mais concentrado nas membranas plasmáticas dos tubos crivados (WARMBRODT et al., 1989).

Os anticorpos policlonais contra SBP apresentaram ligações cruzadas com um polipeptídeo de 62 kDa, em vesículas de membrana plasmática purificada de folhas de espinafre (WARMBRODT et al., 1989). Estudos de imunolocalização em folhas totalmente expandidas dessa espécie mostraram que o polipeptídeo está localizado na membrana plasmática dos tubos crivados. O polipeptídeo não foi detectado em folhas jovens, onde o floema não continha elementos maduros. A presença de uma proteína homóloga em *Vicia faba* foi indiretamente confirmada, uma vez que anticorpos contra SBP de soja inibiram a absorção de sacarose em células de transferência (FLEUW et al., 1992). Usando os mesmos anticorpos, estudos imunocitoquímicos falharam em detectar uma proteína homóloga em folhas completamente expandidas de beterraba (WARMBRODT et al., 1989).

O gene *sbp* exibe uma expressão temporal, sendo os transcritos correspondentes detectáveis em altos níveis em tecidos-dreno, incluindo folhas novas em formação, e em cotilédones até o 26^o dia de desenvolvimento da planta (GRIMES et al., 1992). O acúmulo da proteína SBP nas frações membranosas de cotilédones em desenvolvimento de soja é coordenado com o acúmulo do mRNA, estando presente até o 26^o dia de desenvolvimento. Em contraste, OVERVOORDE et al. (1997) demonstraram que SBP é degradada em sementes durante a germinação, em um padrão similar ao das proteínas de reserva. Os dados de imunofluorescência indicam que a SBP está principalmente associada às células companheiras do floema de tecidos vasculares completamente desenvolvidos (GRIMES et al., 1992), mas também às células mesofílicas de folhas-dreno jovens.

A proteína SBP foi localizada na membrana plasmática de células cotiledonares, estando associada às regiões especializadas da membrana plasmática que são invaginadas no citoplasma da célula (RIPP et al., 1988; GRIMES et al., 1992). No entanto, predições com base na seqüência de aminoácidos deduzida indicam que a SBP é uma proteína hidrofílica e não contém nenhum domínio de aminoácidos hidrofóbicos ou α -hélices anfipáticas que formariam domínios transmembrana (GRIMES et al., 1992). Estas observações indicaram que a SBP é uma proteína envolvida no transporte de sacarose, mas não desempenha esta função, independentemente (GRIMES et al., 1992). No entanto, tem sido demonstrado que a expressão do cDNA de SBP em leveduras mutantes para o gene da invertase é suficiente para promover a absorção de sacarose através da membrana plasmática, independentemente de qualquer outro gene da planta (OVERVOORDE et al., 1996). A proteína SBP media a absorção de sacarose em concentrações não-saturáveis de 30 mmol/L, sendo específica para sacarose e relativamente insensível ao tratamento com reagentes sulfidril modificados (DELROT et al., 1991). As alterações do pH externo ou o tratamento prévio das células de levedura com protonóforos não afetou significativamente a taxa de absorção de [¹⁴C]-sacarose. Estes resultados

demonstraram que a SBP media a absorção de sacarose, independente do movimento de H^+ , e que ela, provavelmente, corresponde a uma nova classe de proteínas transportadoras de sacarose, representante do sistema linear de absorção de sacarose em plantas de baixa afinidade (OVERVOORDE et al., 1996; HARRINGTON et al., 1997).

Consistente com o seu envolvimento no transporte de sacarose, o fracionamento da membrana plasmática de cotilédones de soja localizou SBP acoplada à face externa da membrana plasmática (OVERVOORDE e GRIMES, 1994). Estes resultados indicam que a SBP é uma proteína periférica de membrana, tendo uma proporção desta proteína, fortemente ligada à membrana, sido identificada por meio de tratamentos químicos. Esta observação é coerente com a ausência de clivagem do peptídeo sinal de SBP, como demonstrado por meio de tradução e processamento co-traducional *in vitro* da proteína SBP (OVERVOORDE e GRIMES, 1994).

Recentemente, foi isolado, de uma biblioteca de expressão de sementes de soja, um cDNA que codifica a proteína S-64 (MATRANGOLO, 1998), altamente homóloga à proteína SBP. As análises de comparação têm demonstrado que proteínas de reserva (vicilinas e conglicinas) de espécies distantes também possuem uma identidade de seqüência moderada entre S-64 e SBP. A existência de posições de aminoácidos altamente conservadas, como também a conservação parcial entre as estruturas dos exons-introns entre leguminas e vicilinas, evidencia que esses genes são derivados de um ancestral comum, por meio de um evento de duplicação (LAWRENCE et al., 1994). Além disto, foi demonstrado que as proteínas de reserva de plantas podem ser agrupadas juntamente com as proteínas de reserva de fungos envolvidas em mecanismos de dessecação e hidratação. Esses dados indicam a existência de uma superfamília de genes, incluindo vicilinas, leguminas, esferulinas, germinas e proteínas de ligação à sacarose (BAUMLEIN et al., 1994). Comparando a proteína SBP (GRIMES et al., 1992) e as proteínas de reserva de plantas, foi encontrada uma alta correlação entre a SBP e a vicilina de *Theobroma cacao*. Similarmente a diversas vicilinas,

a molécula de SBP contém domínios carboxílicos e aminoterminais relacionados (LAWRENCE et al., 1994). O domínio terminal N contém dois "motifs" CXXXC característicos de inserções N terminais, encontrados na pró-proteína da maioria das vicilinas de 70 KDa (DURE III, 1990), e o peptídeo sinal clivado durante a maturação da proteína SBP é altamente similar ao peptídeo sinal de proteínas de reserva.

É pouco provável que essas similaridades na estrutura primária e, possivelmente, nas estruturas secundária e terciária são o resultado de uma evolução convergente. A conservação de SBP e vicilinas de espécies distantes, assim como a precisa conservação na posição de todos os cinco introns, evidencia que ambos os polipeptídeos e os seus genes são evolutivamente relacionados. O alinhamento de seqüências entre diferentes vicilinas e SBP revela que, ao contrário de vicilinas, a estrutura primária de SBP não apresenta regiões variáveis ricas em E e Q (BRÄUN et al., 1996). Tais resultados demonstram que, possivelmente, as vicilinas sejam derivadas de um ancestral semelhante à SBP, pela inserção de seqüências variáveis de E e Q.

Evidências de que o gene s-64 é funcionalmente análogo à SBP foram obtidas, por meio de absorção de [¹⁴C]-sacarose, em culturas de células transgênicas de fumo que tinham a construção do gene s-64 da soja nas orientações senso e anti-senso (DELÚ-FILHO et al., 2000). O aumento na eficiência de absorção de sacarose nas linhagens senso foi pH independente, contrastando com o sistema de absorção de açúcares mediado por invertases dependentes de pH e transportadores H⁺/Suc. Além disto, a manipulação dos níveis do homólogo de SBP levaram à alteração das atividades de enzimas ligadas à síntese e degradação de sacarose, de modo compensatório. Nas linhagens celulares senso, o aumento do acúmulo de S-64 foi coordenado com o decréscimo da atividade da invertase da parede celular e com o aumento na atividade da sintase da sacarose. Esse ajuste nas atividades de clivagem da sacarose nas linhagens celulares senso é consistente com o aumento na absorção de sacarose. Em contraste, as linhagens celulares anti-senso parecem utilizar o

sistema de absorção de açúcares dependente de invertase como via de transporte predominante, uma vez que o declínio no acúmulo de S-64/SBP foi correlacionado com o aumento da atividade da invertase de parede celular, concomitantemente com o declínio na atividade da sacarose sintase (DELÚ-FILHO et al., 2000). Coletivamente, esses resultados evidenciam que SBP e seu homólogo afetam a absorção de sacarose em células cultivadas.

As análises por centrifugação e eletroforese em gel não-redutor de SDS-poliacrilamida demonstraram que a proteína SBP parece se organizar em complexos oligoméricos, na forma de homodímeros e homotrímeros da proteína (OVERVOORDE et al., 1997). Além disto, ensaios em géis não-redutores com versões truncadas da proteína S-64 (homóloga de SBP), produzidas em bactéria, delimitaram a região fundamental para a formação de homotrímeros entre os aminoácidos 36 e 343 da proteína S-64 (PIROVANI, 1999). Segundo o autor, tanto S-64 isolada de soja quanto a proteína S-64 recombinante produzida em leveduras foram encontradas associadas à membrana plasmática, conforme demonstrado pelo fracionamento celular de cotilédones de soja e de extratos de leveduras transformados em *Pichia pastoris* (PEDRA et al., 2000; CONTIM, 1999). Além disto, ensaios de GTP-Dot blot comprovaram que essa proteína possui atividade de ligação a GTP (PIROVANI, 1999), embora não apresente similaridade de seqüência com nenhuma proteína G de plantas ou animais. Estudos adicionais serão necessários para determinar qual a contribuição bioquímica da atividade de ligação a GTP para a função biológica do homólogo de SBP.

2.4. Translocadores de carboidratos nos plastídeos

A comunicação entre os plastídeos e o citosol ocorre via membrana do plastídeo. A membrana interna do plastídeo contém grande variedade de translocadores, que mediam a troca de metabólitos entre ambos os compartimentos (FLUGGE e WEBER, 1994). O carbono fixado durante o dia pode ser exportado dos cloroplastos para o citosol, onde a síntese de sacarose

acontece, e, em seguida, alocado para os órgãos-dreno, como raízes, sementes, frutos ou tubérculos. A exportação do carbono fixado na forma de triose-fosfato é realizada via translocador de triose-fosfato/fosfato (TPT) e, durante a noite, os produtos da quebra do amido primário são transportados via transportadores de glicose (GPT) (SCHAFFER et al., 1977). Essas organelas também podem estar envolvidas na assimilação do nitrogênio, dos ácidos graxos e de uma série de produtos do metabolismo secundário via translocador de fosfoenolpiruvato (PEP). Os plastídeos de tecidos não-fotossintéticos necessitam importar carbono como fonte de energia para dirigir as vias biossintéticas, como, por exemplo, aminoácidos, ácidos graxos ou amido. A importação de carbono em plastídeos não-fotossintetizantes pode ocorrer na forma de hexoses-fosfato via um transportador de hexose recentemente descoberto, denominado GPT (KAMMERER et al., 1998).

O triose-fosfato/fosfato (TPT) foi o primeiro transportador dos plastídeos a ser descrito em termos de especificidade e constante cinética (FLUGGE, 1985). Ele media o transporte de carbono fixado na forma de triose-fosfato e 3-fosfoglicerato dos cloroplastos para o citosol. Os fotoassimilados são, então, usados para a biossíntese de sacarose e aminoácidos e os fosfatos liberados voltam em direção aos cloroplastos, via TPT, para formação de ATP (Figura 3). Na sua forma funcional, o TPT é um dímero composto de duas subunidades idênticas. Os principais substratos utilizados são o fosfato inorgânico ou a molécula de fosfato ligada a uma cadeia de três carbonos (trioses-fosfato). Sob condições fisiológicas, os substratos são transportados na razão 1:1, em um mecanismo de reação semelhante ao tipo “ping-pong”, e de uma maneira antiporte. Além disto, somente o lado citossólico é sensível a inibidores. Essa assimetria na estrutura do sítio do transporte é ligada a diferenças na afinidade pelo substrato nos dois lados da membrana (cerca de cinco vezes menor no lado do estroma dos cloroplastos) (FLUGGE 1992).

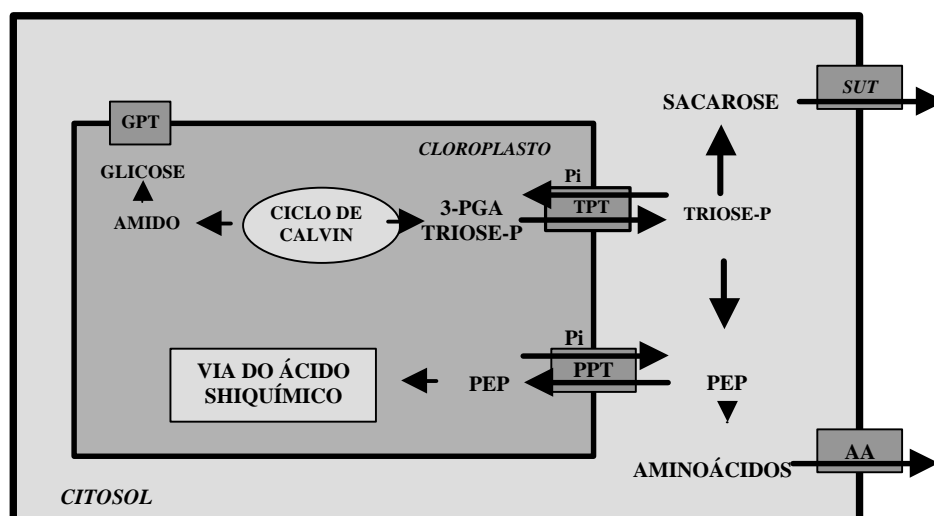


Figura 3 - Transporte mediado pela proteína TPT e PPT. 3-PGA, 3-fosfoglicerato; GPT, translocador de glicose; PPT, translocador de fosfoenolpiruvato; *SUT*, translocador de sacarose; e AAT, translocador de aminoácido. Esquema modificado de FLUGGE (1999).

Os plastídeos não-fotossintetizantes em tecidos heterotróficos são organelas importadoras de carboidratos para a biossíntese de amido ou ácidos graxos. As hexoses resultantes da clivagem da sacarose pela SUS ou invertase são convertidas em hexoses-fosfato e importadas para os plastídeos, abastecendo as várias rotas biossintéticas presentes (Figura 4) (BORCHERT et al., 1993).

Um requerimento para esse mecanismo em plantas é a co-expressão de invertases de plantas com transportadores de monossacarídeos. A atividade de transporte de monossacarídeos tem sido identificada em várias espécies (Quadro 2). Os principais substratos eficientemente transportados são glicose, manose, frutose e ribose. O padrão de expressão de vários transportadores de monossacarídeos indica que essas proteínas de membrana funcionam na absorção de hexoses em tecidos-dreno (SAUER e STADLER, 1993). A atividade desses transportadores pode ser afetada por sinais derivados de infecção por patógenos ou por ferimento, o que conduz à realocação do carbono fixado. A expressão de transportadores de monossacarídeos em tecidos-dreno suporta o mecanismo

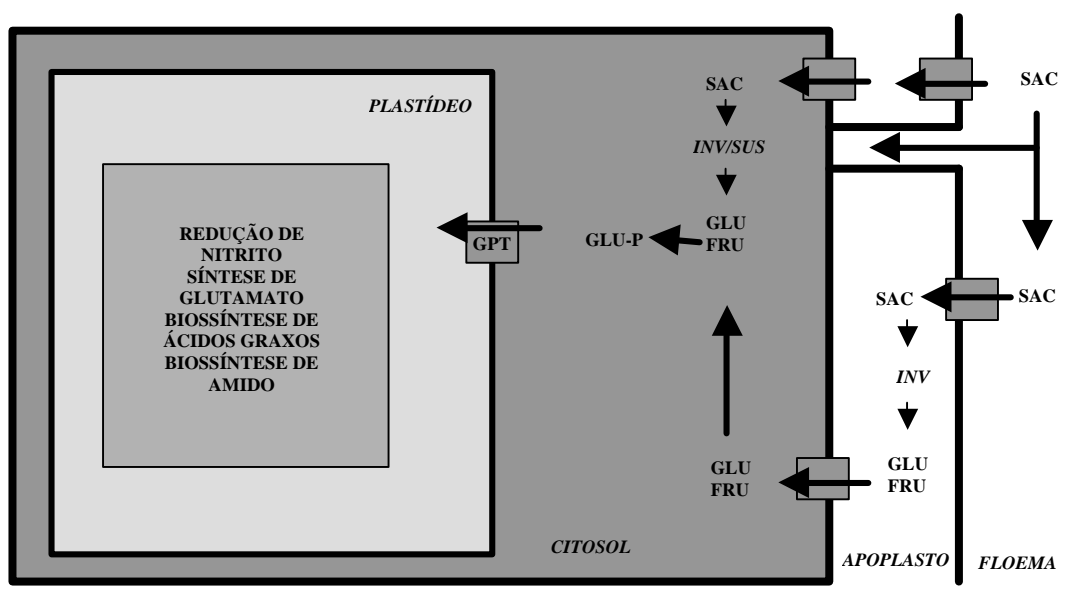


Figura 4 - Função proposta para GPT em tecidos heterotróficos. GPT, translocador de glicose; SAC, sacarose; GLU, glicose; GLU-P, glicose-fosfato; FRU, frutose; INV, invertase; e SUS, sacarose-sintase. Esquema modificado de FLUGGE (1999).

Quadro 2 - Família de genes transportadores de monossacarídeos em plantas

Nome	Espécie	Número de Acesso	Comprimento (Aminoácidos)
AtSTP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X55350	522
AtSTP3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ002399	514
AtSTP4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X66857	514
BvMST1	<i>Beta vulgaris</i>	U64902	549
BvMST2	<i>Beta vulgaris</i>	U64902	545
BvMST3	<i>Beta vulgaris</i>	U43629	690
VfHext	<i>Vicia faba</i>	Z93775	516
RcSTC	<i>Ricinus comunis</i>	L08196	523

Fonte: LALONDE et al. (1999).

apoplástico para o floema ou o descarregamento pós-floema mediado por invertase (EHNESS e ROITSH, 1997).

2.5. Metabolismo de sacarose e sua relação com a biossíntese de amido

Os principais passos controladores da biossíntese de sacarose são as interconversões entre a frutose-1,6-bisfosfato à frutose-6-fosfato, a formação de sacarose-6-fosfato a partir de UDP-glicose e frutose-6-fosfato e a defosforilação da sacarose-6-fosfato, produzindo sacarose. Os dois últimos passos são catalisados pelas enzimas-sintase da sacarose-fosfato (SPS) e fosfatase da sacarose-fosfato (SPP) (HUBER e HUBER, 1992a).

Algumas observações indicam que a reação catalisada pela SPS é o principal sítio controlador de síntese de sacarose nas folhas (HUBER e HUBER, 1990). As alterações na atividade de SPS estão correlacionadas com as taxas de síntese e a exportação de sacarose. Em soja, a atividade da SPS está correlacionada com as taxas de exportação de fotoassimilados das folhas-fontes (HUBER e ISRAEL, 1982), e as alterações na atividade de SPS são coordenadas com as alterações no particionamento durante o fotoperíodo (HUBER, 1995).

A enzima SPS é regulada em três níveis: a) de acordo com o desenvolvimento da planta; b) alostericamente, pelo ativador glicose-6-fosfato e o inibidor fosfato inorgânico; e c) co-valentemente, pela fosforilação, o que leva à inativação e altera a afinidade para efetores alostéricos (HUBER e HUBER, 1992). Em folhas, as mudanças na taxa de síntese de sacarose estão associadas com o estado de ativação da SPS. As propriedades regulatórias não parecem ser conservadas entre diferentes espécies. A SPS também tem uma importante função em tecidos não-fotossintetizantes, onde é determinante na taxa de concentração de sacarose (WEBER et al., 1996).

A enzima-sintase da sacarose (SUS) catalisa a degradação de sacarose, produzindo frutose, e leva à formação do derivado de hexose rico em energia (UDP-glicose). *In-vitro*, essa conversão é reversível, mas *in-vivo* essa reação está

envolvida na quebra de sacarose. Uma das maiores funções da SUS é direcionar a sacarose para a síntese de amido (CHOUREY e NELSON, 1976; CLAUSSEN et al., 1985; DOEHLERT, 1990). Nesse processo, a UDP-glicose produzida é convertida pela UDP-glicose pirofosforilase em glicose-1-fosfato, para produção de ADP-glicose, substrato da síntese do amido. A atividade da sacarose-sintase também está associada com o fornecimento de UDP-glicose, para a biossíntese da parede celular (HENDRIX et al., 1990) e o aumento do fluxo de carbono para via de respiração (BLACK et al., 1987; FARRAR e WILLIAMS, 1990). Uma outra função desempenhada por essa enzima é o catabolismo de sacarose nas células companheiras. O ATP formado é usado para gerar um gradiente de próton pela membrana plasmática, que é requerido para carregar a sacarose para o floema via co-transportador de próton/sacarose. A sacarose-sintase está envolvida no aumento da demanda glicolítica durante a anaerobiose, o estresse por frio (HESSE e WILLMITZER, 1996; STURM et al., 1999) e por hipoxia (SACHS et al., 1996), o estresse hídrico (GEIGENBERGER et al., 1997) e o estresse salino (BALIBREA et al., 1996) e no aumento pela demanda de fixação de nitrogênio em nódulos de raiz de soja (KUSTER et al., 1993).

A sintase da sacarose tem importante papel na regulação da importação da sacarose em tecidos-dreno. A atividade da SUS aumenta após a antese e declina em níveis não-detectáveis no final do processo de maturação do fruto (DEMNITZ-KINH, 1993). Este padrão de atividade da SUS ocorre paralelamente ao acúmulo de amido (ROBINSON et al., 1988), apresentando uma linearidade com a taxa de crescimento relativo (SUN et al., 1992) ou com o acúmulo de matéria seca nos diferentes tecidos do fruto (DEMNITZ-KINH, 1993). Segundo o autor, a atividade da SUS estimada sob condições ótimas é bem menor que a necessária para o importe de sacarose, portanto, a degradação de sacarose pela SUS pode ser o passo limitante na assimilação de açúcares pelos frutos. Em contraste, em dicotiledôneas a enzima invertase não parece limitar a importação de sacarose, por diversas razões: a) a atividade da invertase ácida não altera, ou altera muito pouco, com o acúmulo de matéria seca no fruto (SUN et

al., 1992; WANG et al., 1993); b) a atividade diferencial da enzima durante a maturação dos frutos afeta principalmente o acúmulo de hexose e muito pouco a taxa de importação de assimilados (STOMMEL, 1992); e c) a atividade da invertase ácida em diferentes tecidos do fruto em desenvolvimento é muito maior que o requerido para a hidrólise de toda sacarose importada, não sendo, portanto, um passo limitante (DEMNITZ-KINH, 1993).

Duas substâncias osmoticamente ativas parecem regular a abertura e o fechamento de estômatos. O potássio tem um papel fundamental na abertura de estômatos pela manhã, enquanto a sacarose desempenha essa função durante a tarde. TAIZ e ZEIGER (1996) verificaram o acúmulo dessas duas substâncias, durante o dia, em *Vicia faba*. O potássio tem um acúmulo maior durante a manhã, e sua concentração diminui drasticamente durante a tarde, exercendo um controle mínimo na abertura de estômatos. A concentração de sacarose é maior durante a tarde, o que faz dessa molécula um regulador em potencial da abertura estomática nesse período. Recentemente, foi descrita uma nova função para a SUS na osmorregulação das células-guarda (TAIZ e ZEIGER, 1996). A hidrólise da sacarose por meio da sacarose-sintase parece exercer controle na abertura do estômato, uma vez que a concentração de hexoses não parece exercer função importante no ciclo estomático (LU et al., 1997). Desta maneira, a atuação da sacarose-sintase regula a concentração de sacarose no estômato, contribuindo para o fechamento de estômatos. No entanto, estudos posteriores precisam ser feitos, para elucidar essa relação.

Publicações mais recentes abrem novas perspectivas sobre a atividade e a localização da sintase da sacarose na célula. HUBER et al. (1996) demonstraram que algumas isoformas podem ser fosforiladas por uma quinase dependente de cálcio, o que reduz o Km da enzima. Uma associação da SUS com a membrana plasmática foi primeiramente observada em folhas de milho (CARLSON e CHOUREY, 1996), onde ambas as isoformas estão intimamente associadas à membrana e, também, se encontram na fração solúvel. Uma região de cerca de 20 aminoácidos na SUS1 e duas regiões nas isoformas de SUS2 foram

identificadas como potenciais domínios para ancoragem na membrana plasmática. WINTER et al. (1998) relataram que a SUS tem atividade de ligação à actina, o que possibilita a participação dessa enzima com a sintase da celulose na disposição dos microtúbulos, afetando a disposição das fibrilas de celulose.

As invertases, enzimas que hidrolisam a sacarose em monossacarídeos, estão presentes em suas múltiplas formas na maior parte dos tecidos vegetais, em duas classes, diferenciadas pelo seu pH ótimo de atuação. Uma invertase neutra é localizada no citoplasma e tem seu ótimo de atividade em pH 7,0, já outras invertases ácidas, com pH ótimo em torno de 5,0, são encontradas no vacúolo e apoplasto (STITT,1995). Os altos níveis de invertases ácidas são características de tecidos em crescimento (caules, folhas e sementes). A invertase neutra tem sido purificada e caracterizada em um pequeno número de casos, como em laranja e em soja, mas ainda são necessários mais estudos para elucidar sua função. Plantas de fumo transgênicas que expressam invertase de levedura no apoplasto foram usadas para avaliar o papel da rota apoplástica de carregamento e descarregamento de sacarose (VON SCHAEWEN et al., 1990; SONNEWALD et al., 1991; DICKINSON et al., 1991; HEINECKE et al., 1992). Essas plantas transformadas apresentaram mudanças morfológicas nas folhas, redução na taxa de fotossíntese e aumento da respiração.

O amido é o mais importante carboidrato de reserva em plantas, e um grande número de enzimas está envolvido em sua biossíntese e degradação. É acumulado em quase todos os órgãos vegetais, especialmente em folhas e órgãos de reserva, como sementes, frutos e tubérculos. Em folhas, o amido representa uma reserva temporária, sendo freqüentemente acumulado em um padrão diurno, alternando a síntese e a degradação com o ciclo de luz/escuro (FONDY et al., 1992). Os órgãos de reserva acumulam amido continuamente, durante longos períodos (BUCHNER et al., 1996).

A enzima plastidial ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) catalisa a conversão de glicose-1-fosfato em ADP-glicose, substrato para a sintase do amido. A enzima AGPase é ativa em órgãos que sintetizam amido, sendo o

principal sítio regulador nesta via de biossíntese (DICKINSON e PREISS, 1969). Mutantes, deficientes em AGPase, mostram um significativo decréscimo na síntese do amido. Uma outra linha de evidência para o papel único de AGPase na síntese de amido foi demonstrada em tomateiros transgênicos (WEBER et al., 1995). A repressão dessa enzima pela inibição anti-senso resultou em inibição completa do acúmulo de amido em tubérculos de batata. Por outro lado, a superexpressão dessa enzima causou um grande acúmulo de amido em tecidos de fumo e batata. A fase da síntese do amido ocorre nos estádios intermediários do desenvolvimento da semente. Os cotilédones recebem carboidratos, principalmente na forma de sacarose do floema. A sacarose é hidrolisada no citosol pela SUS, e as hexoses-fosfato formadas por meio de um translocador de Pi são transportadas para os amiloplastos, onde a síntese do amido é catalisada pela AGPase, pela sintase do amido e pelas enzimas ramificadoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALIBREA, M.E., CRUZ, A.M.S., BOLARIN, M.C., PEREZALFOCEA, F. Sucrolytic activities in relation to sink strenght and carbohydrate composition in tomato fruit growing under salinity. **Plant Science**, v.118, p.47-55, 1996.
- BAUMLEIN, H., BRAUN, H., KAKHOVSKAYA, T.A., SHUTOV, A.D. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. **Journal of Molecular Evolution**, v.41, p.1070-1075, 1994.
- BLACK, C.C., MUSTARDY, L., SUNG, S.S., KORMANIK, P.P., XU, D.P., PAS, N. Regulation and roles for alternative pathways of hexose metabolism in plants. **Physiologia Plantarum**, v.69, p.387-394, 1987.
- BLÁSQUEZ, M.A., GREEN, R., NILSSON, O., SUSSMAN, M.R., WEIGEL, D. Giberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *leafy* promoter. **The Plant Cell**, v.10, p.791-800, 1998.
- BOORER, K.J., LOO, D.D.F., FRÖMMER, W.B., WRIGHT, E.M. Transport mechanism of the cloned potato H⁺/sucrose cotransporter *StSUT1*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.25139-25144, 1996.
- BORCHERT, S., HARBORTH, J., SCHUNEMANN, D., HOFERICHTER, P., HELDT, H.W. Studies of the enzymatic capacities and transport properties of pea root plastids. **Plant Physiology**, v.101, p.303-312, 1993.
- BOWLER, C., CHUA, N.H. Emerging themes of plant signal transduction. **The Plant Cell**, v.6, p.1529-1541, 1994.

- BRÄUN, H., CZIHAL, A., SHUTOV, A.D., BÄUMLEIN, H. A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose binding proteins. **Plant Molecular Biology**, v.31, p.35-44, 1996.
- BUCHNER, P., BORISJUK, L., WOBUS, U. Glucan phosphorylases in *Vicia faba* L.: cloning, structural analysis and expression patterns of cytosolic and plastidic forms in relation to starch. **Planta**, v.199, p.64-73, 1996.
- BUCKHOUT, T.J. Sucrose transport in isolated plasma membrane vesicles from sugar beet leaves. **Planta**, v.178, p.133-150, 1989.
- BURCKLE, L., HIBBERD, J.M., QUICK, W.P., KUHN, C., HIRNER, B., FRÖMMER, W.B. The H⁺/Sucrose co-transporter *NtSUT1* is essential for sugar export from tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.118, p.59-68, 1998.
- BUSH, D.R. Proton-coupled sucrose transport in plasmalemma vesicle isolated from sugar beet leaves. **Plant Physiology**, v.89, p.1318-1323, 1989.
- BUSH, D.R. Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. **Plant Physiology**, v.93, p.1590-1596, 1990.
- CARLSON, S.J., CHOUREY, P.S. Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. **Molecular and General Genetics**, v.252, p.303-310, 1996.
- CHAN, M.T., YU, S.M. The 3' untranslated region of rice α amilase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. **Proceedings of National Academy of Science**, v.95, p.6543-6547, 1998.
- CHENG, W.H., TALIERCIO, E.W., CHOUREY, P.S. Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. **Proceedings of National Academy of Science**, v.96, p.10512-10517, 1999.
- CHOUREY, P.S., NELSON, O.E. The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutations in maize. **Biochemistry Genetics**, v.14, p.1041-1055, 1976.
- CLAUSSEN, W., HAWKER, J.S., LOVEYS, B.R. Comparative investigations on the distribution of sucrose synthase activity and invertase activity within growing mature and old leaves of some 3-carbon photosynthetic pathway plant species. **Physiologia Plantarum**, v.65, p.275-280, 1985.

- CONTIM, L.A.S. **Expressão heteróloga do gene S-64 de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em leveduras (*Pichia pastoris*): modificação pós-traducional da proteína recombinante.** Viçosa-MG: UFV, 1999. 57p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- DAIE, J. Sucrose uptake in isolated phloem of celery is a single saturable system. **Planta**, v.171, p. 474-482, 1987.
- DELROT, S. Phloem loading in transport of photoassimilates. In: BAKER, D.A., MILBUM, J.A. (Eds.) **Milbum**. London: Logman Scientific, p.167-205, 1989.
- DELROT, S., GALLET, O., LI, Z.S. **Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation.** Nantes: Quest Editions, p.154-166, 1991.
- DELÚ-FILHO, N., PEDRA, J.H.F., MATRANGOLO, F.S.V., PIROVANI, C.P., OTONI, W.C., FONTES, E.P.B. A sucrose binding protein homologue from soybean affects sucrose uptake in transgenic tobacco suspension-cultured cell. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, n.5, p.1-9, 2000.
- DEMnitz-KING, A.C. Sucrose metabolism in relation to import and compartmentation of carbohydrates in developing tomato fruit. **Plant Physiology**, v.95, p.420-425, 1993.
- DEWITT, N.D., HARPER, J.F., SUSSMAN, M.R. Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. **Plant Journal**, v.1, p.121-128, 1991.
- DICKINSON, O.B., PREISS, J. ADP-Glicose pirofosforilase in shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize endosperm. **Plant Physiology**, v.44, p.1058-1062, 1969.
- DICKINSON, S., ALTABELLA, T., CHRISPPEELS, M. Slow growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplastic invertase. **Plant Physiology**, v.95, p.420-425, 1991.
- DIJKWELL, P.P., KOCK, P., BEZEMER, R., WEISBEEK, P.J., CHUA, N.J., SMEEKENS, S.C.M. Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of the plastocyanin gene in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, v.110, p.455-463, 1996.

- DIJKWELL, P.P., HUIJSER, C., WEISBEEK, P.J., CHUA, N.J., SMEEKENS, S.C.M. Sucrose control of phytochrome A signaling in arabidopsis. **The Plant Cell**, v.9, p.583-595, 1997.
- DOEHLERT, D. Distribution of enzymatic activities within the developing maize (*Zea mays*) kernel in relation to starch, oil, and protein accumulation. **Physiologia Plantarum**, v.78, p.560-576, 1990.
- DURE III, L. An unstable domain in the vicilin genes of higher plants. **New Biologist**, v.2, p.487-493, 1990.
- EHNESS, R., ROITSCH, T. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. **Plant Journal**, v.11, p.539-548, 1997.
- FARRAR, J.F., POLLOCK, C., GALLAGHER, J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, v.154, p.1-11, 2000.
- FARRAR, J.F., WILLIAMS, J.H.H. Control of the rate of respiration in roots: compartmentation, demand and the supply of substrate. In: MEMMES, M. (Ed.) **Compartmentation of metabolism**. London: Butterworths, p.167-188, 1990.
- FLEUW, S., FRANCECHI, V.R., W.D., PATRICK, J.W. Antibody against the sucrose binding protein specifically inhibits sucrose-proton symport by transfer cell protoplasts of developing *Vicia faba* L. seed. **Plant Physiology**, v.99, p.30-40, 1992.
- FLUGGE, U.I. Phosphate translocators in plastids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.27-45, 1999.
- FLUGGE, U.I., WEBER, A. A rapid method for measuring organelle-specific substrate transport in homogenates from plant tissues. **Planta**, v.194, p.181-185, 1994.
- FLUGGE, U.I. Reaction mechanism and asymmetric orientation of the reconstituted chloroplast phosphate translocator. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1110, p.112-118, 1992.
- FLUGGE, U.I. Hydrodynamics properties of the triton X-100 solubilized chloroplast phosphate translocator. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.815, p.299-305, 1985.

- FONDY, B.R., GEIGER, D.R., SERVAITES, J.C. Photosynthesis, carbohydrate metabolism, and export in *Beta vulgaris* L. and *Phaseolus vulgaris* L. during square and sinusoidal light regimes. **Plant Physiology**, v.89, p.396-402, 1992.
- FRÖMMER, W.B., SONNEWALD, U. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.587-607, 1995.
- GAHRTZ, M., STOLZ, J., SAUER, N. A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. **Plant Journal**, v.6, p.697-706, 1994.
- GAHRTZ, M., SCHMELZER, E., STOLZ, J., SAUER, N. Expression of the PmSUC1 sucrose carrier of *Plantago major* L. is induced during seed development. **Plant Journal**, v.9, p.93-100, 1996.
- GALLET, O., LEMOINE, R., LARSSON, C. The sucrose carrier of the plant plasma membrane: differential affinity labeling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.978, p.56-64, 1989.
- GALLET, O., LEMOINE, R., GAILLARD, C. Selective inhibition of active uptake of sucrose into plasma membrane vesicles by polyclonal sera directed against a 42 kilodalton plasma membrane polypeptide. **Plant Physiology**, v.98, p.17-23, 1992.
- GEIGENBERGER, P., REINHOLZ, R., GEIGER, M., MERLO, L., CANALE, V., STITT, M. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. **Planta**, v.201, p.502-518, 1997.
- GEIGER, D.R., GIAQUINTA, R.T., SOVONICK, S.A. Solute distribution in sugar beet leaves in relation to phloem loading and translocation. **Plant Physiology**, v.54, p.892-898, 1973.
- GIAQUINTA, R.T. Evidence for phloem loading from the apoplast, chemical modification of membrane sulfhydryl groups. **Plant Physiology**, v.57, p.872-875, 1976.
- GIAQUINTA, R.T. Phloem loading of sucrose. **Annual Review of Plant Physiology**, v.34, p.347-387, 1983.
- GIBSON, S., FALCONE, D.L., BROWSE, J., SOMMERVILLE, C. Use of transgenic plants and mutants to study the regulation and function of lipid composition. **Plant Cell and Environment**, v.17, p.627-637, 1994.

- GRAHAM, L.A., DEUBY, K.J., LEAVER, C.J. Carbon catabolite repression regulates glyoxalate cycle gene expression in cucumber. **The Plant Cell**, v.6, p.761-777, 1994.
- GRIERSON, C., DU, J.S., DE TORRES ZABALA, M., SMITH, C., HOLDSWORTH, M., BEVAN, M. Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. **Plant Journal**, v.5, p.815-826,1994.
- 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**, v.4, p.1561-74, 1992.
- HARRINGTON, G.N., FRANCESCHI, V.R., OFFLER, C.E., PATRICK, J.W., HARPER, J.F., FRÖMMER, W.B., TEGEDER, M., HITZ, W.D. Cell specific expression of three genes involved in plasma membrane sucrose transport in developing *Vicia faba* seed. **Protoplasma**, v.197, p.160-173, 1997.
- HEINECKE, D., SONNEWALD, U., BÜSSIS, D., GÜNTER, G., LEIDREITER, K., WILKE, I., RASCHKE, K., WILLMITZER, L., HELDT, H.W. Apoplastic expression of yeast-derived invertase in potato. **Plant Physiology**, v.100, p.301-308, 1992.
- HENDRIX, D.L. Carbohydrates and carbohydrates enzymes in developing cotton ovules. **Physiologia Plantarum**, v.78, p.85-92, 1990.
- HESSE, H., WILLMITZER, L. Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Molecular Biology**, v.30, p.863-872, 1996.
- HUBER, S.C., ISRAEL, D. Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybeans leaves. **Plant Physiology**, v.69, p.691-696, 1982.
- HUBER, S.C., HUBER, J.L. Regulation of maize leaf sucrose-phosphate synthase by protein phosphorylation. **Plant Cell Physiology**, v.32, p.319-326, 1990
- HUBER, S.C., HUBER, J.L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, v.99, p.1275-1278, 1992a.

- HUBER, S.C., HUBER, J.L., CAMPBELL, W.H., REDINBAUGH, M.G. Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.296, p.58-65, 1992b.
- HUBER, S.C. C- and N-metabolism: control of sucrose metabolism and nitrate assimilation by reversible protein phosphorylation. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, 1995. Lavras-MG, ESAL. **Anais...** Lavras: ESAL, 1995, p.111-118.
- HUBER, S.C., HUBER, J.L., LIAO, P.C., GAGE, D.A., McMICHAEL, R.W., JR, C.P.S., HANNAH, L.C., KOCH, K. Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in-vivo and possible regulatory significance. **Plant Physiology**, v.112, p.793-802, 1996.
- JORGENSEN, R. Altered gene expression in plants due to trans-interactions between homologous genes. **Trends in Biochemistry**, v.8, p.340-345, 1990.
- KAMMERER, B., FISCHER, K., HILPERT, B., SCHUBERT, S., GUTENSON, M. Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. **The Plant Cell**, v.10, p.105-117, 1998.
- KOCK, K.E. Carbohydrates modulate gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.509-540, 1996.
- KÜHN, C., QUICK, W. P., SCHUIZ, A., SONNEWALD, U., FRÖMMER, W. B. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter *SUT1*. **Plant Cell Environment**, v.19, p.1115-1123, 1996.
- KUHN, C., FRANCESCHI, V.R., SCHULZ, A., LEMOINE, R., FRÖMMER, W.B. Localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements indicate macromolecular trafficking. **Science**, v.275, p.1298-1300, 1997.
- KUSTER, H., FRUHLING, M., PERLICK, AM., PUHLER, A. The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodule tissues of *Vicia faba*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.507-514, 1993.
- LALOI, M., DELROT, S., M'BATCHI, B. Characterization of sugar efflux from sugar beet leaf plasma membrane vesicles. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.31, p.731-741, 1993.

- LALONDE, S., BOLES, E., HELLMANN, H., BARKER, L., PATRICK, J.W., FRÖMMER, W.B., WARD, J.M. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. **The Plant Cell**, v.11, p.707-726, 1999.
- LAWRENCE, M.C., IZARD, T., BEUHART, M., BLAGROVE, R.J., COLMAN, P.M. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.238, p.748-776, 1994.
- LEMOINE, R., DELROT, S., GALLET, O. The sucrose carrier of the plant plasma membrane: immunological evidence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.78, p.65-71, 1989.
- LEMOINE, R., GALLET, O., GAILLARD, C., FRÖMMER, W.B., DELROT, S. Plasma membrane vesicles from source and sink leaves. **Plant Physiology**, v.100, p.1150-1156, 1992.
- LEWONTIN, R.C., BERLAN, J.P. The political economy of agricultural research: the case of hybrid corn. In: LEWONTIN, R.C., BERLAN, J.P. (Eds.) **Agroecology**. New York: Ed. McGraw-Hill. p.613-628, 1990.
- LI, Z. S., NOUBHANI, A.M., BOURBOULOUX, A., DELROT, S. Affinity purification of sucrose binding proteins from the plant membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.81, n.1219, p.389-397, 1994.
- LICHTNER, F.T., SPANSWIDK, R.M. Electrogenic sucrose transport in developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v.67, p.869-874, 1981.
- LU, P., OUTLAW, W., SMITH, B., FREED, G. A new mechanism for the regulation of stomatal aperture size in intact leaves. **Plant Physiology**, v.114, p.109-118, 1997.
- LUCAS, W.J., DING, B., VAN DER SCHOOT, C. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. **New Phytology**, v.125, p.435-476, 1993.
- MADORE, M.A., LUCAS, W.J. Control of photoassimilate movement in source-leaf tissues of *Ipomea tricolor* Cav. **Planta**, v.171, p.197-204, 1986.
- MATRANGOLO, F.S. **Caracterização de uma proteína secretória de soja e de sua interação com Bip**. Viçosa-MG: UFV, 1998. 69p. Dissertação (Mestrado Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MARCATTO, C. **Trends of biotechnological development and risks for small-scale farmers**. Minnesota: University of Minnesota, 1997. 87p. (Thesis).

- OPARKA, K, TURGEON, R. Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. **The Plant Cell**, v.11, p.739-750, 1999.
- 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. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.25, p.15898-15904, 1997.
- OVERVOORDE, P.J., FRÖMMER, W.B., SPENCER, D. A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. **The Plant Cell**, v. 8, n.2, p.271-280, 1996.
- OVERVOORDE, P.J., GRIMES, H.D. Topographical analysis of the plasma membrane-associated sucrose binding protein from soybean. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.21, p.15154-15161, 1994.
- 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**, v.152, p. 87-98, 2000.
- PICHELIN-POITEVIN, D., DELROT, S., M'BATCHI, B. Differential labeling of membrane proteins by N-ethylmaleimide in the presence of sucrose. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.25, p.597-607, 1987.
- PIROVANI, C.P. **Caracterização bioquímica da proteína S-64, envolvida no transporte de sacarose em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 62p. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- RIESMEIER, J.W., WILLMITZER, L., FRÖMMER, W.B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **The EMBO Journal**, v.11, p.4705-13, 1992.
- RIESMEIER, J.W., HINER, B., FRÖMMER, W.B. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. **The Plant Cell**, v.5, p.1591-1598, 1993.
- RIESMEIER, J.W., WILLMITZER, L., FRÖMMER, W.B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading na assimilate partitioning. **EMBO Journal**, v.13, p.1-7,1994.

- RIPP, K.G., VITANEN, P.B., HITZ, W.D.L. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v.88, p.1435-1445, 1988.
- ROBINSON, N.L., HEWITT, J.D., BENNETT, A.B. Sink metabolism in tomato fruit. I. Developmental changes in carbohydrate metabolism enzymes. **Plant Physiology**, v.87, p.727-30, 1988.
- ROCHA-SOSA, M., SONNEWALD, U., FOMMER, W.B., STRATMANN, M., SCHELL, J., WILLMITZER, L. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a patatin class I gene. **EMBO Journal**, v.8, p.23-29, 1989.
- SACHS, M.M., SUBBIAH, C.C., SAAB, T.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.1-15, 1996.
- SAKR, S., LEMOINE, R., GAILLARD, C., DELROT, S. Effect of cutting on solute uptake by plasma membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. **Plant Physiology**, v.1, n.103, p.49-58, 1993.
- SAUER, N., STOLZ, N. SUC1 e SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. **Plant Journal**, v.6, p.67-77, 1994.
- SAUER, N., STADLER, R. A sink H⁺/monossacharide co-transporter from *Nicotiana tabacum* cloning and heterologous expression in baker's yeast. **Plant Journal**, v.4, p.601-610, 1993.
- SEARS, P., WONG, C.H. Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids. **Proceedings of National Academy of Science**, v.93, p.12086-12093, 1996.
- SCHAFFER, G., HEBER, U., HELDT, H.W. Glucose transport into spinach chloroplasts. **Plant Physiology**, v.60, p.286-289, 1977.
- SCHMALSTIG, J.G., GEIGER, D.R. Phloem unloading in developing leaves of sugar beet: evidence for pathway through the symplast. **Plant Physiology**, v.79, p.237-241, 1985.
- SHEEN, J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **The Plant Cell**, v.2, p.1027-1038, 1990.

- SLONE, J.H., BUCKHOUT, T.J. Sucrose-dependent H⁺ transport in plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves (*Beta vulgaris* L.). Evidence in support of the H⁺-symport model for sucrose transport. **Planta**, v.183, p.584-589, 1991.
- SOMMERVILLE, C. Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae. **Annual Review of Plant Physiology**, v.37, p.467-507, 1986.
- SONNEWALD, U., BRAUER, M., VON SCHAEWEN, A. Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast, a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. **Plant Journal**, v.1, p.95-106, 1991.
- SONNEWALD, U., WILLMITZER, L. Molecular approaches to source-sink interactions. **Plant Physiology**, v.99, p.1267-1270, 1995.
- STADLER, R., BRANDNER, J., SCHULZ, A., GAHRTZ, M., SAUER, N. Phloem loading by the *PmSUC2* sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. **The Plant Cell**, v.7, p.1545-1554, 1995.
- STITT, M. Fructose 2,6 bisphosphate as a regulatory molecule in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.153-185, 1990.
- STITT, M. The use of transgenic plants to study the regulation of plant carbohydrate metabolism. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.635-646, 1995.
- STITT, M. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: A step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. **The Plant Cell**, v.8, p.565-571, 1996.
- STOMMEL, J.R. Enzymic components of sucrose accumulation in the wild tomato species *L. chemielewskii*, and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, v.99, p.324-336, 1992.
- STURM, A., LIENHARD, S., SCHATT, S., HARDEGGER, M. Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). **Plant Molecular Biology**, v.39, p.349-360, 1999.
- SUN, J.D., LOBODA, T., SUNG, S.J., BLACK, C.C. Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chemielewskii*, and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, v.98, p.1163-1169, 1992.

- TAIZ, L., ZEIGER, E. Central role for potassium and sucrose in guard-cell regulation. **Plant Physiology**, v.111, p.1051-1057, 1996.
- THORNE, J.H. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.317-343, 1985.
- THOMAS, B.R., RODRIGUEZ, R.L. Metabolic signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. **Plant Physiology**, v.106, p.1235-1239, 1994.
- TRUERNIT, E., SAUER, N. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* *SUC2* sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by *SUC2*. **Plant Journal**, v.196, p.564-570, 1994.
- VAN BEL, A.J.E., VAN KESTEREN, W.J.P., PAPENHUIJZEN, C. Ultrastructural indications for coexistence of symplastic and apoplastic phloem loading in *Commelina benghalensis* leaves. Differences in ontogenic development, spatial arrangement and symplastic connections of the two sieve tubes in minor vein. **Planta**, v.176, p.159-172, 1992.
- VON SCHAEWEN, A., STITT, M., SCHMIDT, R., SONNEWALD, U.E., WILMITZER, L. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. **EMBO Journal**, v.9, p.3033-3044, 1990.
- WANG, F., SANZ, A., BRENNER, M.L., SMITH, A. Sucrose synthase, starch accumulation and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, v.103, p.321-327, 1993.
- WARD, J., KUHN, C., TEGEDER, M., FRÖMMER, W.B. Sucrose transport in Plants. **Interactive Review of Cytology**, v.178, p.41-71, 1998.
- 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 members of spinach leaves. **Planta**, v.180, p.105-115, 1989.
- WEBER, H., HEIM, U., BORISJUK, L., WOBUS, U. Cell type specific, coordinate expression of two ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba* L. **Planta**, v.195, p.352-361, 1995.

- WEBER, H., BUCHNER, P., BORISJUK, L., WOBUS, U. Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the connected action of both sucrose - phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed regulation. **The Plant Journal**, v.9, n.6, p.841-850, 1996.
- WILLIAMS, L.E., NELSON, S.J., HALL, J.L. Characterization of solute transport in plasma membrane vesicles from cotyledons of *Ricinus communis* L.: evidence for a proton-coupled mechanism for sucrose and amino acid uptake. **Planta**, v.182, p.540-545, 1990.
- WINTER, H., HUBER, J.L., HUBER, S.C. Identification of sucrose synthase as an actin-binding protein. **FEBS Letters**, v.430, p.205-218, 1998.
- WRIGHT, J.P., FISHER, D.B. Measurement of the sieve tube membrane potential. **Plant Physiology**, v.67, p.845-848, 1981.
- ZAMSKI, E., SCHNAFFER, A.A **Photoassimilates, distribution plants and crops**. New York: Decker. 1996. 340p.

CAPÍTULO 1

EXPRESSÕES SENSO E ANTI-SENSO DE UM GENE HOMÓLOGO À PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À SACAROSE DA SOJA EM TABACOS TRANSGÊNICOS AFETAM O CRESCIMENTO E O PARTICIONAMENTO DE CARBOIDRATOS NAS FOLHAS

1. INTRODUÇÃO

Em plantas superiores, a autotrofia é uma característica central em tecidos fotossinteticamente ativos, como folhas maduras (tecidos fonte), no qual os fotoassimilados são exportados para os tecidos-dreno como sementes, caules e raízes (tecidos-dreno). A sacarose é a principal forma transportada de carbono no sistema vascular da maioria das plantas superiores. A translocação de sacarose do seu local de síntese para os tecidos-dreno envolve a sua exportação das células do mesófilo, o carregamento do floema e o descarregamento das células do floema para os tecidos-dreno (FRÖMMER e SONNEWALD, 1995). Acredita-se que os carregadores das vias simplástica e apoplástica participam no carregamento e descarregamento do floema. O transporte via simplasto é mediado pelos plasmodesmos que interconectam células adjacentes (LUCAS et al., 1993; RUSSIN et al., 1996), e o transporte via apoplasto envolve o transporte de fotoassimilados pela membrana plasmática e os espaços da parede celular, onde

as proteínas de transporte da membrana mediam esse processo (FRÖMMER e SONNEWALD, 1995).

A importância do carregamento apoplástico é demonstrada pelo desenvolvimento de fenótipos característicos da inibição da atividade de transporte de sacarose, causado pela expressão de uma invertase de levedura no apoplasto de várias espécies de solanáceas, como tabaco, tomate e batata (VON SCHAEWEN et al., 1990; DICKINSON et al., 1991; SONNEWALD et al., 1991; HEINEKE et al., 1992). Tais efeitos fenotípicos incluem o encarquilhamento foliar, o crescimento radicular reduzido e a diminuição no tamanho do tubérculo em batatas. Além disto, a expressão da invertase heteróloga apoplástica afeta drasticamente o particionamento dos fotoassimilados. Uma vez que as hexoses não parecem ser translocadas eficazmente no floema, esses resultados sustentam um transporte mediado pela rota apoplástica, como uma via predominante no carregamento do floema. Em estudos bioquímicos com células isoladas e vesículas da membrana plasmática, foram identificadas atividades de transporte de sacarose em algumas espécies de plantas (LEMOINE e DELROT, 1989; WILLIAMS et al., 1991; LEMOINE et al., 1992). Com base em estudos cinéticos, verificou-se que a absorção de sacarose em células isoladas é principalmente mediada por um sistema saturável de alta afinidade e por um sistema não-saturável de baixa afinidade (DELROT, 1989). O componente do sistema de alta afinidade é sensível a reagentes sulfidríla-reativos e dietilpirocarbamato, e tem sido descrito como um co-transportador de próton/sacarose.

Ensaio de complementação de leveduras mutantes têm sido usados para isolar os cDNAs codificadores de co-transportadores de próton/sacarose de espinafre e batata, identificados como SoSUT1 e StSUT1, respectivamente (RIESMEIER et al., 1992, 1993). Atualmente, outros cDNA homólogos têm sido isolados de *Arabidopsis*, tabaco, tomate e *Plantago major* (GAHRTZ et al., 1994, SAUER e STOLZ, 1994, KÜHN et al., 1997). Os produtos codificados pelos cDNAs têm características estruturais de transportadores de metabólitos. Eles são

proteínas altamente hidrofóbicas e possuem duas regiões que contêm seis domínios de membrana, separados por uma grande alça citoplasmática. A caracterização bioquímica desses produtos codificados pelos cDNAs revelou que elas se assemelham ao componente de alta afinidade do sistema de absorção de sacarose em plantas (BUSH, 1990). A atividade dessas proteínas é dependente do pH e fortemente inibida por protonóforos, agentes que modificam grupos tióis e dietilpirocarbamato.

Experimentos anteriores demonstraram que os produtos dos genes *SUT* representam um componente importante no transporte mediado por carreadores do apoplasto. Estes transportadores estão localizados no complexo células companheiras/elementos do tubo crivado e, provavelmente, mediam a absorção de sacarose no apoplasto (RIESMEIER et al., 1992, 1993, 1994; KÜHN et al., 1996). Em batata, o padrão de expressão do mRNA do gene *SUT* segue a transição do dreno para a fonte e é coordenado com a atividade de transporte de sacarose (RIESMEIER et al., 1993). Além disto, a repressão anti-senso do gene *SUT1* em plantas transgênicas inibe a exportação de sacarose das folhas, alterando a sua morfologia e o desenvolvimento da planta (RIESMEIER et al., 1994; KÜHN et al., 1996; LEMOINE et al., 1996).

Usando uma técnica de etiquetamento por fotoafinidade, uma proteína de ligação à sacarose (SBP) foi purificada de cotilédones de soja (RIPP et al., 1988) e o seu cDNA isolado de uma biblioteca de expressão de semente de soja (GRIMES et al., 1992). Várias evidências indicam que a SBP está envolvida no transporte de sacarose, podendo representar o componente de baixa afinidade, descrito anteriormente. A SBP é uma proteína associada à membrana, localizada em células ativamente comprometidas com o transporte de sacarose, como as células do mesofilo de folhas jovens, as células companheiras do floema maduro e as células do cotilédones de semente durante a diferenciação (GRIMES et al., 1992; OVERVOORDE e GRIMES, 1994). Além disto, a expressão do gene *sbp* e o acúmulo da proteína codificada são temporalmente coordenados com a taxa de absorção de sacarose em cotilédones (GRIMES et al., 1992). Evidências diretas,

associando o transporte de sacarose com a proteína SBP, foram obtidas com estudos de complementação de leveduras deficientes em invertase e incapazes de crescer em meio que continham somente sacarose como fonte de carboidratos (OVERVOORDE et al., 1996, 1997). A expressão do cDNA de SBP reverteu o fenótipo da levedura mutante e demonstrou que a absorção de sacarose mediada por SBP em levedura exibe cinética linear, não-saturável (GRIMES e OVERVOORDE, 1996; OVERVOORDE et al., 1996). No entanto, a relevância biológica deste mecanismo de transporte não foi avaliada em plantas. Nesse capítulo, foi analisada a função do homólogo de SBP da soja por meio da tecnologia de inibição anti-senso e da superexpressão senso em tabaco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento de um cDNA homólogo de SBP e construção de seus plasmídeos

As manipulações do DNA foram feitas de acordo com SAMBROOK et al. (1989). O cDNA de s-64 (acesso ao número do Genebank AF191299) foi arbitrariamente isolado de uma biblioteca de expressão de semente, usando um anticorpo contra uma fração de membranas microssomais parcialmente purificadas de sementes imaturas de soja. A identidade desse clone foi obtida por análise de comparação, por meio do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). O programa computacional CLUSTAL-W foi usado para o alinhamento das seqüências. A proteína deduzida S-64 demonstra uma similaridade de seqüência de 91% com a proteína SBP, sendo também referida como uma proteína homóloga de SBP.

O fragmento homólogo de SBP foi liberado do DNA recombinante λ por meio da digestão com Eco RI e subclonado no sítio Eco RI do plasmídeo pUC 118, para obtenção do clone pS64. A região codificadora de s-64 foi obtida por meio de PCR, usando como molde para Pfu polimerase o DNA recombinante pS64 e os oligonucleotídeos específicos (5'- CCTCACTGACCTCACCATATGGCGACCAGA-3') e 70295F (5'-

GAATTCTCACGCAACAGCGCGACGACC-3'), criando o sítio Eco RI, em negrito, adjacente ao códon de terminação. O fragmento amplificado foi clonado no sítio Sma I de pUC 118, resultando no clone pUFV 32.

A expressão das seqüências codificadoras de s-64 em um cassete de expressão em plantas foi realizado, em virtude da substituição da região codificadora do gene *gus* dentro do vetor de transformação binário pBI121 pelo cDNA de s-64 nas orientações senso e anti-senso. O vetor binário de transformação de plantas modificado a partir de pBI121 foi obtido ao liberar o gene *gus* com uma digestão dupla Sac I/Sma I, reparando o sítio Sac I com enzima DNA polimerase I de *E. coli* e depois recircularizando. Aproximadamente 10 µg do DNA recombinante de pUFV 32 foram digeridos com Eco RI, seguido por tratamento com 5 U de enzima DNA polimerase I de *E. coli*. Após a inativação desta enzima a 75 °C, por 10 minutos, o DNA recombinante de pUFV 32 foi hidrolisado com Xba I. O fragmento liberado de pUFV 32 foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% e purificado mediante o uso do kit da Bio Rad ("Prep-A-Gene DNA Purification Systems"), de acordo com as recomendações do fabricante. Paralelamente, o vetor pBI 121 foi digerido com Bam HI, tratado com enzima DNA polimerase I de *E. coli* e, em seguida, digerido com Xba I. O fragmento s-64 liberado foi inserido no vetor pBI 121, previamente preparado, resultando no clone senso (pUFV75) após transformação da estirpe JM 109 de *E. coli*. O DNA recombinante continha o gene s-64 na orientação senso, flanqueado pelo promotor 35S CaMV e pelos sinais de poliadenilação do gene nos (nopalina-sintase).

A estratégia de obtenção do clone anti-senso consistiu no tratamento inicial de pUFV32 com Eco RI, seguido pelo tratamento com a enzima DNA polimerase I de *E. coli*. Após a inativação desta enzima a 75 °C, por 10 minutos, o clone pUFV 32 foi digerido com Bam HI. O fragmento s-64 liberado foi purificado do gel de agarose, conforme já descrito. O preparo do vetor pBI121 consistiu nos tratamentos seqüenciais com Xba I, com a enzima DNA polimerase I de *E. coli* e Bam HI. A inserção do fragmento s-64 nos sítios Xba I, preenchido

com a enzima DNA polimerase I de *E. coli* e Bam HI do vetor pBI 121, resultou no clone anti-senso (pUFV76). Essa estratégia permitiu clonar o cDNA de s-64 na orientação anti-senso sob o controle do promotor 35S CaMV e dos sinais de poliadenilação do gene *nos*.

2.2. Transformação de tabaco

As colônias de *Agrobacterium* sp., que continham os plasmídeo com a construção, foram inoculadas em 50 mL de meio Rhizo contendo canamicina 100 µg/L e estreptomicina 100 µg/L a 28 °C, sob agitação por 12 horas. A solução foi centrifugada a 8.000 x g por 5 minutos, a 14 °C. O sedimento foi ressuspenso em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), e a concentração ajustada para OD₆₀₀ = 0,6. Os explantes foliares de tabaco e as células de agrobactéria foram incubados por 15 minutos, sob agitação, e co-cultivadas por dois dias em meio MS. Em seguida, foram transferidos para o meio MS sólido, contendo canamicina 100 µg/L, cefatoxima 500 µg/L, com a face abaxial em contato com o meio. As placas foram mantidas na sala de crescimento de plantas, tendo o subcultivo dos explantes ocorrido em intervalos de três semanas. Enquanto a concentração de canamicina nas placas foi mantida constante, a de cefatoxima foi diminuída a cada nova passagem (500, 400 e 300 µg/L). Após a quarta passagem, a cefatoxima foi omitida do meio. Os regenerantes foram aclimatados e conduzidos na casa de vegetação, para observação de efeitos fisiológicos.

2.3. Confirmação da transgenicidade das plantas de fumo por PCR

O DNA total foi isolado de plantas transgênicas e usado como molde para Taq polimerase em reações de PCR, usando dois oligonucleotídeos específicos do gene s-64. Os oligonucleotídeos utilizados foram 5' ACCAACATCATCTAGAGATCTATGAG 3' (coordenadas de 1.000 a 1.026) e

5' ATACATTCCCCGAATTCAGCCACCTCC 3' (coordenadas de 1.498 a 1.524). Uma reação de amplificação conteve 30 pmoles de cada oligonucleotídeo, MgCl₂ 2,0 mmoles/L, Tris-HCl 2,0 mmoles/L pH 8,4, KCl 50 mmol/L, dNTP 100 μmoles, 10 ηg do DNA genômico e 1U de Taq polimerase. Para a reação de amplificação do gene nptII, dois oligonucleotídeos foram utilizados. Os iniciadores NPT97F (5' TCAGCGCAGGGGCGCCCGGTT 3') e NPT97R (5' GCGGTCAGCCCATTCGCCGCC 3') estão localizados nas posições de 1.981 a 2.005 e de 2.557 a 2.584, respectivamente. As condições de amplificação foram conduzidas por 30 ciclos (50 segundos a 94 °C, 75 segundos a 47 °C e 120 segundos a 72 °C), com uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

2.4. Produção do anticorpo

A proteína S-64 foi expressa como uma proteína truncada que continha uma cauda de histidina N-terminal, usando o vetor pET-16B (NOVAGEN). Para esse propósito, o cDNA de s-64 foi amplificado do clone pS64 com Pfu polimerase com o oligonucleotídeo senso 5' AAGAAACTCGAGGTCGAAGA 3'(Sítio Xho I sublinhado) e o oligonucleotídeo anti-senso 5' ATACATTCCCCGAATTCAGCCACCTCC 3' (sítio Eco RI sublinhado). O fragmento resultante da amplificação foi clonado nos sítios Eco RI/SmaI do vetor pGEM7Zf (-) (PROMEGA), liberado com a digestão do sítio Xho I e, em seguida, inserido no sítio Xho I do vetor pET-16b, na orientação senso. A síntese da proteína recombinante foi induzida por propiltio-β-D-galactosídeo (IPTG). A proteína induzida foi purificada por uma resina de sefarose, utilizando o níquel como agente quelante (PHARMACIA), que foi usado como antígeno para produção de anticorpos em coelhos, imunizados por injeções subcutâneas durante intervalos de duas semanas.

2.5. SDS-PAGE e análises de “immunoblotting”

Uma fração enriquecida de membranas de folhas de fumo foi preparada de acordo com RIPP et al. (1988). Quantidades equivalentes de proteínas de membrana foram resolvidas em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com BSA 3% em TBS-T [Tris-HCl 100 mmol/L, pH 7,6, NaCl 1,5 mmol/L, Tween 20 0,1% (v/v)]. A proteína S-64 foi detectada mediante o uso do anticorpo contra S-64, numa diluição 1:1000, seguida por incubação com o anticorpo contra IgG de coelho conjugada à fosfatase alcalina (“Sigma Chemical Company”, USA), numa diluição de 1:5000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-nitro-tetrazolium, Gibco BRL, USA) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, Gibco BRL, USA).

2.6. Expressão da proteína S-64 em leveduras

A expressão heteróloga do gene s-64 em levedura foi realizada mediante o uso do sistema de expressão *Pichia pastoris* (*in vitro gene*). O cDNA de s-64 foi clonado no sítio Eco RI do vetor pPIC3.5 (*in vitro gene*) sob o controle do promotor do gene AOX1 (álcool oxidase). O clone resultante, pUFV159, contendo o fragmento do cDNA na orientação senso, foi usado para transformar *P. pastoris*. A expressão do gene recombinante foi induzida por 0,5% (v/v) de metanol, durante 48 horas, de acordo com as recomendações do fabricante. O acúmulo da proteína recombinante induzida por metanol foi monitorado por “immunoblotting”.

2.7. Medições fisiológicas

As sementes transgênicas (R1) foram germinadas em meio que continha canamicina, por uma semana antes do transplante. As plantas foram crescidas em uma mistura de solo, areia e esterco (3:1:1), durante oito semanas, em condições padronizadas em casa de vegetação, em irradiância de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa de 70%, fotoperíodo de aproximadamente 14 horas e temperatura entre 18 e 30 °C. A taxa fotossintética, a transpiração e a condutância estomática de folhas jovens e completamente expandidas foram medidas pelo analisador de gás infravermelho portátil (modelo LCA-2, “Analytical Development Co. Ltd.”, Hoddeston, UK).

2.8. Determinação do teor de açúcares em folhas de tabaco

As folhas coletadas foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e extraídas três vezes, por 30 minutos cada, em 3 mL de etanol 80% (v/v) a 80 °C. Os extratos foram clarificados por centrifugação e evaporação. Os açúcares solúveis totais foram medidos de acordo com HODGE e HODFREITER (1962) e os açúcares redutores foram medidos como descrito por SOMOGY (1952). O material insolúvel remanescente foi ressuspenso em ácido perclórico 52% e usado para a determinação do amido (NASCIMENTO et al., 1998).

2.9. Determinação de atividades enzimáticas de invertases

As formas solúveis e insolúveis de invertases ácidas foram analisadas de acordo com LOWELL et al. (1989). As atividades de invertases foram determinadas a 37 °C, durante 30 minutos. O meio de reação continha acetato de potássio 0,67 ol/L pH 4,7 e sacarose 100 mmol/L. Os açúcares redutores liberados foram analisados de acordo com SOMOGY (1952).

3. RESULTADOS

3.1. Transformação de *Nicotiana tabacum* com o gene homólogo da proteína de ligação à sacarose da soja

Previamente, foi isolado um cDNA de uma biblioteca de expressão de semente de soja (MATRANGOLO, 1998), que possui 91% de identidade com a proteína de ligação à sacarose (SBP), descrita na literatura (GRIMES et al., 1992). Para elucidar o papel fisiológico do homólogo de SBP, tabacos transgênicos que expressavam o gene s-64 na orientação senso ou anti-senso foram gerados. A Figura 1 mostra o plasmídeo pBI121, que contém o gene s-64 da soja usado para transformar *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*.

Foram selecionados transformantes primários (R0), em cultura de tecidos com base na resistência à canamicina, e a maioria das plantas foi testada para a incorporação dos genes de nptII e s-64 por meio da análise de PCR (Figura 2). Em algumas linhagens resistentes à canamicina, a incorporação do gene s-64 não foi detectada. Para cada construção, várias linhagens independentes foram estabelecidas, transferidas para o solo e crescidas em casa de vegetação, para gerar sementes (geração R1). A integração da construção nas plantas transformadas foi também confirmada por análise de “southern blot” e

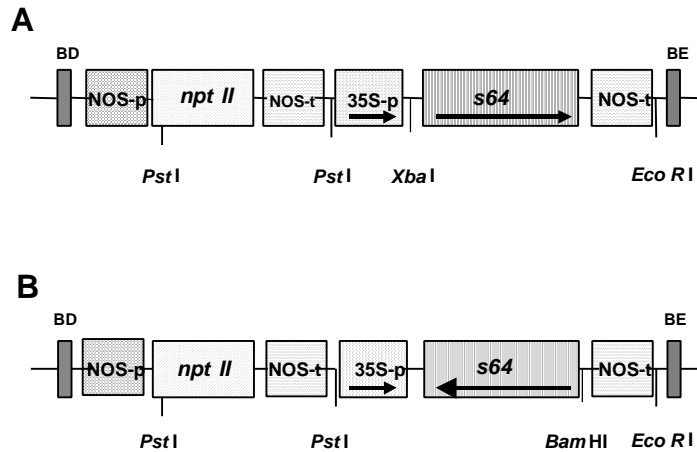


Figura 1 - Diagrama esquemático das construções que contêm o gene homólogo de SBP quimérico no vetor binário pBI 121, para transformação de *Nicotiana tabacum*. O gene s-64 na orientação senso (A) ou anti-senso (B) foi colocado sob o controle do promotor CaMV-35S (35S-p) e o sinal de poliadenilação (NOS-t). A expressão do gene nptII é dirigida pelo promotor do gene nos (NOS-p). BD e BE correspondem às bordas direita e esquerda do T-DNA, respectivamente. As posições de algumas enzimas de restrição são indicadas.

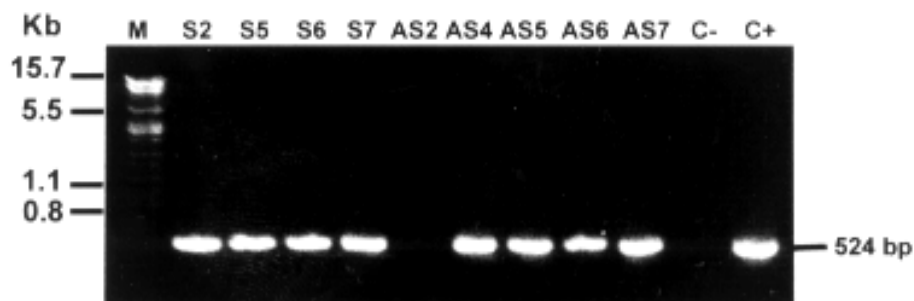


Figura 2 - Análise de PCR das plantas transgênicas. O DNA total foi isolado de plantas transgênicas crescidas na casa de vegetação e usado como molde em reações de PCR, com iniciadores específicos para o gene s-64. A letra S refere-se às plantas transformadas com a construção senso, enquanto as letras AS referem-se às plantas transformadas com a construção anti-senso. Os números diferentes, que acompanham as letras S e AS, indicam que as plantas transgênicas foram originadas de eventos independentes de transformação. C - corresponde ao resultado da reação de PCR, usando o DNA das plantas-controle como molde, transformadas com o vetor pBI121. Em C+, o cDNA s-64 foi usado como molde. M corresponde a marcadores moleculares de DNA, cujos tamanhos são mostrados à sua esquerda em kb.

segregação do gene *nptII* na progênie R1 (dados não-mostrados). Três transformantes independentes senso e quatro anti-senso foram selecionados, para posteriores análises.

O nível da proteína S-64 nas plantas transgênicas foi examinado por “immunoblotting” de frações microssomais, enriquecidas com membranas de folhas identificadas com um anticorpo contra a proteína S64 (Figura 3). As bandas imunorreativas de 64 KDa foram detectadas em uma fração enriquecida de membranas das folhas jovens das plantas-controle (linha C) e, portanto, confirmaram a presença de um homólogo de SBP associado à membrana, o qual foi reconhecido pelo anticorpo específico (dado não-mostrado). A medição do acúmulo do homólogo de SBP endógena em tabaco foi reduzida em diferentes intensidades, nas linhagens AS4 (linha AS4), AS5 (linha AS5), AS6 (linha AS6) e AS7 (linha AS7), o que demonstra vários graus de inibição da proteína endógena. Os níveis da proteína S-64 nas plantas transgênicas S6 e S7 (linhas S6 e S7) foram maiores que os das plantas-controle (linha C). Por outro lado, a expressão da linhagem senso S5 (linha S5) permaneceu inalterada.

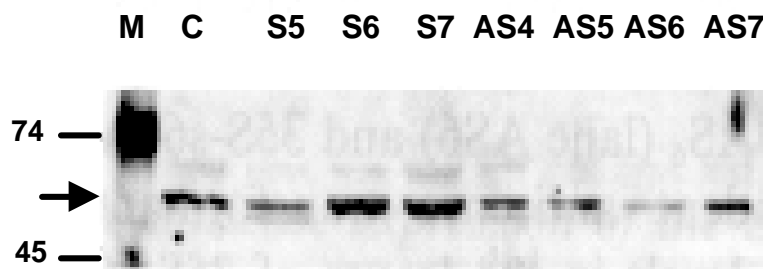


Figura 3 - Acúmulo do homólogo da proteína SBP em folhas transgênicas e selvagem. As frações microssomais enriquecidas com membranas de folhas foram isoladas para o controle (C). As plantas transgênicas senso (S5, S6 e S7) e as plantas transgênicas anti-senso (AS4, AS5, AS6 e AS7) foram fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e sondadas com um anticorpo específico para S-64. M corresponde aos marcadores moleculares indicados à esquerda em KDa. A seta indica a posição do polipeptídeo homólogo de SBP.

Com base na localização subcelular e na mobilidade eletroforética dos polipeptídeos reativos, concluiu-se que o anticorpo reconhecia um homólogo de S-64/SBP em folhas de tabaco. Este fato representou a primeira demonstração de que um homólogo de SBP está presente em solanáceas. Para reforçar tais conclusões, a especificidade desses resultados foi testada em um sistema de expressão em leveduras. A proteína S-64 foi expressa em *P. pastoris*, sob o controle do promotor AOX1 induzível por metanol. (Figura 4). O anticorpo contra S-64 reconheceu apenas uma proteína de 64 KDa induzida por metanol no extrato protéico total (linha 1) e na fração membranosa (linha 3) dos transformantes de levedura e não reconheceu nenhuma proteína de levedura endógena (linhas 2 e 4). Este resultado confirma a especificidade do anticorpo contra S-64 e ainda promove um maior suporte para detecção de um homólogo de SBP em tabaco.

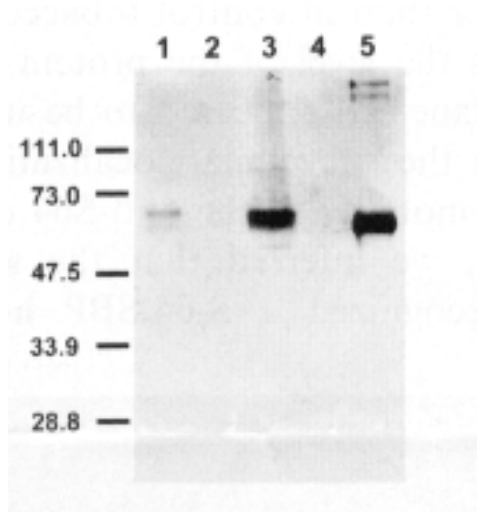


Figura 4 - Especificidade do anticorpo contra a proteína S-64 em leveduras. Os extratos protéicos celulares totais (1 e 2) e as membranas microssomais totais (3 e 4) foram isolados de *Pichia pastoris* e transformados com o cDNA de s-64 sob o controle do promotor induzível por metanol AOX1. Nas linhas 1 e 3 a expressão da proteína heteróloga foi induzida por 0,5% de metanol e nas linhas 2 e 4 os transformantes de levedura foram crescidos em condições normais. A linha 5 corresponde à proteína recombinante produzida em *E. coli*, que foi usada para preparar o anticorpo contra S-64. As posições dos marcadores moleculares estão indicadas em KDa.

3.2. Fenótipos relacionados ao crescimento das plantas transgênicas senso e anti-senso

Os fenótipos típicos de inibição da translocação de sacarose foram observados nos transgênicos que continham a construção anti-senso. Nos regenerantes primários, foi observado um severo encarquilhamento foliar, que não persistiu nas folhas maduras das plantas transgênicas crescidas na casa de vegetação. Nas três primeiras semanas do processo de regeneração das plantas, a expansão foliar nas plantas anti-senso foi maior que a das senso ou controle. No entanto, o fenótipo se reverteu quando as plantas transgênicas foram levadas para a casa de vegetação, e, de modo geral, o crescimento das plantas transgênicas anti-senso foi retardado, quando comparado ao das plantas transgênicas senso ou controle, Figura 5(A). A taxa de crescimento das plantas senso foi ligeiramente maior que a das plantas-controle. A diferença na taxa de crescimento vegetativo das linhagens transgênicas foi acompanhada por evocação floral diferenciada para as plantas senso, anti-senso e controle, Figura 5(B).

Enquanto o florescimento das plantas que continham a construção senso foi quantitativamente acelerado, quando comparado ao das plantas-controle, o florescimento nas plantas que continham a construção anti-senso foi retardado. O crescimento vegetativo reduzido e o desenvolvimento retardado de órgãos reprodutivos exibidos pelas linhagens anti-senso evidenciam uma diminuição no carregamento do floema e, ou, no descarregamento da sacarose nos tecidos-dreno. Os fenótipos contrastantes das linhagens senso sustentam uma correlação inversa de efeitos. No entanto, o fenótipo exibido pelas linhagens anti-senso foi bastante semelhante, indiferente do grau de inibição do endógeno de SBP nas folhas maduras (Figura 3). Deste modo, a diminuição no acúmulo do homólogo de SBP revelou uma significativa, mas não proporcional, alteração no desenvolvimento global da planta.

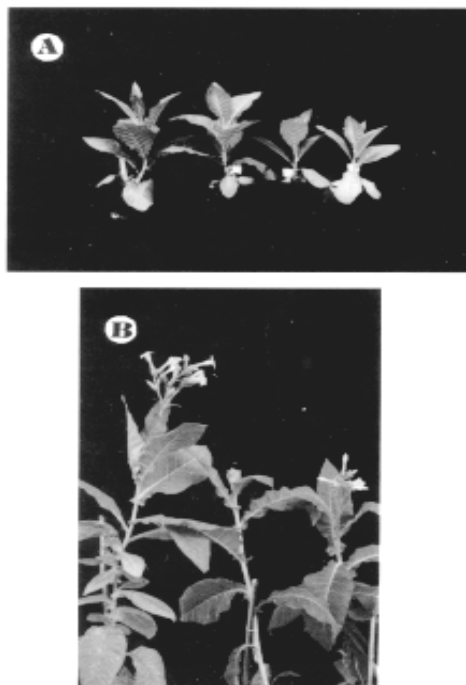


Figura 5 - Ilustração do desenvolvimento das plantas transgênicas senso, anti-senso e controle. A) Tabacos transgênicos após quatro semanas em casa de vegetação. Duas linhagens transgênicas senso (S) são mostradas no lado esquerdo e duas linhagens transgênicas anti-senso (AS) são mostradas no lado direito. B) Plantas transgênicas após oito semanas na casa de vegetação (da esquerda para a direita): plantas transgênicas senso (S), plantas transgênicas anti-senso (AS) e plantas-controle (plantas transgênicas senso mostraram um florescimento prematuro, assim como as plantas transgênicas anti-senso mostraram um florescimento retardado, quando comparadas ao controle).

3.3. As expressões senso e anti-senso do gene homólogo de SBP afetam a taxa fotossintética das plantas transgênicas

O desenvolvimento retardado das plantas anti-senso, como também o desenvolvimento acelerado das plantas senso, indicou uma possível mudança na taxa fotossintética nessas plantas. Se o gene s-64 está envolvido no transporte de sacarose para o floema, seja no carregamento ou no descarregamento, espera-se que uma redução na atividade de transporte conduza à inibição retroativa da fotossíntese. De fato, a taxa de fotossíntese de folhas maduras, medida sob condições ambientais normais, foi reduzida significativamente nas plantas AS4 (as4), AS5 (as5), AS6 (as6) e, praticamente, ligeiramente alterada nas folhas das plantas AS7 (as7), quando comparadas às plantas-controle, Figura 6(A). A redução na taxa fotossintética das plantas anti-senso foi acompanhada por um declínio paralelo na taxa de transpiração e na condutância estomática, Figura 6(B e C). Por outro lado, a taxa fotossintética das plantas senso S6 (s6) e S7 (s7) foi significativamente maior que a das plantas-controle (c), o que indica um aumento na atividade de exportação de sacarose e, ou, no descarregamento para os tecidos-dreno, em virtude do maior acúmulo do homólogo de SBP, Figura 6(A). Nas folhas da planta S5 (s5), onde o aumento do homólogo de SBP não foi observado (Figura 3), a fotossíntese, a transpiração e a condutância estomática permaneceram inalteradas. Estes dados revelam um efeito da proteína SBP na regulação da fotossíntese. Além disto, eles evidenciam que existe um homólogo de SBP funcional no genoma de tabaco. De fato, a análise de “southern blot” mostrou a presença desse homólogo em condições de baixa adstringência (dados não-mostrados), e o anticorpo contra S-64 detectou uma proteína homóloga em folhas de tabaco (Figura 3).

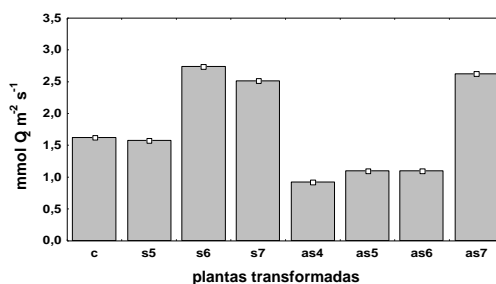
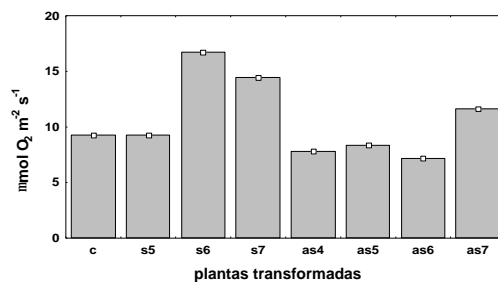
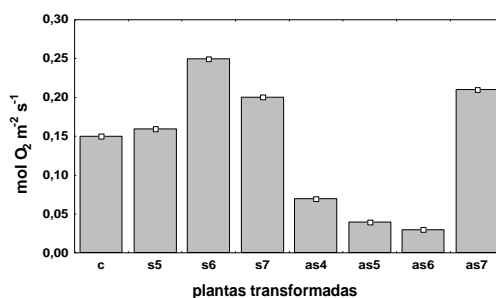
A**FOTOSSÍNTESE****B****TRANSPIRAÇÃO****C****CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA**

Figura 6 - Avaliações fisiológicas das plantas transgênicas de tabaco senso, anti-senso e controle. A) taxa fotossintética, B) taxa de transpiração e C) condutância estomática de folhas completamente expandidas das plantas-controle, senso (S) (s5, s6, s7) e anti-senso (AS) (as4, as5, as6 e as7) medidas pelo analisador de gás infravermelho (IRGA) em irradiância de crescimento.

3.4. As expressões senso e anti-senso do gene homólogo de SBP alteram a alocação de carbono em folhas maduras

Para avaliar os efeitos da repressão anti-senso e a superexpressão do gene homólogo de SBP no metabolismo de carboidratos, a concentração de amido e açúcares solúveis foi determinada em folhas completamente expandidas (Figura 7). O conteúdo de amido nas folhas de todas as quatro linhagens transgênicas anti-senso (as4, as5, as6 e as7) foi significativamente maior que o das plantas-controle, Figura 7(A), enquanto o conteúdo de sacarose, denominado como açúcar não-redutor, foi reduzido nas folhas das plantas anti-senso, Figura 7(B).

A razão sacarose/amido nas folhas das linhagens anti-senso mostrou um particionamento em direção à biossíntese de amido. No entanto, a alteração da concentração de carboidratos nas linhagens anti-senso para SBP/S-64 não segue o mesmo padrão de linhagens anti-senso para transportadores H⁺/SUT, no qual os níveis de sacarose, hexoses e também de amido são constantemente maiores que aqueles de plantas selvagens (RIESMEIER et al., 1994; KÜHN et al., 1996; LEMOINE et al., 1996). Essas diferenças demonstram que as alterações de atividade do transportador H⁺/sacarose e da proteína SBP produzem fenótipos distintos. Diferentemente da absorção de sacarose mediada por SUT, a absorção de sacarose mediada por SBP em levedura é independente do próton que exhibe cinética de absorção linear e não-saturável (GRIMES e OVERVOORDE, 1996; OVERVOORDE et al., 1996).

Nas linhagens das plantas senso (s5, s6 e s7), o conteúdo de amido em folhas maduras também foi maior que o das folhas-controle, Figura 7(A). Porém, diferentemente das linhagens anti-senso, o conteúdo de sacarose, denominado açúcar não-redutor, permaneceu inalterado quando comparado ao das folhas-controle, Figura 7(B). Uma vez que a taxa de fotossíntese foi maior nas linhagens transgênicas senso, Figura 6(A), um aumento na concentração de carboidratos, tanto de amido como sacarose, era esperado. No entanto, como o nível de sacarose permaneceu inalterado, uma alta taxa de exportação de sacarose

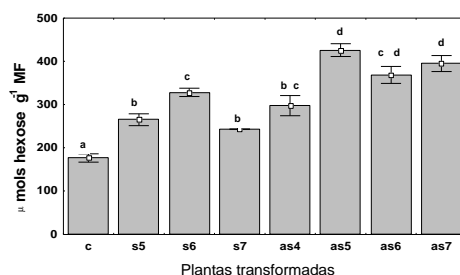
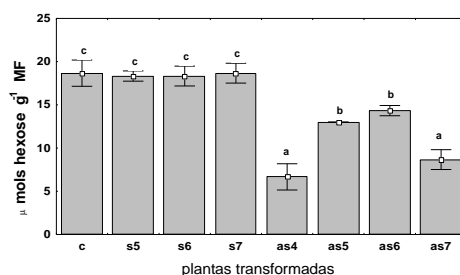
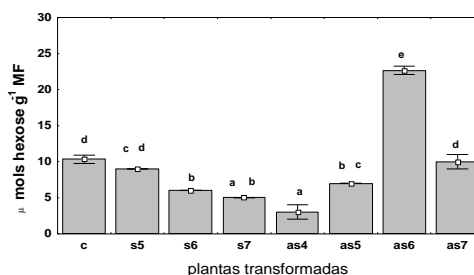
A**AMIDO****B****AÇÚCARES NÃO-REDUTORES****C****AÇÚCARES REDUTORES**

Figura 7 - A) concentração de amido, B) açúcares não-redutores e C) açúcares redutores em folhas das plantas-controle (c), S (s5, s6 e s7) e AS (as4, as5, as6 e as7). Os valores para amido, açúcares não-redutores e açúcares redutores são mostrados em μmols de hexose por grama de matéria fresca. As medições são mostradas como a média de cinco determinações de folhas independentes com massa fresca equivalente. Os valores que contêm a mesma letra são estatisticamente iguais a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

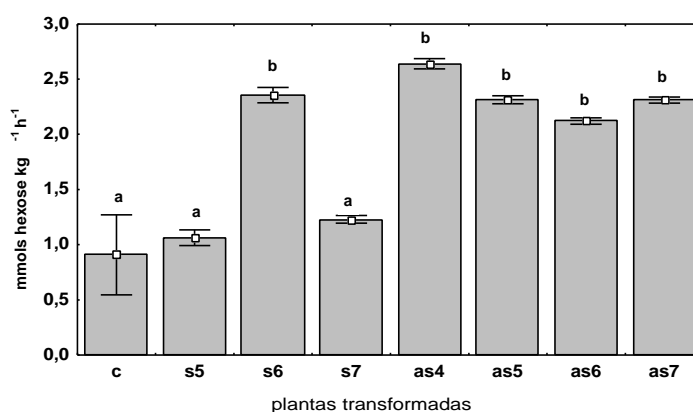
nas folhas poderia explicar porque não se detectou um aumento do acúmulo desse dissacarídeo em folhas maduras. Deste modo, a concentração relativa de açúcares solúveis e insolúveis em folhas das plantas senso é uma consequência do aumento da taxa fotossintética e do transporte de sacarose em direção aos tecidos-dreno.

3.5. A atividade enzimática da invertase é alterada em folhas transgênicas

Nas folhas das plantas anti-senso AS6 (AS6) e AS7 (AS7), a relação entre açúcares redutores e não-redutores foi pelo menos duas vezes maior que a encontrada em folhas-controle, enquanto um resultado inverso foi observado em folhas das plantas senso. Estes níveis relativos de sacarose e hexoses podem refletir o desequilíbrio entre a hidrólise de sacarose e a sua síntese nas linhagens transgênicas, Figuras 8(B e C). Neste caso, a proteína SBP teria um papel indireto na translocação de sacarose, regulando as atividades de sua hidrólise. A fim de testar esta hipótese, a atividade de invertase da parede celular foi medida em folhas maduras das plantas senso, anti-senso e controle. Em todas as linhagens anti-senso (as4, as5, as6 e as7), a atividade de invertase da parede celular (IPC) foi significativamente maior que a verificada em folhas das plantas-controle, Figura 8(A). O papel da invertase de parede celular na partição de sacarose entre a fonte e o dreno tem sido demonstrado em tabacos que superexpressam essa enzima de uma maneira constitutiva.

Em geral, os níveis elevados dessa enzima nas folhas reduzem o transporte de sacarose entre a fonte e o dreno, o que provoca uma alteração no crescimento e na morfologia da planta. Assim, o nível da atividade de invertase em plantas anti-senso pode contribuir, para o fenótipo do crescimento retardado nas plantas anti-senso. Nas plantas S5 (s5) e S7 (s7), a atividade de invertase da parede celular permaneceu praticamente inalterada, Figura 8(A). No entanto, a atividade de invertase vacuolar, em todas as três plantas senso, foi significativamente maior que nas folhas das plantas-controle, Figura 8(B) (s5, s6 e s7). As variações da

A INVERTASE DE PAREDE CELULAR



B INVERTASE VACUOLAR

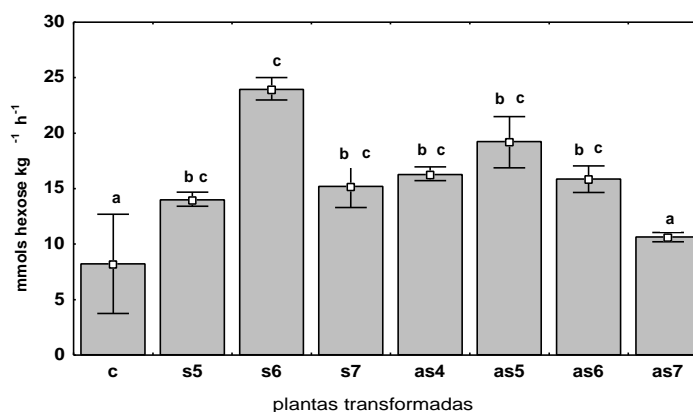


Figura 8 - A) Atividades da invertase de parede celular e B) invertase vacuolar em folhas maduras das plantas transgênicas e controle. As atividades de invertase foram medidas em extratos das folhas-controle (c), senso S (s5, s6 e s7) e anti-senso AS (as4, as5, as6 e as7). A atividade de invertase é mostrada em mmols de hexose por kg⁻¹ h⁻¹ de matéria fresca, sendo a média de cinco determinações de folhas independentes com massa fresca equivalente. Os valores que contêm a mesma letra são estatisticamente iguais a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

atividade de invertase vacuolar nas plantas senso podem refletir um ajuste metabólico ao aumento da exportação de fotoassimilados, promovido pelo aumento da expressão do homólogo de SBP senso, a fim de não comprometer o crescimento foliar. Enquanto a alta atividade da invertase vacuolar favoreceria a exportação de sacarose, prevenindo o seu armazenamento nas folhas, a invertase de parede celular controlaria a saída de carbono assimilado, clivando a sacarose e promovendo o crescimento foliar.

4. DISCUSSÃO

Com a finalidade de elucidar a função do gene s-64 da soja, que possui 91% de identidade com o gene sbp previamente descrito, foi usada a tecnologia de repressão anti-senso e superexpressão, em tabaco. As plantas de tabaco foram escolhidas para estudos de repressão anti-senso e superexpressão senso, porque: a) as seqüências homólogas dos genes s-64 e sbp estão presentes no genoma de tabaco; b) os mecanismos apoplásticos representam a rota primária para absorção de sacarose na via de translocação à longa distância, nesta espécie de planta; e c) o tabaco pode ser facilmente transformado por meio de *Agrobacterium tumefaciens*. A alteração da dinâmica de crescimento e desenvolvimento das plantas anti-senso constitui uma forte evidência de que a translocação de sacarose foi, de alguma forma, alterada. Os fenótipos foram parcialmente semelhantes aos descritos na literatura para repressão anti-senso dos carreadores próton-sacarose e a superexpressão da invertase apoplástica. No entanto, a expressão diminuída do homólogo de SBP em tabaco levou a uma significativa, mas não proporcional, alteração do desenvolvimento global da planta. Estes resultados refletem a complexidade da via de translocação de sacarose, o que evidencia a existência de múltiplos mecanismos de transporte que operam de modo sinérgico e compensatório. Em contraste aos efeitos fenotípicos de repressão anti-senso, a expressão aumentada do transgene s-64 resultou em um pequeno aumento no

crescimento e desenvolvimento da planta. A taxa fotossintética dos tabacos transgênicos foi correlacionada com o desenvolvimento das plantas. Enquanto a fotossíntese nas linhagens anti-senso diminuiu, nas linhagens senso ela aumentou.

De forma coerente com a inibição da translocação de sacarose à longa distância, a repressão anti-senso do gene homólogo de sbp levou ao maior acúmulo de amido nas folhas, à inibição da fotossíntese e ao crescimento retardado dessas linhagens. No entanto, o padrão de acumulação de açúcares em plantas anti-senso não foi idêntico ao observado em plantas que expressam o carreador H^+ /sacarose na orientação anti-senso (KUHN et al., 1996). Nas folhas das plantas anti-senso para o gene SUT o nível de amido aumentou, no entanto, nas plantas anti-senso para o gene s-64/sbp ele foi maior, enquanto a concentração de açúcares não-redutores foi significativamente menor, quando comparada à das plantas-controle. De fato, a repressão anti-senso do homólogo do gene sbp resultou em um aumento da alocação do carbono fixado na direção da síntese do amido. Estas diferenças podem indicar que as proteínas SBP/S-64 e o carreador H^+ /sacarose têm funções distintas na translocação intracelular de sacarose. Uma hipótese seria que a proteína SBP serve como uma proteína adicional reguladora no sistema de importação de sacarose em plantas. Alternativamente, a proteína SBP pode funcionar como uma proteína reguladora das atividades de degradação e síntese de sacarose, o que favorece a absorção mediada por um carreador de sacarose no transporte à longa distância. Estas possibilidades não são mutuamente exclusivas e favorecem o argumento de que a proteína SBP/S-64 atua em conjunto com o transportador simporte SUT de H^+ /sacarose, para mediar o transporte de sacarose em células vegetais. Consistente com este modelo, a proteína SBP co-localiza com transportadores de H^+ /sacarose e H^+ /ATPase na membrana plasmática das células de transferência em sementes em desenvolvimento de *Vicia faba* (HARRINGTON et al., 1997a). Além disto, na membrana plasmática de células da epiderme abaxial, o acúmulo da proteína SBP é temporariamente coordenado com a atividade de transporte de sacarose e o V_{max} do transportador de sacarose SUT (HARRINGTON et al.,

1997b). Esse modelo proposto também prediz que o acúmulo de SBP em tecidos-dreno deve ser coordenado com a diminuição na atividade do sistema de importação de sacarose, independente de invertase. Várias linhas de evidência são consistentes com esta hipótese. Primeiro, a proteína SBP acumula, principalmente, nas membranas de células ativamente envolvidas no transporte de sacarose. Segundo, em cotilédones de soja e *Vicia faba*, uma correlação negativa entre o acúmulo de transcritos do gene *sbp* é coordenado com o período de expansão celular e armazenamento, concomitantemente com o declínio da atividade da invertase da parede celular, programado pelo desenvolvimento (WEBER et al., 1995). Finalmente, a mesma correlação negativa foi observada neste trabalho, no qual foi demonstrado que baixos níveis da proteína SBP nas linhagens anti-senso foram associados com altos níveis da atividade da invertase da parede celular.

Alternativamente, o crescimento e o florescimento retardados das linhagens anti-senso podem não ser um efeito direto do baixo acúmulo do homólogo de SBP, porque as folhas das linhagens anti-senso também exibiram alta atividade da invertase de parede celular. Em plantas transgênicas que expressam uma invertase de levedura no espaço apoplástico, a sacarose translocada é clivada na parede celular, pela invertase apoplástica em glicose e frutose (VON SCHAEWEN et al., 1990; SONNEWALD et al., 1991; DICKINSON et al., 1991; HEINEKE et al., 1992). Uma vez que os açúcares na forma de hexose não parecem ser eficientemente translocados no floema, eles são reimportados nas células do mesófilo e causam uma grande redução na exportação de sacarose, o que leva a um crescimento bastante reduzido. Conseqüentemente, níveis elevados da atividade de invertase da parede celular nas plantas anti-senso poderiam responder pelos fenótipos apresentados. Também, tem sido demonstrado que a proteína SBP exerce uma função direta no transporte de sacarose, uma vez que essa proteína foi capaz de mediar a absorção de sacarose, quando foi expressa em uma levedura deficiente na utilização de sacarose extracelular (GRIMES e OVERVOORDE, 1996; OVERVOORDE et

al., 1996). Além disto, foi demonstrado que anticorpos contra SBP inibem seletivamente a absorção de sacarose, pelas células de transferência dos cotilédones de *Vicia faba* (FIEUW et al., 1992). Esclarecimentos adicionais sobre o envolvimento da proteína SBP no transporte de sacarose foram fornecidos pelos resultados de superexpressão do gene s-64. O acúmulo do homólogo de SBP da soja em tabaco pareceu aumentar a eficiência de transporte de sacarose e não foi correlacionado com a atividade de invertase da parede celular, Figura 8(A).

As folhas maduras das três linhagens das plantas senso tiveram maior concentração de amido, quando comparadas às plantas-controle, enquanto o nível de sacarose nas folhas não foi significativamente alterado (Figura 7). Uma vez que a fotossíntese foi aumentada nessas plantas, um excesso de sacarose poderia não ser detectado, porque esse dissacarídeo foi aparentemente utilizado para translocação à longa distância. Esse argumento é sustentado pela taxa de crescimento das plantas senso ligeiramente maior, quando comparada às plantas-controle. Consistente com esta observação, a atividade de invertase vacuolar foi aumentada significativamente nas folhas senso, Figura 8(B). Em folhas que estão crescendo sob condições normais, a sacarose é temporariamente armazenada no vacúolo, antes de ser exportada para os órgãos-dreno. O aumento da atividade de invertase vacuolar poderia prevenir o armazenamento de sacarose no vacúolo, como uma consequência direta do aumento da taxa de exportação.

Em resumo, os fenótipos relacionados ao crescimento e aos seus efeitos fisiológicos, causados pelas plantas senso, e a expressão anti-senso do gene s-64 são consistentes com o envolvimento do homólogo de SBP na via de translocação de sacarose à longa distância. Uma vez que a proteína SBP está localizada principalmente em tecidos-dreno envolvidos ativamente na absorção de sacarose, é mais provável que ela esteja envolvida em mecanismos de descarregamento do floema. No entanto, tem sido demonstrado que a proteína SBP também se acumula nas folhas maduras de soja e na membrana plasmática dos elementos do tubo crivado, em folhas completamente expandidas de espinafre (WARMBRODT et al., 1989), o que indica uma possível função no

carregamento. O isolamento do gene homólogo de tabaco e a análise do seu padrão de expressão permitirão o teste direto dessas possibilidades. Apesar dos efeitos fenotípicos das plantas transgênicas, os resultados encontrados neste trabalho não descartam a possibilidade de que estes sintomas fisiológicos ocorram em virtude dos efeitos pleiotrópicos, uma vez que a manipulação do nível do homólogo de SBP também alterou a atividade da invertase de parede celular. Além disto, a razão de açúcares solúveis/insolúveis nas folhas anti-senso pode suportar a idéia de que a exportação diminuída nessas plantas anti-senso é o resultado da produção de amido nas folhas maduras. No entanto, a observação de que a proteína SBP media a absorção de sacarose diretamente em leveduras e os efeitos fisiológicos causados pelo acúmulo do seu homólogo em tabacos transgênicos evidenciam um envolvimento direto da proteína SBP no transporte de sacarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- BUSH, D. Electrogenicity, pH dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. **Plant Physiology**, v.93, p.1590-1596, 1990.
- DELROT, S. Phloem loading. In: BAKER, D.A., MILBURN, J.A. (Eds.) **Transport of photoassimilates**. London: Longman Scientific, 1989. p.167-205.
- DICKINSON, S., ALTABELLA, T., CHRISPPEELS, M. Slow growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplastic invertase. **Plant Physiology**, v.95, p.420-425, 1991.
- FIEUW, S., FRANCESCHI, V.R., HITZ, W.D., PATRICK, J.W. Antibodies against the sucrose binding protein specifically inhibits sucrose-proton symporter by transfer cell protoplasts of developing *Vicia faba* L. seed. **Plant Physiology**, v.99, n.40, 1992.
- FRÖMMER, W.B., SONNEWALD, U. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.587-607, 1995.

- GAHRTZ, M., STOLZ, J., SAUER, N. A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. **Plant Journal**, v.6, p.697-706, 1994.
- GRIMES, H.D., OVERVOORDE P.J., RIPP, K. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. **The Plant Cell**, v.4, p.1561-1574, 1992.
- GRIMES, H.D., OVERVOORDE P.J. Functional characterization of sucrose binding protein-mediated sucrose uptake in yeast. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.1217-1222, 1996.
- HARRINGTON, G.N., FRANCESCHI, V.R., OFFLER, C.E., PATRICK, J.W., TEGEDER, M., FRÖMMER, W.B., HARPER, J.F., HITZ, W.D. Cell specific expression of three genes involved in plasma membrane sucrose transport in developing *Vicia faba* seed. **Protoplasma**, v.197, p.160-173, 1997a.
- HARRINGTON, G.N., NUSSBAUMER, Y., WANG, X.D., TEGEDER, M., FRANCESCHI, V.R., FRÖMMER, W.B., PATRICK, J.W., OFFLER, C.E. Spatial and temporal expression of sucrose transport-related genes in developing cotyledons of *Vicia faba* L. **Protoplasma**, v.200, p.35-50, 1997b.
- HEINEKE, D., SONNEWALD, U., BÜSSIS, D., GÜNTER, G., LEIDREITER, K., WILKE, I., RASCHKE, K., WILLMITZER, L., HELDT, H.W. Apoplastic expression of yeast-derived invertase in potato. **Plant Physiology**, v.100, p.301-308, 1992.
- HODGE, J.E., HODFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L., WOLFROM, M.L. (Eds.) **Methods in carbohydrate chemistry**. v.1. New York: Academic Press, 1962. p.380-394,
- KÜHN, C., QUICK, W.P., SCHULZ, A., SONNEWALD, U., FRÖMMER, W.B. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. **Plant Cell Environment**, v.19, p.1115-1123, 1996.
- KÜHN, C., FRANCESCHI, V.R., SCHULZ, A., LEMOINE, R., FRÖMMER, W.B. Localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements indicate macromolecular trafficking. **Science**, v.275, p.1298-1300, 1997.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

- LEMOINE, R., DELROT, S. PMV-driven sucrose uptake in sugar beet plasma membrane vesicles. **FEBS Letters**, v.249, p.129-133, 1989.
- LEMOINE, R., GALLET, O., GAILLARD, C., FRÖMMER, W.B., DELROT, S. Plasma membrane vesicles from source and sink leaves. **Plant Physiology**, v.100, p.1150-1156, 1992.
- LEMOINE, R., KÜHN, C., THIELE, N., DELROT, S., FRÖMMER, W.B. Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and stability. **Plant Cell Environment**, v.19, p.1124-1131, 1996.
- LOWELL, C.A., TOMLINSON, P.T., KOCH, K.E. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. **Plant Physiology**, v.90, p.1394-1402, 1989.
- 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**, v.190, p.88-96, 1993.
- MATRONGOLO, F.S. **Caracterização de uma proteína secretória de soja e de sua interação com Bip**. Viçosa-MG: UFV, 1998. 69p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NASCIMENTO, R., MOSQUIM P.R., ARAUJO, E.F., SANT'ANNA, R. Distribution of starch, soluble sugars and invertase activities in soybean explants under several sucrose concentrations and different nitrogen sources. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, p.125-130, 1998.
- 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 Biology and Chemistry**, v.272, p.15898-15904, 1997.
- OVERVOORDE, P.J., FRÖMMER, W.B., SPENCER, D. A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. **The Plant Cell**, v.8, p.271-280, 1996.
- OVERVOORDE, P.J., GRIMES, H.D. Topographical analysis of the plasma membrane-associated sucrose binding protein from soybean. **Journal of Biology and Chemistry**, v.269, p.15154-15161, 1994.

- RIESMEIER, J.W., HINER, B., FRÖMMER, W.B. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. **The Plant Cell**, v.5, p.1591-1598, 1993.
- RIESMEIER, J.W., WILLMITZER, L., FRÖMMER, W.B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **EMBO Journal**, v.11, p.4705-4713, 1992.
- RIESMEIER, J.W., WILLMITZER, L., FRÖMMER, W.B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **EMBO Journal**, v.13, p.1-7, 1994.
- 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**, v.88, p.1435-1445, 1988.
- RUSSIN, W.A., EVERT, R.F., VANDERVEER, P.J., SHARKEY, T.D., BRIGGS S.P. Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the sucrose export *defective1* maize mutant. **The Plant Cell**, v.8, p.645-658, 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning - A Laboratory Manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 314p.
- SAUER, N., STOLZ, N. SUC1 e SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. **Plant Journal**, v.6, p.67-77, 1994.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biology and Chemistry**, v.195, p.19-23, 1952.
- SONNEWALD, U., BRAUER, M., VON SCHAEWEN, A., STITT, M., WILLMITZER, L. Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. **Plant Journal**, v.1, p.95-106, 1991.
- VON SCHAEWEN, A., STITT, M., SCHMIDT, R., SONNEWALD, U., WILLMITZER, L. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and

inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. **EMBO Journal**, v.9, p.3033-3044, 1990.

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 members of spinach leaves. **Planta**, v.180, p.105-115, 1989.

WEBER, H., BORISJUK, L., HEIM, U., BUCHNER, P., WOBUS, U. Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: Cloning of cDNAs and cell-type specific expression. **The Plant Cell**, v.7, p.1835-1846, 1995.

WILLIAMS, L.E., NELSON, S.J., HALL, J.L. Characterization of a solute/proton cotransport in plasma membrane vesicles from *Ricinus* cotyledons, and comparison with other tissues. **Planta**, v.186, p.541-550, 1991.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE FENOTÍPICA DA INIBIÇÃO ANTI-SENDO DO GENE HOMÓLOGO DE SBP NA GERAÇÃO R1 DE TABACOS TRANSGÊNICOS E ESTUDOS DE ENXERTIA

1. INTRODUÇÃO

A fotossíntese em plantas superiores produz uma grande quantidade de fotoassimilados. Os carboidratos das folhas maduras são distribuídos nas plantas por um sistema vascular bastante complexo, principalmente na forma de sacarose, para suportar o crescimento dos tecidos-dreno como folhas jovens, raízes e órgãos reprodutivos (WILLIAMS et al., 1991). O transporte ativo por meio de carreadores na membrana plasmática e o transporte via simplasto têm sido discutidos como possíveis mecanismos de carregamento e, ou, descarregamento no floema. Em estudos bioquímicos com células isoladas e vesículas de membranas plasmáticas tem sido identificada uma grande quantidade de carreadores dependentes e independentes de prótons acoplados à sacarose (LEMOINE et al., 1989, 1992; WILLIAMS et al., 1991). Esses estudos demonstraram que a cinética de absorção de sacarose segue um padrão bifásico com um componente saturável de alta afinidade e outro não-saturável de baixa afinidade (DELROT, 1989). A superexpressão senso ou a inibição anti-senso desses carreadores têm demonstrado afetar o particionamento dos carboidratos,

assim como o desenvolvimento global da planta, em alguns casos. Diante disto, maiores estudos devem ser feitos para avaliar o efeito dos carreadores na exportação (carregamento) e, ou, importação (descarregamento) dos fotoassimilados.

Estudos anteriores identificaram um carreador de sacarose denominado “Sucrose Binding Protein”, em cotilédones de soja que possuía a capacidade de se ligar a um análogo de sacarose denominado 6-³HABS (RIPP et al., 1988). Mais recentemente, foi isolada, em um laboratório da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, uma proteína homóloga de SBP, designada S-64, que parece ter uma função relevante no metabolismo e na translocação de sacarose (DELÚ-FILHO et al., 2000). Nesses estudos, as tecnologias de superexpressão de genes heterólogos e repressão anti-senso foram utilizadas para a manipulação dos níveis de SBP em células de tabaco em suspensão. Nessas condições, a taxa de absorção de sacarose pelas células transgênicas foi diretamente correlacionada com os níveis da proteína SBP. Além disso, nas células transgênicas, as atividades de hidrólise de sacarose foram afetadas de modo compensatório. Consistente com a maior taxa de absorção de sacarose pelas células senso, a atividade intracelular da sintase da sacarose aumentou consideravelmente com o declínio simultâneo da atividade da enzima invertase de parede celular. Em contraste, nas células anti-senso, a inibição do acúmulo de SBP causou aumento significativo da atividade da invertase da parede celular, favorecendo um sistema alternativo de absorção de carboidratos. Esses resultados indicaram que a proteína S-64/SBP, provavelmente, está envolvida na absorção de sacarose pelas células vegetais.

No capítulo anterior também foram utilizadas as técnicas de inibição anti-senso e a superexpressão de genes heterólogos para estudar a função do gene s-64 da soja no particionamento de carboidratos em plantas. Algumas linhagens transgênicas, contendo a construção senso e anti-senso do gene s-64 da soja, foram obtidas e avaliadas em seu crescimento e desenvolvimento. De modo geral, as plantas anti-senso exibiram fenótipos característicos de inibição da translocação de sacarose, como: retardamento no crescimento e florescimento,

inibição retroativa da taxa fotossintética e alteração no particionamento de carboidratos. Por outro lado, o desempenho das plantas senso foi superior ao das plantas-controle, o que favorece o argumento de que o gene s-64 pode ser considerado uma ferramenta que objetiva o melhoramento genético. No entanto, as análises fenotípicas e de expressão do transgene foram limitadas aos transformantes primários. Além disso, uma vez que as expressões dos transgenes senso e anti-senso estava sob o controle do promotor CaMV-35S, não foi possível determinar se a proteína SBP/S-64 está predominantemente envolvida no carregamento ou descarregamento do floema. Neste capítulo, os efeitos fenotípicos do gene s-64 foram analisados na geração transgênica R1, juntamente com os experimentos de enxertia recíproca, para identificação do local de atuação da proteína homóloga de SBP no transporte de sacarose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aclimação das plantas transformadas

As plantas de tabaco foram transformadas com o gene s-64 na orientação senso e anti-senso, conforme descrito no Capítulo 1. As linhagens utilizadas foram regeneradas em meio sólido MS, cuidadosamente retiradas das magentas, e suas raízes foram exaustivamente lavadas com água, para retirada do excesso de gel. Após as lavagens, as plantas foram colocadas em copos plásticos, envoltos em saco plástico, contendo água destilada. Em seguida, as plantas foram colocadas em vasos com solo PLANTMAX (Cargill S.A.) casa de vegetação.

2.2. Análises de “immunoblotting”

2.2.1. Isolamento de proteínas

Uma fração enriquecida de membranas de folhas foi preparada de acordo com RIPP et al. (1988). Aproximadamente 5 g de folhas jovens ou maduras foram utilizadas para este experimento. O material foi macerado em N₂ líquido e, em seguida, foram adicionados 15 mL de tampão de extração [sacarose 0,25 mol/L; DTT 0,0025 mol/L; MgSO₄ 0,01mol/L; Tris-HCl 0,025 mol/L

pH 7,0; PMSF 0,0005 mol/L; e gelatina 0,5% (p/v) e EGTA 0,01 mol/L] numa razão de 1:3. Após a homogeneização, esse material foi filtrado em gaze e centrifugado a 13.000 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 85.000 x g, durante 50 minutos. Em seguida, o precipitado foi lavado com Tris-HCl 10 mmol/L pH 6,8, juntamente com DTT 5 mmol/L e PMSF 2,5 mmol/L. A centrifugação e a lavagem foram repetidas por duas vezes, e o precipitado foi ressuscitado em tampão fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mmol/L pH 7,5). A concentração de proteínas foi determinada de acordo com BRADFORD (1976).

2.2.2. "Western blot"

Aproximadamente 40 µg de proteínas de membrana foram resolvidas em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, usando o sistema de transferência da BIORAD (USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-T [Tris-HCl 100 mmol/L, pH 7,6, NaCl 1,5 mmol/L, Tween 20 0,1% (v/v)], por 1 hora, à temperatura ambiente, e incubada com o anticorpo contra S-64, numa diluição 1:1000, por 12 horas sob agitação. Seguido o período de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T, três vezes, por 15 minutos cada, e, em seguida, incubada com o anticorpo contra IgG de coelho, conjugada à fosfatase alcalina ("Sigma Chemical Company", USA), numa diluição de 1:5000, por aproximadamente 2 horas. A membrana foi lavada intensivamente com TBS-T e, logo após, incubada com tampão da enzima (Tris-HCl 100 mmol/L, pH 9,8, NaCl 100 mmol/L e $MgCl_2$ 0,5 mol/L), por 5 minutos. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-nitro-tetrazolium, Gibco BRL, USA) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, Gibco BRL, USA).

2.3. Determinação dos parâmetros de crescimento e desenvolvimento

A taxa fotossintética, a transpiração e a condutância estomática de folhas jovens e completamente expandidas foram medidas pelo analisador de gás infravermelho portátil (modelo LCA-2, “Analytical Development Co. Ltd.”, Hoddeston, UK), em irradiância de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com um fotoperíodo de aproximadamente 14 horas e temperatura de 25°C. As análises fotossintéticas do experimento de enxertia foram feitas no 15º dia após a sua montagem, usando as mesmas condições estabelecidas anteriormente.

2.4. Determinação da matéria seca das partes aérea e radicular dos tabacos transgênicos

As plantas usadas para a análise de crescimento foram separadas em parte aérea e parte radicular. O material foi seco em estufa de circulação forçada de ar, a uma temperatura de 80 °C, 60 horas, e depois pesado.

2.5. Análise de segregação das plantas transgênicas

Para a análise de segregação, as sementes das plantas transgênicas foram germinadas em meio MS seletivo (150 mg/L de canamicina) sem sacarose e BAP (DEROL e GARDNER, 1988). Após o período de 25 dias, as plântulas foram contadas de acordo com o fenótipo (branco; suscetível e verde; e resistente). As plântulas resistentes foram aclimatadas e conduzidas para casa de vegetação, para testes posteriores.

2.6. Obtenção do porta-enxerto contendo plantas transgênicas de tabaco

As plantas transgênicas transformadas com o vetor binário pBI121 e o gene s-64 na orientação anti-senso (R1s64as6) foram usadas para o experimento

de enxertia, quando as plantas atingiram 15 dias em casa de vegetação. A técnica de garfagem no topo em meia fenda foi utilizada, e a região cortada foi revestida por filme plástico, a fim de evitar a desidratação. As folhas foram coletadas 60 dias após a enxertia.

2.7. Avaliação do florescimento em plantas transgênicas de tabaco

As plantas transgênicas R1s64AS e controle foram registradas e avaliadas num período de 90 dias, em espaços de sete dias. Para o experimento de enxertia, as plantas foram avaliadas durante 40 dias após a enxertia com espaçamento de três dias.

2.8. Determinação da atividade da enzima redutase do nitrato

Para determinação da atividade da redutase do nitrato, os tabacos transgênicos enxertados, descritos anteriormente, foram retirados da casa de vegetação, e uma folha completamente expandida da região apical foi usada nas análises posteriores. Para cada tratamento, foram feitas três repetições, contendo 30 discos foliares. Após terem sido retirados os discos foliares e anotado o peso, o material foi ressuspendido em 10 mL do meio de incubação [tampão fosfato 0,1 mol/L pH, 7,5; KNO₃ 0,02 mol/L; e propanol 2% (v/v) e quatro gotas de triton X100 5% (v/v)] e, em seguida, transferido para um dessecador a vácuo, a fim de proporcionar a entrada do substrato no interior celular. O vácuo foi aplicado três vezes consecutivas, com a duração de 1 minuto cada. Imediatamente, os frascos com as amostras foliares foram incubadas em banho-maria, a uma temperatura de 30 °C, em condições de escuro. Após 10 e 40 minutos de incubação, foram feitas as amostragens quanto à atividade da enzima redutase do nitrato, a partir da quantificação por espectrofotometria ($\lambda = 540$ nm) do nitrito formado em meio de reação [sulfanilamida 0,06% (v/v); n-naftil etilenodiamina hidrocloreto 0,0012% (v/v) e 1 ml da amostra].

2.9. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram feitas por meio do programa “Statistica Switcher Program”, versão 5.0, 1984-1995. As análises das amostras foram feitas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Segregação e incorporação do transgene s-64 na geração R1s64

Para determinar se a expressão do transgene s-64 da soja permaneceu estável nas gerações futuras e obter linhagens homozigotas dominante, algumas sementes das progênies em diferentes linhagens senso e anti-senso foram germinadas *in vitro*, na presença de canamicina (Quadro 1). Os resultados demonstraram segregações do tipo mendeliana e não-mendeliana, confirmando a expressão do gene marcador nptII incorporado ao genoma de tabaco, juntamente com o gene s-64. As linhagens que segregam 3:1 foram selecionadas para obtenção de homozigose, nas gerações seguintes. As plantas que possuíram genética 3:2 foram utilizadas no experimento, pelo fato de terem uma genética simples para estudos fisiológicos.

3.2. Repressão anti-senso do gene homólogo de SBP

As análises de “immunoblotting” demonstraram que o gene homólogo de s-64/sbp em tabaco parece ter uma expressão aumentada em folhas jovens, Figura 1(B), quando comparadas ao acúmulo de SBP em folhas maduras, Figura 1(A), o que evidencia uma atuação mais acentuada nos tecidos-dreno.

Quadro 1 - Caracterização de sementes de tabaco transformadas com as construções 35S-CaMV-s64S e 35S-CaMV-s64AS, com base na resistência à canamicina, como descrito por DEROL e GARDNER (1988)

Amostras	Verdes	Branças	Total	Taxa Observada	c ²	Razão Testada
R1s64s2-1	636	142	778	4,48*	-----	-----
R1s64s2-2	1042	93	1135	11,2*	-----	-----
R1s64s2-6	383	34	417	11,26*	-----	-----
R1s64s3-2	1115	-----	1115	1115	-----	≥ 63:1
R1s64s3-4	352	102	454	3,45	2,32	3:1
R1s64s3-5	411	-----	411	411	-----	≥ 63:1
R1s64s3-8	528	-----	528	528	-----	≥ 63:1
R1s64s5-2	330	112	442	2,83	0,03	3:1
R1s64s6-1	577	-----	577	577	-----	≥ 63:1
R1s64s6-5	912	-----	912	912	-----	≥ 63:1
R1s64s6-6	742	-----	742	742	-----	≥ 63:1
R1s64s6-10	412	-----	412	412	-----	≥ 63:1
R1s64as4-2	431	-----	431	431	-----	≥ 63:1
R1s64as4-3	649	55	704	11,8*	-----	-----
R1s64as4-8	298	81	379	3,68	2,65	3:1
R1s64as5-2	552	-----	552	552	-----	≥ 63:1
R1s64as5-8	448	69	517	6,49*	-----	-----
R1s64as6-3	515	57	572	9,03*	-----	-----
R1s64as6-4	643	40	683	16,07	0,18	15:1
R1s64as6-5	551	-----	551	551	-----	≥ 63:1
R1s64as6-6	732	-----	732	732	-----	≥ 63:1
R1s64as6-7	745	-----	745	745	-----	≥ 63:1
R1s64as6-9	547	-----	547	547	-----	≥ 63:1

Obs.: As plantas foram analisadas na razão 3:1 (Can^r:Can^s), 15:1 ou 63:1, usando o teste do χ^2 (6,63).

* Não houve segregação mendeliana.

≥ O número de cópias pode ser maior que 3, mas requer um número maior de plantas para ser exato.

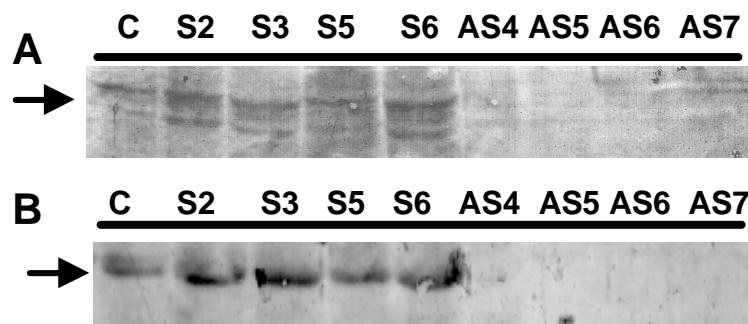


Figura 1 - Uma fração enriquecida de proteínas de membrana foi isolada das plantas-controle (C), senso S (S2, S3, S5, S6) e anti-senso AS (AS4, AS5, AS6, AS7), fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e sondadas com um anticorpo contra S-64. A seta mostra a posição do peptídeo homólogo de SBP em kDa. A) acúmulo do homólogo de SBP em folhas maduras de plantas transgênicas e controle e B) acúmulo do homólogo de SBP em folhas jovens de plantas transgênicas e controle.

Diferentemente do comportamento das plantas R0s64, o acúmulo do homólogo de SBP endógeno, juntamente com a proteína S-64 na geração R1s64S, parece não ser eficientemente aumentado, tanto em folhas maduras como em folhas jovens de tabaco (Figura 1). A não-funcionalidade da superexpressão senso pode ser devido ao efeito pleiotrópico associado a uma variável desconhecida temporal ou espacial. Um ajuste momentâneo a um determinado estresse não conhecido também poderia levar à inibição da superexpressão do gene s-64. Diante desta confirmação molecular (Figura 1) e das análises dos efeitos fisiológicos (dados não-mostrados), foi estabelecido que essas linhagens não possuíam uma expressão estável na geração R1s64S e não seriam analisadas durante o decorrer dos experimentos, pois fenotipicamente as plantas senso R1 eram similares às plantas-controle. Em contraste, as linhagens anti-senso demonstraram um alto nível de inibição do gene homólogo endógeno.

Os sintomas fenotípicos de inibição do gene homólogo de SBP endógeno foram avaliados nas linhagens anti-senso R1 selecionadas, conforme descrito no Capítulo 2.

3.3. Efeitos fenotípicos da inibição do homólogo de SBP

Os típicos fenótipos de inibição da translocação de sacarose à longa distância foram observados nas linhagens anti-senso R1, quando comparadas às plantas-controle. Na casa de vegetação, a taxa de crescimento de quase todas as linhagens anti-senso foram retardadas, o que reflete a indução tardia do florescimento (Quadro 2) e a diminuição do ganho de matéria seca (Quadro 3).

Quadro 2 - Florescimento de tabacos transgênicos R1s64

Amostras	Florescimento (Dias na Casa de Vegetação)
C	61,6 ± 3,13 a
AS4	66,1 ± 5,09 a
AS5	79,8 ± 3,61 b
AS6	80,23 ± 7,89 b
AS7	71,2 ± 6,88 ab

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Turkey ($p = 0,05$).

Quadro 3 - Peso seco de tabacos transgênicos na geração R1s64

Amostras	Parte Aérea	Raiz	Razão Parte Aérea/Raiz	Total
C	52,01 ± 23,50 b	7,37 ± 1,90 b	6,76 ± 1,80 a	59,38 ± 29,56 b
AS4	53,80 ± 16,36 b	5,18 ± 1,82 b	10,78 ± 2,96 b	58,99 ± 17,49 b
AS5	25,60 ± 8,21 a	2,19 ± 0,41 a	11,67 ± 2,84 b	27,80 ± 8,47 a
AS6	21,65 ± 7,30 a	2,28 ± 1,00 a	10,15 ± 2,31 b	23,94 ± 8,16 a
AS7	42,61 ± 7,45 ab	3,34 ± 0,93 a	13,63 ± 4,59 b	45,96 ± 7,36 ab

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Turkey ($p = 0,05$)

Nas linhagens R1s64AS5 (AS5) e R1s64AS6 (AS6), o florescimento foi retardado em quase 20 dias. Esse atraso evidenciou uma possível diminuição na exportação de açúcares e, ou, na importação de sacarose para o meristema floral. Nas linhagens R1s64AS4 (AS4) e R1s64AS7 (AS7), foi verificada uma tendência de essas plantas se comportarem como as demais linhagens anti-senso, apesar de elas serem estatisticamente iguais ao controle. A análise dos fenótipos em casa de vegetação foi conduzida para dez progênies de cada transformante independente, os quais foram cuidadosamente monitorados por meio da expressão do transgene s-64.

Consistente com a severidade dos sintomas, o ganho de matéria seca total nas linhagens transgênicas anti-senso R1s64AS5 (AS5) e R1S64AS6 (AS6) foi significativamente reduzido, comparado ao obtido com as plantas-controle. Esses resultados foram acompanhados por uma diminuição no peso da parte aérea e da raiz, o que confirma o bloqueio na taxa de importação e, ou, exportação dos fotoassimilados. Além disto, a razão parte aérea/raiz demonstrou, claramente, uma diminuição acentuada do crescimento radicular, quando comparado ao da parte aérea, o que evidencia um efeito mais drástico na importação de fotoassimilados. De fato, HEINECKE et al. (1992) e RIESMEIER et al. (1994) demonstraram que uma menor quantidade de carboidratos para os tecidos-dreno levaram a um reduzido crescimento radicular. Esses efeitos são bastante evidentes em batatas transgênicas que possuem uma invertase de levedura, sendo expressos no espaço apoplástico. A linhagem transgênica AS4 (AS4) parece seguir o comportamento das plantas-controle, enquanto a linhagem AS7 (AS7) parece ter a tendência de se comportar de forma semelhante às linhagens 35S-s64 AS5 (AS5) e 35S-s64 AS6 (AS6), porém é estatisticamente igual às plantas-controle.

3.4. Análises fisiológicas das linhagens anti-senso R1

O desenvolvimento retardado das plantas anti-senso indicou que a fotossíntese poderia ter sido alterada, como uma consequência da inibição da translocação de sacarose. De fato, nas folhas maduras das plantas anti-senso 35S-s64 AS5 (AS5), AS6 (AS6) e AS7 (AS7), a taxa de fotossíntese foi reduzida, Figura 2(A), enquanto a fotossíntese das plantas AS4 (AS4) se manteve inalterada, apesar da tendência de diminuição. A redução da taxa de fotossíntese não foi acompanhada pela redução na taxa de transpiração e condutância estomática, Figura 2(B e C), o que evidencia uma regulação bioquímica, em vez de uma regulação clássica por fatores estomáticos.

A fotossíntese das folhas jovens também foi analisada, a fim de avaliar o efeito da inibição do transporte de sacarose à longa distância, em diferentes estádios foliares. Consistente com os dados anteriores, as análises revelaram uma diminuição na taxa fotossintética das plantas AS5 (AS5), AS6 (AS6) e AS7 (AS7), Figura 3(A). Diferentemente da fotossíntese em folhas maduras, a fotossíntese da planta AS4 (AS4) em folhas jovens foi significativamente menor que a da planta-controle. Este resultado confirma a tendência de a fotossíntese ser diferencialmente regulada pela expansão foliar na linhagem R1s64AS4. A redução da taxa de fotossíntese não foi acompanhada pela redução na taxa de transpiração e condutância estomática, conforme detectado para folhas maduras, Figura 3(B e C), o que demonstra que a proteína SBP está diretamente envolvida no transporte de sacarose à longa distância, sendo sua inibição responsável pela diminuição da taxa fotossintética tanto em folhas jovens como em folhas maduras.

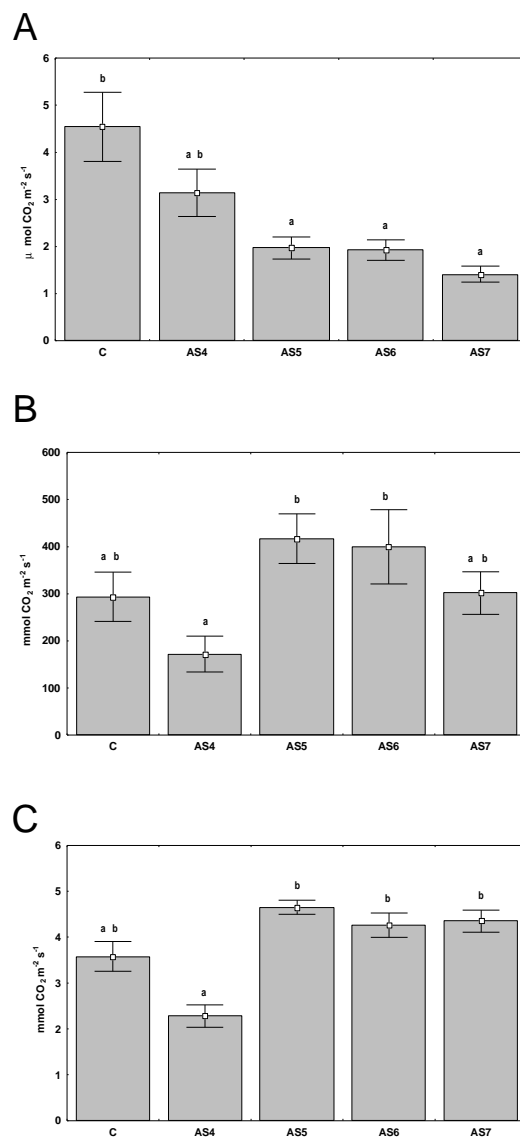


Figura 2 - Medições fisiológicas das folhas maduras das plantas transgênicas de tabaco contendo a construção anti-senso. A) a taxa fotossintética, B) a condutância estomática e C) a transpiração das plantas 35S-s64 anti-

senso (AS4, AS5, AS6, AS7) e folhas-controle foram medidas pelo analisador de gás infravermelho (LCA-2), sob irradiância de crescimento.

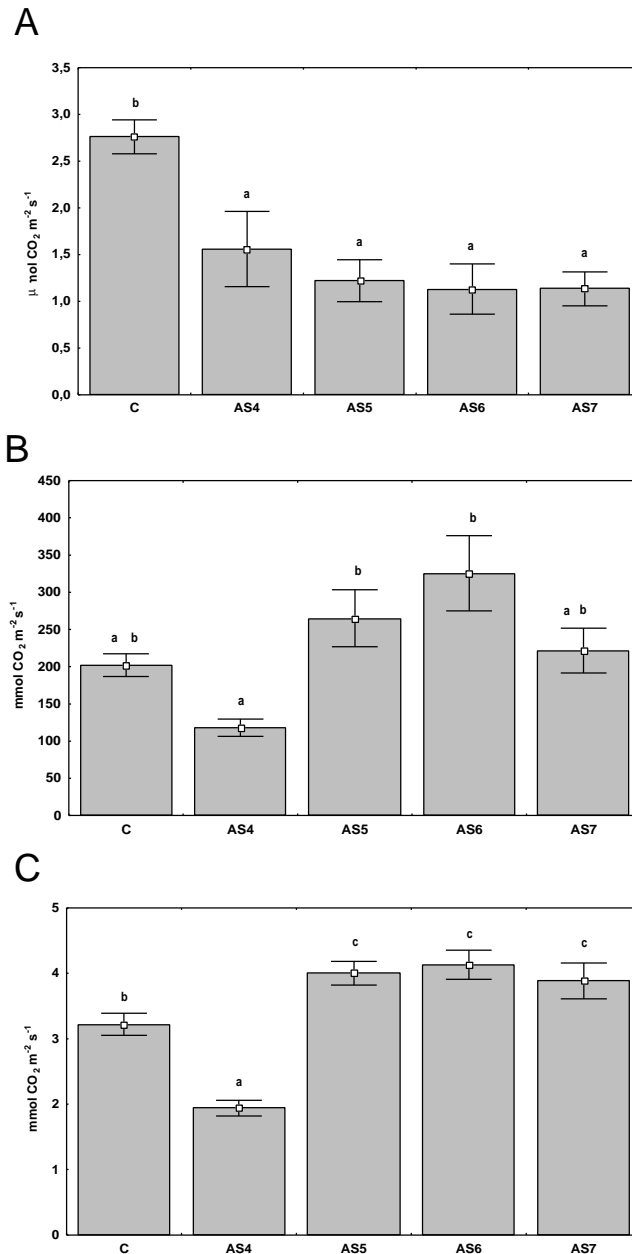


Figura 3 - Medições fisiológicas das folhas jovens das plantas transgênicas de tabaco contendo a construção anti-senso. A) a taxa fotossintética, B) a condutância estomática e C) a transpiração das plantas 35S-s64 anti-senso (AS4, AS5, AS6, AS7) e folhas controle foram medidas pelo analisador de gás infravermelho (LCA-2), sob irradiância de crescimento.

3.5. Experimentos de enxertia recíproca

Paralelamente, os experimentos de enxertia foram conduzidos para determinar se o gene *s-64* atua predominantemente na importação de fotoassimilados. A enxertia tem sido usada na engenharia genética, para estudar o movimento de açúcares à longa distância, assim como o movimento de partículas virais por plasmodesmas (CRUZ et al., 1998; JACKSON et al., 1998; GOLECKI et al., 1999). Essa técnica constitui excelente alternativa para avaliar o impacto do transgene no carregamento (exportação) e, ou, descarregamento do floema (importação) de fotoassimilados.

Para o experimento de enxertia, plantas da linhagem R1s64AS6 foram selecionadas, uma vez que essa linhagem exibiu um fenótipo estável e contrastante em relação ao controle. A fotossíntese das plantas enxertadas revelaram que o tratamento controle-enxerto/anti-senso-porta-enxerto (C/A) foi significativamente diferente do tratamento controle-enxerto/controle-porta-enxerto (C/C) e anti-senso-enxerto/controle-porta-enxerto (A/C), Figura 4(A). A inibição da fotossíntese ocorreu somente quando as plantas anti-senso foram usadas como porta-enxerto, enquanto a enxertia recíproca comportou-se como controle. Este resultado evidencia que o fenótipo desenvolvido pelas plantas anti-senso é, predominantemente, o resultado de alterações na atividade de importação de órgãos-dreno. Supondo que o enxerto seja predominantemente fonte e o porta-enxerto predominantemente dreno, a diminuição na importação de fotoassimilados pelos órgãos-dreno leva ao aumento no acúmulo de carboidratos nas folhas e, conseqüentemente, à redução retroativa da taxa fotossintética. Essa hipótese é sustentada pela tendência de a razão parte aérea/raiz das plantas anti-senso (Quadro 5) mostrar uma redução mais acentuada na raiz. Coletivamente, esses resultados fornecem evidências de que a proteína SBP atua basicamente na importação de sacarose pelos órgãos-dreno.

O florescimento das plantas enxertadas revelou que o enxerto tem efeito predominante sobre o porta-enxerto, quando está envolvido o meristema floral, uma vez que o tratamento anti-senso-enxerto/controle-porta-enxerto (A/C) tem

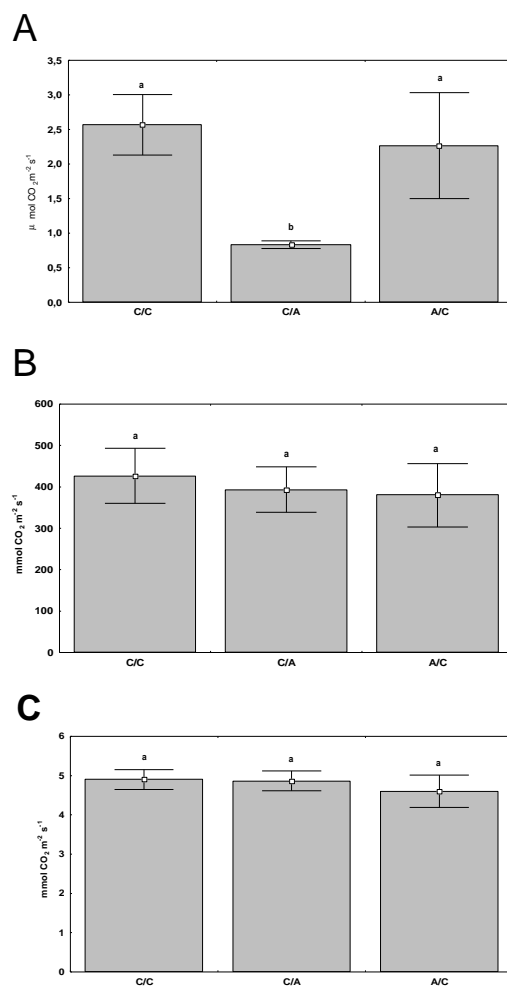


Figura 16 - Medições fisiológicas das plantas transgênicas enxertadas R1s64AS6 e controle sob diferentes posições. A) a taxa fotossintética, B) a condutância estomática e C) a transpiração da enxertia controle-enxerto/controle-porta-enxerto (C/C) controle-enxerto/anti-senso-porta-enxerto (C/A), anti-senso-enxerto/controle-porta-enxerto (A/C) foram medidas pelo analisador de gás infravermelho (LCA-2), sob irradiância de crescimento.

Quadro 4 - Florescimento de plantas transgênicas enxertadas

Amostras	Florescimento (Dias Após a Enxertia)
C/C	18 ± 6,93 a
C/A	20 ± 10,40 ab
A/C	42 ± 2,31 b

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Turkey ($p = 0,05$).

Quadro 5 - Atividade da enzima redutase do nitrato em tabacos enxertados

Amostras	Atividade da RN (nmoles de NO_2 $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ peso fresco)
C/C	165,09 ± 19,65 b
C/A	62,2 ± 16,70 a
A/C	205,66 ± 52,42 b

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Turkey ($p = 0,05$).

um comportamento semelhante ao das linhagens anti-senso não-enxertadas (Quadro 4). Esses resultados fornecem evidências adicionais de que os efeitos da inibição anti-senso constituem o bloqueio do transporte em órgãos-dreno, neste caso, flores. Os demais tratamentos, controle-enxerto/controlador-enxerto (C/C) e controle-enxerto/anti-senso-porta-enxerto (C/A) tiveram um comportamento semelhante ao das plantas-controlador

Uma vez que os açúcares influenciam diretamente o metabolismo do nitrogênio, foram feitas análises da atividade da enzima redutase do nitrato nas plantas enxertadas, tendo as folhas do enxerto sido analisadas (Quadro 5). Não houve diferença estatística entre os tratamentos anti-senso-enxerto/controlador-enxerto (A/C) e controle-enxerto/controlador-enxerto (C/C), para a atividade da enzima RN. Em contraste, no tratamento controle-enxerto/anti-senso-porta-enxerto (C/A), a atividade da enzima RN foi significativamente

menor, sugerindo uma menor quantidade de carboidratos presentes nas folhas. Esse resultado reforça a hipótese de que os fenótipos observados somente se desenvolvem quando o transporte de sacarose é inibido em órgãos-dreno.

4. DISCUSSÃO

Para confirmar a estabilidade de expressão do transgene s-64 da soja na geração R1s64, foram feitas análises de crescimento e desenvolvimento em tabacos transgênicos que tinham a construção senso e anti-senso. Os ensaios de germinação de sementes *in vitro*, na presença de canamicina, confirmaram a expressão do gene nptII (Quadro 3). No entanto, as análises moleculares demonstraram que nas plantas que tinham a construção senso R1s64S o acúmulo da proteína SBP/S-64 não foi significativamente maior do que nas plantas-controle, em folhas jovens e maduras (Figura 13). Esse fato pode ser consequência do efeito pleiotrópico associado a uma variável espacial ou temporal desconhecida. Diante disto, as linhagens senso não foram analisadas no decorrer dos experimentos. Por outro lado, a inibição anti-senso do homólogo de SBP em tabaco persistiu na geração R1s64AS, em um grau superior à geração anti-senso R0s64AS (Figura 3 - Capítulo 1 e Figura 1 - Capítulo 2). Provavelmente, na geração R1, o aumento do acúmulo do RNA anti-senso pelo efeito de homozigose contribuiu para um maior grau de inibição da expressão do homólogo endógeno.

As análises da taxa de crescimento para dez progênies de cada linhagem anti-senso revelaram um retardamento no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo semelhante ao observado na geração R0, principalmente nas

linhagens R1s64AS5 e R1s64AS6 (Quadro 2 – Capítulo 2). Consistente com o desempenho inferior no desenvolvimento das linhagens transgênicas anti-senso, o ganho de matéria seca total das plantas R1s64AS5 e R1s64AS6 foi muito inferior ao obtido pelas plantas-controle. Esses fenótipos contrastantes com as plantas-controle evidenciam um bloqueio na importação e, ou, exportação de fotoassimilados.

O desenvolvimento retardado indica que houve alteração na taxa fotossintética. A atividade da fotossíntese nas folhas jovens e maduras foi 50% menor que a das plantas-controle (Figuras 2 e 3 - Capítulo 2). Além disto, o efeito de inibição da fotossíntese parece ser mais evidente nas folhas maduras, Figura 3(A) - Capítulo 2, do que nas folhas jovens, Figura 2(A) - Capítulo 2. Durante todas as análises fotossintéticas, os parâmetros de condutância estomática, Figura 2(B) e Figura 3(B) - Capítulo 2, e a transpiração, Figura 2(C) e Figura 3(C) - Capítulo 2, não foram diretamente correlacionados com a taxa fotossintética, o que evidencia uma possível regulação bioquímica. Diante deste fato, estudos posteriores devem ser feitos para elucidar o efeito da inibição anti-senso do homólogo endógeno de SBP na elucidação dos efeitos, em nível de mecanismo envolvido. Uma provável explicação poderia ser a redução na síntese de sacarose com concomitante inibição da fotossíntese pelos baixos níveis de Pi na célula.

Uma vez que o promotor CaMV-35S exibe uma expressão constitutiva, expressando-se preferencialmente no tecido vascular, os efeitos da inibição anti-senso poderiam resultar em um bloqueio tanto no carregamento quanto no descarregamento do floema. Além disto, um homólogo de SBP também foi detectado em baixos níveis, em folhas maduras. No entanto, experimentos de enxertia demonstraram que a inibição da fotossíntese somente ocorreu quando o transporte de sacarose foi inibido em tecidos predominantemente dreno (sistema radicular e meristema floral). Nenhuma diferença estatística na taxa de fotossíntese foi observada entre os tratamentos controle-enxerto/control-porta-enxerto e anti-senso-enxerto/control-porta-enxerto, Figura 4(A) - Capítulo 2. Estes resultados evidenciam que a proteína SBP exerce, basicamente, uma função

no descarregamento do floema e que a inibição da importação de sacarose em órgãos-dreno demonstram uma inibição retroativa da fotossíntese.

Consistente com esses dados, um atraso significativo na evocação floral foi observado nas plantas anti-senso-enxerto/controle-porta-enxerto, provavelmente por causa da menor taxa de importação de sacarose, uma vez que os dados discutidos anteriormente evidenciam essa tendência (Quadro 4). A atividade da enzima redutase do nitrato indica que a inibição do transporte de sacarose nos órgãos-dreno afeta drasticamente o metabolismo do nitrogênio nas plantas-controle-enxerto/anti-senso-porta-enxerto (Quadro 5). O mesmo não acontece nos tratamentos anti-senso-enxerto/controle-porta-enxerto e controle-enxerto/controle-porta-enxerto.

Em síntese, esses resultados abrem novas perspectivas sobre a influência da proteína S-64 no metabolismo global das plantas transgênicas de tabaco. Análises posteriores devem ser conduzidas, com o objetivo de elucidar a atuação dessa proteína no metabolismo de açúcares ou mesmo no metabolismo do nitrogênio. Finalmente, estudos com drenos mais potentes devem ser realizados, para a elucidação da função de SBP no metabolismo de sacarose e de açúcares, além da transformação de culturas agrônômicas, com a intenção de lançar variedades mais competitivas no mercado consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CRUZ, S.S., ROBERTS, AG., PRIOR, D.A.M., CHAPMAN, S., OPARKA, K.J. Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. The role of virions. **The Plant Cell**, v.10, p.495-510, 1998.
- DELÚ-FILHO, N., PIROVANI, C.P., PEDRA, J.H.F., MATRAMGOLO, 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 suspension-cultured transgenic tobacco cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.1-9, 2000.
- DELROT, S. Phloem loading. In: BAKER, D.A., MILBURN, J.A. (Eds.) **Transport of photoassimilates**. London: Longman Scientific, 1989. p.167-205,
- DEROL, S., GARDNER, R. Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by Agrobacterium mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.355-364, 1988.
- GOLECKI, B., SCHULZ, A., THOMPSON, G.A. Translocation of structural P proteins in the phloem. **The Plant Cell**, v.11, p.127-140, 1999.

- HEINEKE, D., SONNEWALD, U., BÜSSIS, D., GÜNTHER, G., LEIDREITER, K., WILKE, I., RASCHKE, K., WILLMITZER, L., HELDT, H.W. Apoplastic expression of yeast-derived invertase in potato. **Plant Physiology**, v.100, p.301-308, 1992.
- JACKSON, S.D., JAMES, P., PRAT, S., THOMAS, B. Phytochrome B affects the levels of a graft-transmissible signal involved in tuberization. **Plant Physiology**, v.117, p.29-32, 1998.
- LEMOINE, R., DELROT, S. PMV-driven sucrose uptake in sugar beet plasma membrane vesicles. **FEBS Letters**, v.249, p.129-133, 1989.
- LEMOINE, R., GALLET, O., GAILLARD, C., FRÖMMER, W.B., DELROT, S. Plasma membrane vesicles from source and sink leaves. **Plant Physiology**, v.100, p.1150-1156, 1992.
- RIESMEIER, J.W., WILLMITZER, L., FRÖMMER, W.B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **EMBO Journal**, v.13, p.1-7, 1994.
- 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**, v.88, p.1435-1445, 1988.
- WILLIAMS, L.E., NELSON, S.J., HALL, J.L. Characterization of a solute/proton cotransport in plasma membrane vesicles from *Ricinus* cotyledons, and comparison with other tissues. **Planta**, v.186, p.541-550, 1991.

3. RESUMO E CONCLUSÕES

Foi isolado, em um laboratório da Universidade Federal de Viçosa, um cDNA de uma biblioteca de expressão de sementes de soja, que codifica um homólogo da proteína de ligação a sacarose (SBP), denominado s-64. Para analisar a função desse homólogo de SBP, tabacos transgênicos foram obtidos, introduzindo genes quiméricos que tinham a região codificadora do gene s-64, ligado ao promotor 35S-CaMV, na orientação senso ou anti-senso, via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. O acúmulo do homólogo de SBP foi aumentado em tabacos que superexpressavam o gene s-64, assim como a expressão anti-senso do gene s-64 levou ao decréscimo nos níveis da proteína endógena. As plantas anti-senso desenvolveram sintomas característicos de uma inibição no transporte de sacarose à longa distância e mostraram um reduzido crescimento e desenvolvimento vegetal. Em contraste, as plantas que tinham a construção senso revelaram ter a tendência de crescimento mais rápido e aceleração do desenvolvimento floral. O desempenho no desenvolvimento das plantas transgênicas foi correlacionado com a taxa fotossintética sob condições normais de irradiância. Enquanto a fotossíntese nas linhagens anti-senso diminuiu, nas linhagens senso ocorreu o aumento da taxa fotossintética. Além disto, tanto a repressão anti-senso quanto a superexpressão senso do homólogo de SBP alteraram o particionamento de carboidratos em folhas maduras.

Coletivamente, esses resultados indicam que a proteína S-64 é funcionalmente análoga à SBP, o que representa um importante componente da translocação de sacarose em plantas.

Na geração R1s64, as plantas que continham a construção senso e anti-senso tiveram comportamentos bastante distintos. Enquanto as linhagens senso R1 não repetiram o mesmo padrão de expressão descrito anteriormente na geração R0, nas linhagens anti-senso R1, o decréscimo do acúmulo do homólogo de SBP foi observado em todas as plantas. Na casa de vegetação, as plantas anti-senso tiveram desempenho vegetativo e reprodutivo inferior ao das plantas-controle, seguindo uma tendência de redução na taxa fotossintética tanto em folhas jovens quanto em folhas maduras. Além disto, as folhas jovens parecem ter um desempenho fotossintético bem inferior àquele das folhas maduras, mesmo analisando as devidas proporções com a folha-controle. Uma consequência direta da taxa fotossintética baixa nessas linhagens foi a diminuição do ganho de peso seco. As linhagens anti-senso R1s64AS5 e R1s64AS6 revelaram um padrão de ganho de matéria seca proporcional ao da taxa fotossintética produzida, ou seja, cerca de 50% inferior àquele das plantas-controle. A relação parte aérea/ raiz revelou uma dinâmica em que os órgãos-dreno mais fortes (raiz) foram mais prejudicados que os órgãos drenos mais fracos (parte aérea). Essa observação é consistente com um bloqueio tanto da exportação quanto da importação de fotoassimilados. Entretanto, experimentos de enxertia revelaram que a inibição do transporte de sacarose ocorreu predominantemente no sistema radicular e meristema floral, evidenciando que a proteína S-64 atua predominantemente no dreno.

Estudos preliminares revelaram que a proteína S-64 afeta indiretamente a atividade da enzima redutase do nitrato e abre novas perspectivas sobre essa proteína no metabolismo global das plantas. Tais resultados devem refletir um ajuste metabólico das plantas em resposta à alteração no transporte e metabolismo de sacarose.