



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**Clonagem e Estudo da Expressão do Gene da *mio*-Inositol 3-Fosfato
Sintase (*MIPS*) em maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*
Degener)**

Emanuel Felipe Medeiros Abreu

Brasília-DF

2006

Clonagem e Estudo da Expressão do Gene da *mio*-Inositol 3-Fosfato Sintase (*MIPS*) em maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de MESTRE EM BOTÂNICA.

Emanuel Felipe Medeiros Abreu

Orientador: Francisco José Lima Aragão

Brasília-DF

2006

Este trabalho foi realizado no laboratório de transferência de genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Dr. Francisco José Lima Aragão.

Clonagem e Estudo da Expressão do Gene da *mio*-Inositol 3-Fosfato Sintase (*MIPS*) em maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)

Emanuel Felipe Medeiros Abreu

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Botânica e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília.

Dr. Francisco José Lima Aragão

Presidente da Banca Examinadora-Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Diva Maria de Alencar Dusi

Membro - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

Membro - Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Giovanni Rodrigues Vianna

Membro - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dedico esta Dissertação de Mestrado ao Brasil, que anda tão carente de conhecimentos e valores. Espero que um dia eu possa ajudá-lo a se tornar em uma grande nação.

Agradecimentos

É com muita emoção e satisfação que finalizo mais uma etapa da minha jovem vida profissional. Estou realmente feliz com este acontecimento, pois quando sai do meu querido Ceará para tentar conquistar novos horizontes em Brasília, não imaginava que iria conseguir alcançar com tamanha avidez os objetivos almejados. Embora existisse uma forte determinação de buscar fazer o melhor. Mas considero que nada disso seria factível sem a ajuda das pessoas que pretendo lista abaixo.

Primeiramente, agradeço a Deus, por entender que minha vida pertence a ele, e todas as coisas só são possíveis através da sua permissão.

Aos meus pais, Joaquim e Lúcia, por serem os principais responsáveis por esta conquista. Pois, além da vida, amor, educação, valores, personalidade e palavras de incentivo, estiveram comigo durante todo o período do mestrado, mesmo estando a centenas de quilômetros de mim.

Ao meu querido irmão Henrique, pelas palavras de incentivo, torcida e carinho sempre que nós tínhamos a oportunidade de conversar.

Ao meu orientador Dr. Francisco J. L. Aragão, que sempre esteve presente em todas as fases do mestrado, ensinando, incentivando, e principalmente, orientando para que eu adquirisse uma boa formação acadêmica.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Francisco Campos, pela oportunidade de estagiar na Embrapa Cenargen. Para você minha eterna gratidão e respeito.

Aos meus queridos avós, Raimundo Abreu e Stela, por serem minhas referências de vida e por estarem presentes em todos os momentos, dispostos a ajudar quando necessário.

Ao meu querido tio Tadeu, que me ajudou na revisão do artigo científico, e por ser um exemplo a ser seguido por mim e por qualquer pessoa que queira ser um cientista respeitado.

Aos meus tios, tias, primos e demais familiares que sempre estiveram na torcida transmitindo muitas palavras de carinho, incentivo e confiança.

Aos meus primos, Joãozinho e Mara, por me receberem tão bem em sua casa quando vim fazer a prova do mestrado na UnB.

À minha amada namorada Kenny, que esteve comigo em boa parte dessa jornada, dando-me apoio, palavras de confiança, carinho e amor. Sem a sua presença tenho certeza que este caminho teria sido muito mais árduo.

À Dona Viana que sempre se mostrou solícita e fez coisas por mim que só uma mãe faria por um filho.

A toda família da Kenny, especialmente ao Junior e Karine, que me receberam de braços abertos em sua família, permitindo que eu tivesse um convívio familiar mesmo longe da minha família.

Ao meu amigo Osmundo Brilhante, que me recebeu tão bem na sua casa desde primeira vez que estive em Brasília, e sempre buscou me aconselhar, incentivar e orientar, dando uma importante contribuição para minha formação.

Aos meus amigos de caminhada, Érico e Paulo Henrique, pelo ótimo convívio em nossa república de Cearenses, onde sempre buscamos manter o respeito e tolerância entre nós.

A minha amiga de caminhada e colega de graduação, Carla Letícia, que sempre esteve perto de mim, mesmo distante, acreditando, incentivando, e passando palavras de carinho todas as vezes que tínhamos oportunidade de conversar.

Ao Prof. Luiz Alfredo, pela sua co-orientação e por se mostrar disponível a ajudar e contribuir com a minha formação.

À Prof^a. Conceição Eneida, que contribuiu muito na fase de apresentação do projeto de mestrado.

À Dra. Diva Dusi, pelas valiosas sugestões durante a qualificação e defesa final da dissertação.

Ao meu amigo e colega de trabalho Giovanni Vianna, que contribuiu muito na fase de defesa do projeto, e por sempre se mostrar disponível a ajudar nas técnicas do laboratório.

À Gabriela Araujo, pela grande contribuição que me deu durante o mestrado.

À grande profissional Elsa, que com seu jeito materno sempre esteve disponível a ajudar com as coisas do laboratório.

A todos os meus amigos do Laboratório de Transferência de Genes, Nicolau, Bárbara, Sharon, Wel, Gustavo, Maria Laine, Andréia, Marilha, Hugo, Lívia, Angélica, Thaís, Luiza, Betúlia, Paula, Natália, Aline, Cristiano, Luiz, Nayche, Sérgio, Ana Paula, Margarete, Daniela, Érica, Arlei.

Ao pessoal do Laboratório de Apomixia, Elisangela, Ana Luiza, Larissa e Érica, pelo ótimo convívio no trabalho.

Aos meus colegas de curso, pelo excelente convívio e amizade durante o mestrado. Espero poder reencontrá-los em uma nova caminhada.

Ao Cenargen e todos os funcionários, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta jornada.

A todos os professores do mestrado, que sem dúvida deram uma contribuição importante na minha formação acadêmica e profissional.

A atual coordenadora do mestrado, Prof^a. Dalva Graciano, que me incentivou, aconselhou, e foi uma figura amiga durante o mestrado.

A todos os funcionários da coordenação do mestrado, Flávia, Alexandre, e de maneira especial ao Iriodes, que contribuíram muito para o cumprimento deste trabalho.

Aos amigos Orlando e Andréia, pelo convívio e grande ajuda durante a fase de impressão da dissertação de mestrado.

Finalmente, a todas as pessoas que de uma forma ou de outra passaram pelo meu caminho, e deixaram algo de bom.

Sumário

Sumário de Figuras	xi
Sumário de Tabelas	xii
Abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. Introdução	16
1.1. Aspectos gerais da família Passifloraceae	16
1.2. A espécie <i>Passiflora edulis</i> Sims <i>f. flavicarpa</i> Degener	17
1.3. Importância econômica da cultura do maracujazeiro	17
1.4. Metabolismo do <i>mio</i> -inositol e seus derivados	20
1.5. Características da enzima <i>mio</i> -inositol 3-fosfato sintase (MIPS)	24
1.6. Expressão do gene <i>MIPS</i> em condições de estresse abiótico	27
2. Objetivos	30
3. Material e Métodos	31
3.1. Clonagem de um fragmento do gene <i>MIPS</i> do maracujazeiro (<i>Passiflora edulis</i>)	31
3.2. <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> (5' RACE e 3' RACE)	32
3.3. Análise da expressão do gene <i>PeMIPS</i> por RT-PCR	34
3.4. Análise da expressão do gene <i>PeMIPS</i> sob condições de estresse por frio e calor	35
3.5. Análise de Southern blot para verificação do número de cópias do gene <i>MIPS</i> no genoma de cinco espécies diferentes de <i>Passiflora</i>	35
3.6. Filogenia do gene <i>MIPS</i>	36
4. Resultados e Discussão	38

4.1. Clonagem e sequenciamento do gene <i>MIPS</i> de maracujazeiro (<i>Passiflora edulis</i>)	38
4.2. Análise da proteína PeMIPS	42
4.3. Análise da expressão do gene <i>PeMIPS</i>	43
4.4. Análise da expressão do gene <i>PeMIPS</i> sob condições de estresse por frio e calor	45
4.5. Análise de Southern blot para verificação do número de cópias do gene <i>MIPS</i> no genoma de cinco espécies diferentes de maracujazeiro	47
4.6. Análise filogenética do gene <i>PeMIPS</i>	50
5. Conclusão	52
6. Referências Bibliográficas	53
Anexo 1 Soluções e Reagentes	60
Anexo 2 Submissão das seqüências ao <i>Genbank</i>	65
Anexo 3 Resumo do trabalho apresentado no 52º Congresso Brasileiro de Genética	71
Anexo 4 Artigo concluído e submetido ao periódico <i>Annals of Botany</i>	73

Sumário de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da via enzimática e funcional do <i>mio</i> -inositol e derivados segundo Styer (2000)	23
Figura 2. Reações da rota de síntese do <i>mio</i> -inositol 3-fosfato segundo Stein & Geiger (2002)	26
Figura 3. Modelo da enzima MIPS proposta por Stein & Geiger (2002)	29
Figura 4. Modelo espacial cheio da enzima MIPS	29
Figura 5. PCR 5' e 3' RACE do gene <i>PeMIPS</i>	33
Figura 6. Seqüência completa do cDNA do gene <i>PeMIPS</i> e da proteína deduzida <i>in silico</i>	41
Figura 7. Predição <i>in silico</i> da seqüência da proteína PeMIPS	42
Figura 8. RT-PCR do gene <i>PeMIPS</i> em distintos órgãos e durante o desenvolvimento da semente	44
Figura 9. RT-PCR do gene <i>PeMIPS</i> em plantas oito semanas após a germinação, submetidas a condições de frio e calor	46
Figura 10. Análise de Southern blot no genoma do maracujazeiro	49
Figurar 11. Análise filogenética das seqüências de cDNA do gene <i>MIPS</i>	51

Sumário de Tabelas

Tabela 1. Número de acesso de algumas seqüências do gene <i>MIPS</i> . As seqüências podem ser acessadas pelo <i>GenBank</i> (www.ncbi.nih.nlm.gov)	25
Tabela 2. Alinhamento do gene <i>MIPS</i> de <i>P. edulis</i> com seqüências codificantes completas do gene <i>MIPS</i> de outras espécies	40

ABREVIATURAS

cDNA	- DNA complementar
°C	- graus Celsius
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DNTP	- desoxinucleotídeos trifosfatos
DTT	- ditioneitol
IP ₃	- inositol 1,2,3-fosfato
IP ₆	- fitato
InsP ₆	- fitato
NaCl	- cloreto de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
E.U.A.	- Estados Unidos da América
M	- molar
P	- fósforo
pb	- pares de bases
p/v	- peso por volume
kb	- quilo base (1.000 bases)
RNA	- ácido ribonucléico
g	- força gravitacional
rpm	- rotação por minuto
μ	- micro (10 ⁻⁶)
n	- nano (10 ⁻⁹)
U	- unidades de enzima
Ω	- ohms (unidade de resistência elétrica)
μF	- micro Faraday
kV	- quilo Volts
~	- aproximadamente
mL	- mililitros
ton	- tonelada
ha	- hectare
kV/cm	- quilo volte por centímetro

Resumo

A *mio*-inositol-1L-fosfato sintase (MIPS) é a enzima responsável pela conversão de D-glucose 6-fosfato a 1-L-*mio*-inositol-1-fosfato, primeiro e limitante passo na via de síntese de todos os compostos derivados do inositol. Os inositol-fosfolipídios, assim como outros compostos derivados do inositol, têm um papel fundamental no tráfico de membrana e rotas de sinalização, estocagem e transporte de auxinas, biossíntese de ácido fítico e parede celular, e produção de moléculas relacionadas ao estresse. No presente trabalho, nós caracterizamos um cDNA do gene *MIPS* de sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (*PeMIPS1*) e investigamos a sua expressão espacial, bem como mudanças na transcrição em plantas submetidas ao estresse causado pelo frio e calor. Para estas análises, uma seqüência do cDNA do gene *MIPS* foi isolada por PCR (5' e 3' RACE) e os níveis dos transcritos foram analisados usando RT-PCR semi-quantitativo durante o desenvolvimento da semente, óvulo, grão-de-pólen, folha, caule, pétala, glândula foliar e em resposta ao estresse. A seqüência completa do cDNA do gene *PeMIPS* foi isolada, clonada e caracterizada. Adicionalmente, o número de cópias do gene *PeMIPS* clonado foi determinado por análise de Southern blot no genoma de *Passiflora edulis*, *Passiflora eichleriana*, *Passiflora caerulea*, *Passiflora nitida* e *Passiflora coccinea*. Esta análise indicou que o DNA genômico pode conter diversas seqüências de outros genes *MIPS*, mas uma única cópia do gene *PeMIPS* clonado foi encontrado no genoma de *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* e *P. coccinea*. A análise da expressão por RT-PCR revelou a presença de transcritos de *PeMIPS* em óvulos, grãos-de-pólen, folhas e durante os estágios do desenvolvimento da semente, com um pico nove dias após a polinização. Verificou-se ainda, que o gene *PeMIPS* é diferencialmente regulado sob condições de estresse causado pelo frio e calor em resposta à presença ou ausência de luz. Portanto, o presente trabalho sugere que o *PeMIPS* tem um importante papel no estabelecimento de programas de desenvolvimento e na resposta das plantas à mudanças ambientais.

Abstract

Myo-inositol-1L-phosphate synthase (MIPS) catalyses the conversion of D-glucose 6-phosphate to 1-L-*myo*-inositol-1-phosphate, the first and rate-limiting step in the biosynthesis of all inositol-containing compounds. Inositol phospholipids play a vital role in membrane trafficking and signalling pathways, auxin storage and transport, phytic acid biosynthesis, cell wall biosynthesis, and production of stress-related molecules. In the present study, we characterised an *MIPS* cDNA from developing *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (*PeMIPSI*) seeds and investigated its spatial and differential expression, as well as changes in its transcription during exposure of growing plants to cold and heat stresses. MIPS encoding gene was isolated by PCR methods and the transcript levels were examined using semi-quantitative RT-PCR during seed development, ovules, pollen grains, stem, leaves, petals, leaf gland and in response to heat and cold stress. In addition, the copy number of the cloned *PeMIPS* gene in the genome of *Passiflora edulis*, *Passiflora eichleriana*, *Passiflora caerulea*, *Passiflora nitida* and *Passiflora coccinea* was determined by Southern blot analyses. Full-length cDNA clone of the *PeMIPSI* from *P. edulis* was isolated and characterised. Southern blot analyses indicated that the genomic DNA might have diverse sequences of MIPS-encoding genes and one copy of the cloned *PeMIPSI* gene in the genomes of *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* and *P. coccinea*. RT-PCR expression analyses revealed the presence of *PeMIPSI* transcripts in ovules, pollen grains and leaves, and during the seed developmental stages, where it was observed a transcriptional peak at the ninth days after pollination. The *PeMIPSI* gene is differentially regulated under cold- and heat-stress, presenting a light-responsive transcription. Experimental data suggest that *PeMIPSI* plays an important role in the establishment of developmental programs and during the response of plants to environmental changes. The *PeMIPSI* is differentially regulated during cold and heat stress, presenting a light-response pattern, indicating that the extension of the inositol pathway is an important aspect for environmental stress response.

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais da família Passifloraceae

O gênero *Passiflora* compreende cerca de 500 espécies; é o maior gênero na família Passifloraceae (Rendle, 1959; Maout & Decaisne, 1976; Hickey & King, 1988). Esta família encontra-se largamente distribuída nos trópicos, sendo que 90% das espécies são originárias das Américas. No Brasil, os gêneros *Passiflora* e *Dilkea* são os únicos existentes (Lopes, 1994).

A família Passifloraceae pertence à ordem Malpighiales (Cronquist, 1988), que é constituída de um agrupamento natural de famílias originárias das Theales, uma ordem primitiva. As plantas desta família apresentam-se na forma de trepadeiras vigorosas. Suas folhas podem ser arredondadas ou partidas, com bordos serrados. Nota-se uma variação muito grande no tamanho e forma das folhas, sendo as basais bem maiores do que as folhas dos ramos terminais e florais (Jorgensen *et al.*, 1984). As flores são de tamanho e forma variados, apresentando-se grandes e em forma de tubo (subgêneros *Passiflora* e *Tacsonia*) ou pequenas (subgênero *Decaloba*) (Jorgensen *et al.*, 1984). As flores mostram ainda ampla gama de coloração, podendo ser encontradas em tons de branco, laranja, vermelho, roxo, amarelo e azul. Os frutos são arredondados ou alongados de coloração esverdeada, amarelada, alaranjada ou com manchas verde-claras. As sementes são achatadas e pretas, envolvidas por um arilo gelatinoso de coloração amarelada translúcida.

As espécies de maracujazeiros (*Passiflora*) são consideradas em sua grande maioria perenes, no entanto, algumas são anuais, como é o caso de *P. grandis* (Vanderplank, 1996). Existem cerca de 150 a 200 espécies originadas do Brasil que podem ser utilizadas como alimento, remédios e ornamento, muitas delas com finalidade múltipla. Apesar da ampla variabilidade genética existente no gênero, espécies que produzem frutos comestíveis constituem-se aquelas que apresentam maior importância econômica. Segundo Pereira *et al* (1971), existem cerca de 70 espécies com frutos comestíveis.

1.2. A espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener

Denominado de maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, trata-se de uma trepadeira sublenhosa, glabra e vigorosa. As folhas têm em média 10 cm de comprimento; são trilobadas, com margem serrada, face superior lustrosa e com pecíolo biglanduloso (Bruckner, 2002). As flores são axilares e solitárias, hermafroditas, brancas com franjas roxas. Os filamentos da corona são em quatro ou cinco séries, com pétalas e sépalas brancas, oblongas, de cor púrpura na base e branca no ápice, que se abrem a partir do meio dia e se fecham à noite.

A flor possui androginóforo colunar e bem desenvolvido. O androceu é formado por cinco estames, com filetes livres e inseridos abaixo do ovário. As anteras são dorsifixas. O ovário é globoso, unilocular, multiovulado. O fruto é uma baga globosa, com 5,0 a 7,5 cm em seu maior diâmetro, amarelo quando maduro, com pericarpo pouco espesso, contendo numerosas sementes ovais, reticuladas pretas e polpa ácida e aromática. As sementes têm entre 5 a 6 mm de comprimento por 3 a 4 mm de largura.

A polinização desta espécie é feita por insetos, sendo a mamangava (*Xylocopa* spp.) o principal agente polinizador (Akamine & Girolami, 1959). O maracujazeiro é uma espécie alógama obrigatória (May & Spears Jr., 1988) e a eficiência da polinização é um dos fatores que mais influenciam sua frutificação.

O maracujá-amarelo (*P. edulis*) é uma planta nativa da América do Sul e cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, tais como Havaí, Quênia, Índia, Austrália, Caribe e Brasil. Existem divergências com relação à sua origem, mas é provável que esta espécie tenha se originado no Brasil.

1.3. Importância econômica da cultura do maracujazeiro

A cultura do maracujazeiro tem expressiva importância para a economia brasileira, por ser responsável pela criação de empregos no meio rural, para a produção de frutos, e na área urbana, em decorrência da industrialização do suco concentrado. Os mercados destes produtos têm crescido e a produção é substancialmente maior que aquela de décadas anteriores. Por se tratar de uma fruta pouco conhecida, desperta interesse do mercado

internacional, gerando divisas para o país pela exportação do suco. A espécie mais utilizada nos plantios comerciais brasileiros é a *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg., ou maracujá-amarelo, destinado ao consumo *in natura* e à indústria de processamento de sucos e seus derivados.

Embora o setor alimentício seja o principal responsável pela demanda desta cultura, a indústria farmacêutica tem tido grande interesse na cultura do maracujá. Estudos farmacológicos têm mostrado que o maracujazeiro possui inúmeros compostos com propriedades medicinais. O uso desta planta como um medicamento foi descrito pela primeira vez no Peru em 1969, por um pesquisador espanhol chamado Monardus (Taylor, 1996). Desde então, várias espécies de *Passiflora* vêm sendo extensivamente usadas no sistema tradicional de terapia médica em muitos países. No oeste da Índia, México, Países Baixos e América do Sul, as raízes de maracujá são manipuladas para o uso como sedativo e vermífugo. Na Itália, a planta é usada como anticonvulsivo e sedativo. No Brasil, espécies conhecidas de maracujá são usadas como antiansiolítico, sedativo, diurético e analgésico (Oga *et al.*, 1984).

Entre os setores do agronegócio brasileiro, a produção, comercialização e processamento de frutos constituem-se atualmente como um dos mais promissores. Mudanças nos padrões de demanda, tanto no Brasil quanto no exterior, acompanhados por progressos tecnológicos, têm permitido o crescimento do mercado de frutas e derivados à taxas superiores aos dos demais produtos alimentares (Lima & Cunha, 2004).

Neste cenário, a cadeia frutícola surge como um importante instrumento para promover o desenvolvimento de diversas regiões brasileiras, pois permite a obtenção de maior renda por área cultivada, tornando mais viável os sistemas produtivos baseados em pequenas e médias propriedades. Enquanto um hectare plantado com grãos gera um retorno médio de 100 a 200 dólares, um hectare cultivado com frutícolas pode alcançar valores entre 3.000 a 6.000 dólares, dependendo da fruta selecionada e dos preços vigentes. Além disso, um hectare cultivado com fruteiras pode gerar de dois a seis empregos, contra apenas um emprego direto por hectare de grãos (Savitci *et al.*, 1994).

O maracujá é comercializado, principalmente, sob três formas: fruta fresca, suco concentrado e bebidas prontas. No Brasil o suco de maracujá tem se mantido em terceiro

lugar entre os sucos produzidos, atrás apenas dos de laranja e caju (Bruckner & Melleti, 2001).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, seguido da Colômbia, Peru, Equador, África do Sul, Austrália, Sri Lanka, Nova Guiné, Havaí e Taiwan. No Brasil, a cultura tomou grande impulso a partir de 1970, quando foi expandida para a região Norte e Nordeste para atender à demanda das indústrias de suco concentrado para exportação (Chagas, 1991).

O suco de maracujá ocupa o segundo lugar na pauta das exportações brasileiras de sucos, que movimentam um mercado mundial de cinco bilhões de dólares por ano. A maior parte do suco é exportada na forma concentrada (50° Brix) (Leite *et al.*, 1994), existindo também comércio para o suco engarrafado pronto para o consumo, com concentração de 14° Brix.

Os mercados consumidores do suco de maracujá produzido no Brasil são o europeu (principalmente Holanda) e o norte-americano, que absorvem cerca de 90% das exportações. Este mercado é considerado emergente, necessitando apenas de uma garantia de continuidade do fornecimento ao longo dos anos (Ruggiero *et al.*, 1996; Lima & Cunha, 2004).

Na última década, grandes flutuações nas áreas plantadas com maracujá têm ocorrido, refletindo diretamente sobre a produção e o preço. Também é comum em todas as regiões de cultivo, o caráter itinerante da cultura. Em geral surgem os primeiros plantios, seguidos de uma enorme expansão de área, e em um período variado de três a cinco anos praticamente desaparecem. Este fato se deve principalmente a problemas fitossanitários e ausência de técnicas de manejo adequadas e de tecnologias para a criação de variedades mais produtivas, comprometendo a longevidade e a produtividade dos pomares.

A produtividade dos pomares brasileiros de maracujá é bastante variável; a média nacional está em torno de 10 ton/ha/ano. Essa média é considerada baixa e se deve à não utilização de tecnologias de produção recomendadas para a cultura. A produtividade é ainda menor em pomares semicomerciais ou naqueles em que os produtores cultivam maracujá para consumo próprio, muito comum na região Norte e Centro-Oeste do país. Já em pomares com melhor nível tecnológico, tem-se conseguido elevar a produtividade, em virtude da adoção de práticas culturais importantes (Melleti & Maia, 1999). Essas práticas

consistem na utilização de variedades melhoradas, adubações parceladas e equilibradas, polinização manual, tratos culturais adequados e o controle de pragas e moléstias. Na maioria dos pomares, o uso das recomendações tem sido parcial, limitado pela pequena disponibilidade de capital ou por determinados hábitos locais. Nesses casos, a produção média é de 15 a 20 ton/ha/ano. A produtividade brasileira no ano de 2002 foi de 14 ton/ha/ano, 40 % maior que a média nacional histórica, enquanto a produtividade no Havaí é de 45 ton/ha/ano (IBGE, 2004). Desta forma, para que a cultura do maracujá possa se solidificar, atingindo níveis de produção cada vez mais altos no Brasil, faz-se necessário o incremento dos conhecimentos científicos que permitam subsidiar o desenvolvimento de novas tecnologias para esta cultura.

1.4. Metabolismo do *mio*-inositol e seus derivados

O *mio*-inositol e seus derivados são componentes importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Entretanto, não existem relatos de estudos envolvendo a presença destes componentes no maracujazeiro (*Passiflora edulis*) e em muitas outras espécies de plantas. Diversas funções podem ser atribuídas ao *mio*-inositol e derivados. Além da reserva de fosfato os *mio*-inositol fosfatos estão envolvidos em muitos processos de rotas celulares como, transdução e regulação de sinal, regulação da síntese de ATP (adenosina trifosfato) (Safrany *et al.*, 1999), transporte e estocagem de auxina, biossíntese de parede celular, endocitose e tráfico de vesículas (Saiardi *et al.*, 2002) e produção de moléculas relacionadas ao estresse (Loewus & Murthy, 2000). Participam ainda, do remodelamento da cromatina, reparo e recombinação de DNA (York *et al.*, 1999), expressão de genes e exportação de mRNA (Shen *et al.*, 2003).

Entre as várias formas de *mio*-inositol fosfatos, o ácido fítico é o composto mais abundante nas células. Esta é a maior fonte de fósforo presente nas sementes, acumulando-se também em outros órgãos e tecidos de plantas como polens, raízes, tubérculos e caules (Raboy, 1997). Em plantas, este composto controla concentrações de fósforo inorgânico, funcionando como importante reserva de *mio*-inositol, minerais e fósforo para a utilização durante a germinação da semente e crescimento da plântula (Strother, 1980). O ácido fítico é também encontrado nas células animais. Entretanto, em plantas a função primária deste

composto não está ligada com formas de estocagem de fósforo ou *mio*-inositol. Seu maior papel está na sinalização e mobilização de cálcio de reservas intracelular (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003).

O ácido fítico, assim como outros derivados do *mio*-inositol são sintetizados a partir da glucose 6-fosfato que é convertida para 1D-*mio*-inositol 3-fosfato (IP₁) pela enzima *mio*-inositol 3-fosfato sintase (MIPS) (Loewus *et al.* 1990; Yoshida *et al.* 1999; Loewus & Murphy 2000) (Figura 1). Seguidas fosforilações na molécula de *mio*-inositol conduzem à formação de seus derivados, como o ácido fítico (IP₆) e o *mio*-inositol 1,2,3-fosfato (IP₃), importante molécula sinalizadora na célula.

As vias de biossíntese dos derivados do *mio*-inositol são pouco conhecidas. Entretanto, sabe-se que as plantas possuem outras enzimas como, a *mio*-inositol quinase (MIK), que pode produzir IP₁ a partir de inositol (Figura 1) (English *et al.*, 1966; Loewus *et al.*, 1982). Num estudo temporal do desenvolvimento e maturação de sementes de feijão mungo (*Vigna mungo*), atividade da MIK não pôde ser detectada, mas a MIPS foi encontrada em alta atividade duas semanas após a floração, precedendo a acumulação de ácido fítico (Majumder & Biswas, 1973). Em contraste, ambas as atividades de transcrição de MIPS e MIK foram detectadas na camada de aleurona de semente de arroz, sendo este o local predominante de biossíntese e acúmulo do ácido fítico (Tanaka *et al.*, 1976; Yoshida *et al.*, 1999). Enzimas chave na síntese de inositol e derivados como a MIK e IMP (inositol monofosfato sintase), são cada vez mais compreendidas e suas funções melhor caracterizadas (Figura 1).

Com relação as atividades das enzimas responsáveis pela síntese de diferentes compostos derivados do inositol, e suas respectivas funções. Um estudo com dois mutantes recessivos de milho (*Zea mays*) (*Ipa 1* e *2*) contendo baixos níveis de ácido fítico, identificou-se que os mesmos eram defeituosos na biossíntese de ácido fítico durante o desenvolvimento da semente. No caso do mutante *Ipa 1*, descobriu-se que este era incapaz de produzir *mio*-inositol. Com isso não acumulava, nem produzia *mio*-inositol monofosfato e intermediários de polifosfatos para a biossíntese do ácido fítico na semente. E o segundo, o mutante *Ipa 2*, continha ácido fítico reduzido na semente e acúmulo de intermediários de *mio*-inositol fosfato (Raboy *et al.*, 2000). Sabe-se que o gene *Ipa 2* do milho codifica uma *mio*-inositol fosfato quinase (ZmIPK) pertencente à mesma família de genes do Ins(1,3,4)P₃

5/6 quinase (*MIK*) (Shi *et al.*, 2003), que codifica uma enzima responsável pela adição de fosfato no anel de inositol para a síntese do ácido fítico.

Em um estudo mais recente, um outro mutante de milho (*Ipa 3*) foi caracterizado e seu gene isolado. Este mutante possuía reduzido conteúdo de ácido fítico na semente e acúmulo de *mio*-inositol, mas não possuía intermediários de *mio*-inositol fosfato. Inferiu-se, portanto, que o gene *Ipa 3* do milho codificava uma *MIK* (*mio*-inositol quinase) (Shi *et al.*, 2005).

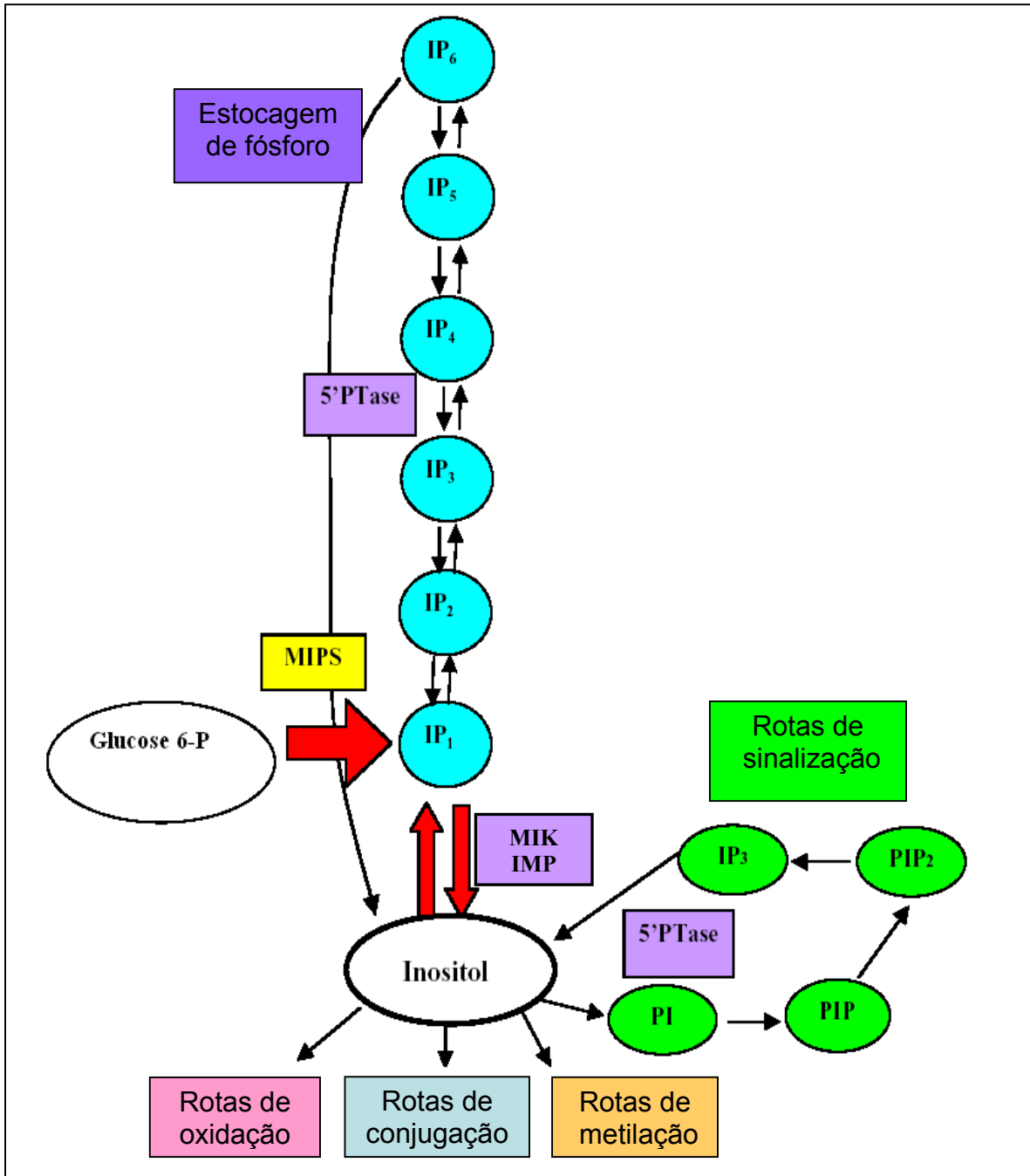


Figura 1. Esquema representativo da via enzimática e funcional do *mio*-inositol e derivados segundo Styer (2000). A enzima *mio*-inositol 3-fosfato sintase (MIPS) realiza um passo chave na síntese dos inositolis, catalisando a reação de síntese de *mio*-inositol 3-P a partir da glicose 6-P. Outras enzimas como a inositol monofosfato sintase (IMP) e a *mio*-inositol quinase (MIK) produzem compostos derivados ao *mio*-inositol 3-fosfato.

1.5. Características da enzima *mio*-inositol 3-fosfato sintase (MIPS)

Nos últimos anos, com as descobertas das inúmeras propriedades de rota celular do *mio*-inositol e derivados, muitos estudos envolvendo as enzimas que fazem parte da via de síntese dos *mio*-inositois têm sido realizados. Neste cenário, a enzima MIPS (Figura 3) assume um papel fundamental, pois é o primeiro passo da via de síntese do *mio*-inositol.

MIPS é a enzima que converte glucose 6-fosfato em *mio*-inositol 3-fosfato, através de reações envolvendo oxidação, enolização, ciclização intramolecular e redução (Figura 2). Nos eucariontes e procariontes esta enzima utiliza NAD^+ como co-fator para suas reações catalíticas em seu domínio conservado (Figura 4) (Majumder *et al.* 1997).

Há alguns anos duas formas de MIPS, citosólica e cloroplasmática, foram encontradas em tecidos de plantas. A primeira estava associada a várias reações importantes do metabolismo celular, e a segunda associada à membrana da tilacóide, que é regulado pelas condições de luz (RayChaudhuri & Majumder, 1996; Majumder *et al.*, 1997; RayChaudhuri *et al.*, 1997).

MIPS é membro de uma família multigênica em algumas espécies de plantas. Em *Arabidopsis thaliana* o gene *MIPS* (*Atmips*) consiste de *Atmips-1* (Johnson, 1994), *Atmips-2* (Johnson & Burk, 1995) e *Atmips-3* (Ishitani *et al.*, 1996). E as proteínas dos genes *Atmips-1* e *Atmips-2* possuem massa molecular de 56.5 kD e 56.3 kD (Tabela 1), respectivamente. Contudo, não se tem referência da massa molecular da proteína do gene *Atmips-3*. Em espécies de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), estima-se conter na família do gene *MIPS* no mínimo quatro e sete membros, respectivamente (Larson & Raboy, 1999).

Os genes e as correspondentes enzimas MIPS já foram isolados em mais de 70 organismos diferentes, incluindo uma grande variedade de procariontes, animais e plantas. Estudos realizados com as seqüências do gene e da proteína MIPS, encontradas em diferentes organismos, revelaram que seus domínios catalíticos funcionais encontram-se bastante conservados (Majumder *et al.*, 2003). Esta constatação indica que o gene praticamente não sofreu grandes mutações ao longo da evolução das espécies, e conseqüentemente, sua funcionalidade tornou-se indispensável para o metabolismo de diversos organismos.

Tabela. 1. Número de acesso de algumas seqüências do gene *MIPS*. As seqüências podem ser acessadas pelo *GenBank* (www.ncbi.nih.nlm.gov).

Nº de acesso	Fonte	Nº de aminoácidos	Predição da massa molecular (kD) ^a
AAC07613 ^b	<i>Aquifex aeolicus</i>	364	40.7
U04876	<i>Arabidopsis thaliana-1</i>	511	56.5
AL022605	<i>Arabidopsis thaliana-2</i>	510	56.3
U66307	<i>Brassica napus</i>	509	56.2
AY382834	<i>Glycine max</i>	511	56.5
AF056325	<i>Hordeum vulgare</i>	510	56.2
U32511	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	512	56.8
AAB85594 ^b	<i>Methanobacterium Thermoautotrophicum</i>	361	40.8
AB032073	<i>Nicotiana paniculata</i>	510	56.4
AB012107	<i>Oryza sativa</i>	510	56.2
X87371	<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	537	61.2
Z11693	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	510	56.4
CAB38887 ^{bc}	<i>Streptomyces coelicolor</i>	361	39.9
AF120146	<i>Triticum aestivum</i>	510	56.3
AF56326	<i>Zea mays</i>	510	56.2

a Massa molecular calculada usando o programa EditSeq (Lasergene Software, DNASTar)

b Seqüência pode ser acessada no GenPept (www.genelinx.org)

c Gene putativo

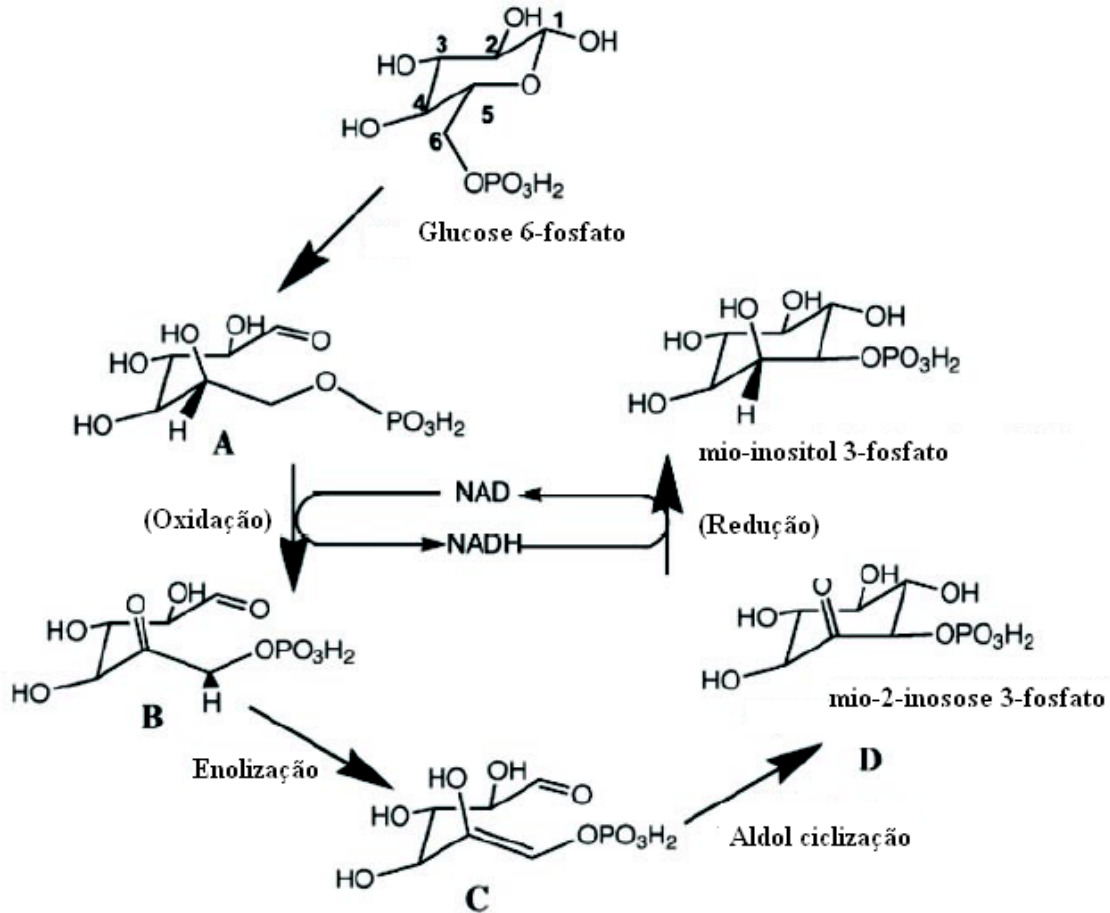


Figura 2. Reações da rota de síntese do *myo*-inositol 3-fosfato segundo Stein & Geiger (2002). (A) A enzima MIPS utiliza o NAD^+ como co-fator para suas reações de oxiredução. (B), (C) e (D) Intermediários do *myo*-inositol 3-fosfato envolvidos nas reações de enolização, aldol ciclização e redução nos demais sítios catalíticos da MIPS.

1.6. Expressão do gene *MIPS* em condições de estresse abiótico

Estresses abióticos como o salino, causado pelo frio ou calor, hídrico e outros, têm uma influência negativa no crescimento e desenvolvimento de muitas espécies de plantas susceptíveis. Isto é resultado da inibição ou ausência de atividade catalítica de muitas enzimas, canais protéicos e outras proteínas metabolicamente essenciais, primariamente envolvidas nestes processos (Bohnert & Shevelena 1998; Blumwald 2000; Burssens *et al.*, 2000; Quesada *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000). Contudo, a susceptibilidade dos organismos aos vários tipos de estresse envolve não só os mecanismos fisiológicos (moleculares), mas os morfológicos e anatômicos.

Em se tratando de mecanismos fisiológicos de adaptações às condições térmicas, muitas plantas e outros organismos poiquilotérmicos (não têm um mecanismo interno que regule a temperatura do seu corpo) adquirem capacidade de se adaptar à temperatura do ambiente ajustando a fluidez da membrana, o metabolismo, e o perfil da expressão de genes (Thomashow 1999). Temperatura baixa, por exemplo, é um dos mais importantes fatores ambientais que influencia a distribuição, crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das plantas. Plantas de regiões temperadas podem aumentar sua capacidade de tolerância ao frio quando são expostas a temperaturas muito baixas. Este fenômeno é conhecido como aclimatação ao frio (Chinnusamy *et al.*, 2006). A chave deste processo está diretamente ligada à influência do frio na indução da expressão de genes. Como no caso da indução das desaturases de lipídios, que ao alterar a composição dos lipídios podem contribuir com a tolerância ao frio (Gibson *et al.* 1994).

Neste contexto, podemos citar também a influência do gene *MIPS* na biossíntese de compostos envolvidos na tolerância aos estresses abióticos, como o D-pinitol e D-ononitol, D-glucoronato usado na síntese de compostos da parede celular, fosfolipídios polinsaturados, glicoproteínas, gomas, e mucilagens (Nelson *et al.*, 1998; Bray *et al.*, 2000; Rathinasabapathi, 2000). Entretanto, o *MIPS* não é o único gene da via de síntese do inositol e seus derivados envolvidos no metabolismo de estresses abióticos. Genes como o di-mio-inositol 1,1'-fosfato sintase (Scholz *et al.*, 1992), que forma a di-mio-inositol 1,1'-fostato, maior soluto intracelular encontrado em archeobactérias hipertermofílicas; e o gene inositol-monofosfato dependente de Mg^{2+} , que produz inositol livre, envolvido na síntese

de compostos com propriedades anti-oxidativas (Majumder *et al.*, 2003), também são genes fundamentais no metabolismo do estresse abiótico.

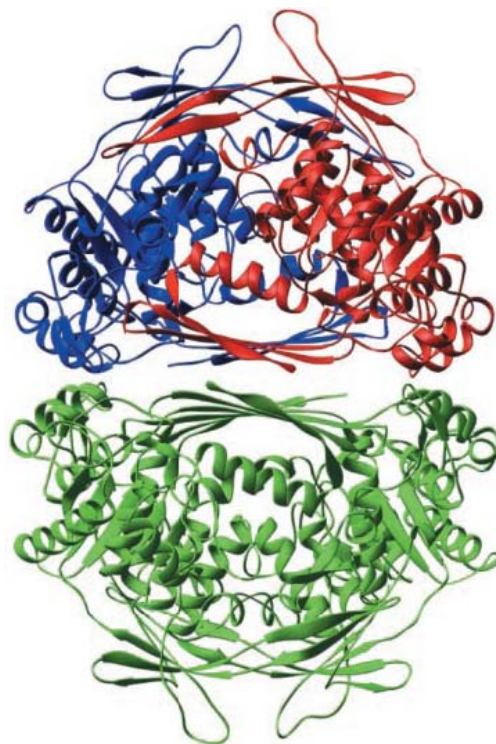


Figura 3. Modelo da enzima MIPS proposta por Stein & Geiger (2002). A enzima é estruturalmente trimérica. Os dois monômeros coloridos de vermelho e azul representam uma unidade assimétrica e o monômero colorido de verde compreendendo uma outra unidade estrutural.



Figura 4. Modelo espacial cheio da enzima MIPS. Os átomos da proteína estão em verde enquanto os átomos do co-fator NAD⁺ estão em roxo, segundo o modelo de Stein & Geiger (2002).

2. Objetivos

Objetivo Geral

Isolar, clonar e caracterizar a expressão temporal e espacial do gene *MIPS* do maracujazeiro (*Passiflora edulis*) (*PeMIPS*)

Objetivos Específicos

1. Clonar e sequenciar a região codificante completa do gene *MIPS* de *P. edulis*.
2. Caracterizar espacial e temporalmente a expressão do gene *MIPS* por meio de análises moleculares em folha, flor, caule e durante o desenvolvimento da semente do maracujazeiro;
3. Estudar o efeito do estresse por calor e frio sobre a transcrição do gene *MIPS* em plântulas de maracujazeiro.
4. Estimar o número de cópias do gene *MIPS* no genoma de espécies de *Passiflora*, através de análise de Southern blot.
5. Realizar um estudo filogenético do gene *MIPS* em diferentes espécies de plantas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Clonagem de um fragmento do gene *MIPS* do maracujazeiro (*Passiflora edulis*)

Para a amplificação e clonagem de um fragmento do gene *MIPS*, o RNA total da semente de maracujá foi isolado seguindo o protocolo do kit de extração Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a partir de 250 mg de sementes (Huang *et al.*, 2000). O DNA genômico excedente presente nas amostras de RNA foi eliminado por meio de tratamento das mesmas com DNase. O RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA usando Superscript III kit (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

A PCR foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Researcher) em 25 µL de solução contendo 40 ng do cDNA, sintetizado a partir de mRNA de semente de maracujá, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 250 nM de cada dNTP; 200 nM de cada primer e 5U da enzima taq DNA polimerase *Platinum High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura foi desnaturada a 94 °C (2 min) e submetida a 34 ciclos de amplificação (94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min, 68 °C por 3 min) com um ciclo final de 10 min a 68 °C. Os primers degenerados PeMIPSF 5' TTCATCAATGGCAGCCCHCARAACAC 3' e MIPSPeR2 5' TCACTTGTAATCCARRATCATGTTATT 3' (Y=C ou T; H= A, T ou C; R=A ou G) foram utilizados para amplificar uma seqüência de 693 pb que corresponde a um fragmento da seqüência codificante do gene mio-inositol 3-fosfato sintase (*MIPS*) de maracujazeiro.

Após a PCR, amostras foram aplicadas no gel de agarose 1% (ver Anexo I) por 1 hora a 100 V. Após a eletroforese os fragmentos correspondentes a 693 pb (gene *MIPS*) foram extraídos do gel utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Em seguida, realizou-se a clonagem do fragmento correspondente à parte da região codificante do gene *MIPS* no vetor de clonagem pCR2.1 TOPO 3.9 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo o manual de instruções do fabricante, gerando o vetor pTOPOMIPSPe. O vetor pTOPOMIPSPe foi amplificado e purificado utilizando-se o kit Flexi prep (Pharmacia Biotech), e seqüenciado utilizando-se os primers universais M13 e T7 em seqüenciador automático (ABI Prism1 3700, Foster City, CA, USA). A seqüência obtida foi comparada

com aquelas depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (*GenBank*; www.ncbi.nih.nlm.gov) e do Institute for Genomic Research (*TIGR*; www.tigr.org).

3.2. *Rapid Amplification of cDNA Ends* (5' RACE e 3' RACE)

As ampliações das extremidades 5' e 3' do gene *MIPS* foram realizadas com o GeneRacer Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Quatro microgramas de RNA total foram tratados com uma unidade de *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) para retirada do grupamento fosfato da extremidade 5'. Em seguida, procedeu-se a eliminação do 5' *cap* e foram adicionados adaptadores nas duas extremidades contendo seqüências para *primers* (*nested primers*) específicos nestas regiões por ligação com a enzima T4-RNA-Ligase. Foi gerado o cDNA e a partir deste foram amplificadas ambas regiões utilizando-se a enzima SuperscriptIII (transcriptase reversa; DNA polimerase RNA dependente) (Invitrogen, Carlsbad, CA) nas condições descritas para a enzima com 1,5 minutos de alongação. Com a utilização do par de primers MIPSPeRACEF 5' GTGAACATCCTGACCACGTTG 3' e GeneRacer 3', complementares ao adaptador da região 3', gerou-se um fragmento de aproximadamente 0,4 kb na extremidade 3' e o par MIPSPeRACER 5' GAGGTGTACTIONCGTCCATAGC 3' (reverse) e GeneRacer 5' (forward), complementar ao adaptador da região 5', foi utilizado para gerar um fragmento de 1,5 kb na extremidade 5' (Figura 5). Ambos foram clonados no vetor pCR2.1 TOPO 3.9 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA) e sequenciados. As seqüências das extremidades 5' e 3' foram adicionadas à posição correta por análise de pareamento no programa *Blast 2 sequence* (Altschul *et al.*, 1990).

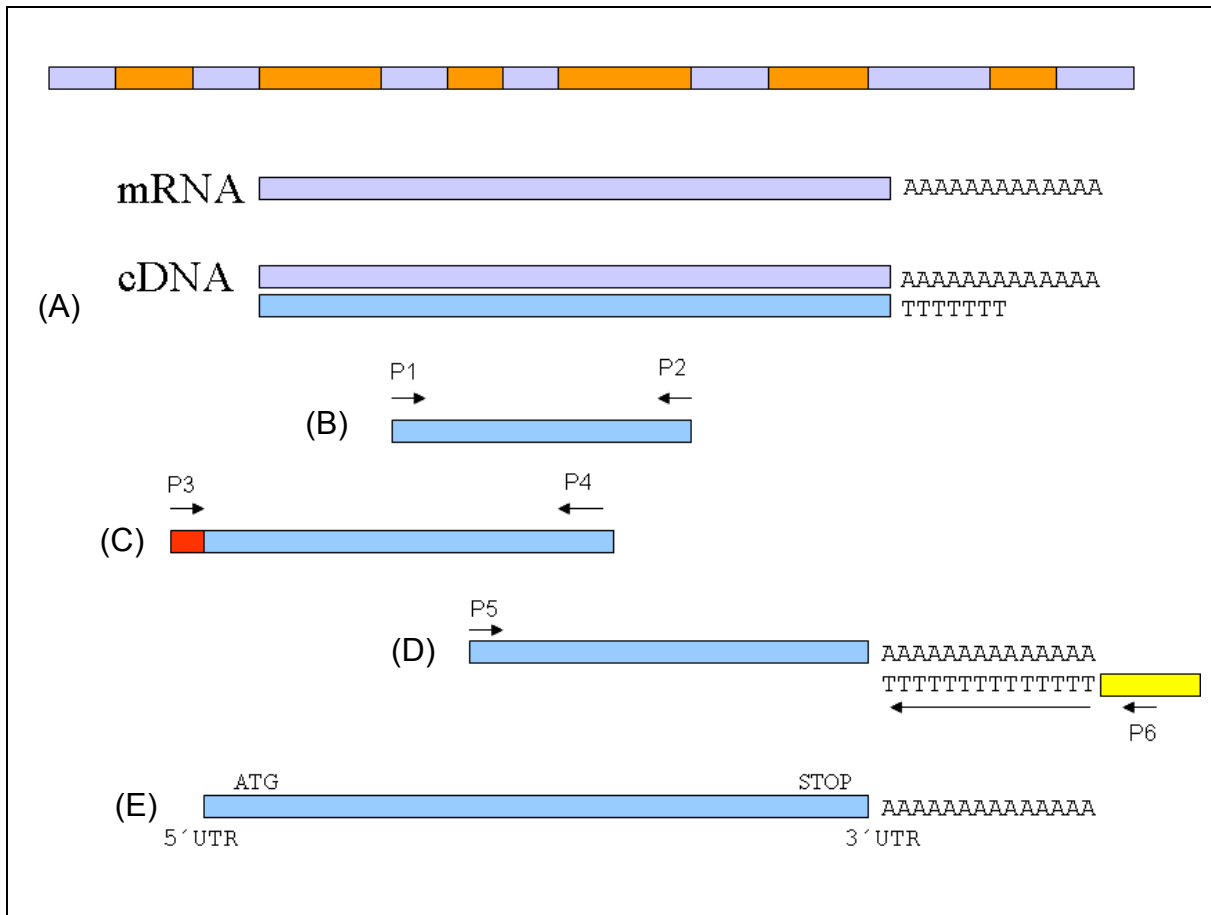


Figura 5. PCR 5' e 3' RACE do gene *PeMIPS*. **A.** O cDNA foi sintetizado a partir do mRNA por uma transcriptase reversa (RT-PCR) que utiliza como primer um oligodT. **B.** Cópias de um fragmento de 693 pb do cDNA do gene *PeMIPS* foram amplificadas por PCR utilizando como primers P1 (MIPSPeF) e P2 (MIPSPeR₂). **C.** A extremidade 5' do cDNA do gene *PeMIPS* foi amplificada com os primers P3 (GeneRacer 5') e P4 (MIPSPeRACER), produzindo um fragmento aproximado de 1,5 kb. **D.** A extremidade 3' foi amplificada com os primers P5 (MIPSPeRACEF) e P6 (GeneRacer 3'), produzindo um fragmento aproximado de 0,4 kb. **E.** Obtenção da seqüência completa do cDNA, após análise de pareamento.

3.3. Análise da expressão do gene *PeMIPS* por RT-PCR

Para a análise da expressão do gene *PeMIPS*, foi utilizado RNA total de semente em diferentes estágios de desenvolvimento, óvulo, grão-de-pólen, caule, folha, pétala e glândula foliar do maracujazeiro. Os RNA provenientes das diferentes amostras foram isolados com o kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, CA), e o cDNA do gene *MIPS* sintetizado a partir do RNA total pela utilização da enzima transcriptase reversa de acordo com o protocolo do kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em seguida realizou-se a PCR utilizando iniciadores específicos para o mRNA de interesse.

Para a PCR foi preparada uma reação com volume final de 25 μ L, contendo um volume de cDNA estabelecido de acordo com o controle interno da reação (óvulo 0,6 μ L; grão-de-pólen 4,5 μ L, caule 0,5 μ L; folha 0,9 μ L; pétala 0,7 μ L; glândula foliar 0,7 μ L; semente com três dias 5 μ L; nove 1 μ L; quinze 1,5 μ L; vinte e um 0,5 μ L e vinte e sete 0,5 μ L), 10 mM TRIS-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 30 mM de MgCl₂, 4 mM de cada dNTP, 1,5 U de Taq polimerase (InvitrogenTM) e 0,2 μ M do par de primer específico para o gene *MIPS* de maracujazeiro (MIPSPeF e MIPSPeR₂), o volume final foi ajustado com água. As condições de tempo e temperatura da PCR foram de 95 °C (5 min), para desnaturar, e 20 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) com um ciclo final de 7 min a 72 °C. O número de ciclos foi previamente determinado para que as análises de RT-PCR fossem semi-quantitativas. Após a PCR, realizou-se a eletroforese das amostras em gel de agarose 1%.

Como controle interno da RT-PCR semi-quantitativa foi utilizado um fragmento de aproximadamente 358 pb do gene constitutivo EF1 α (fator de alongamento celular) do maracujazeiro. Este fragmento foi amplificado a partir de cDNA sintetizado seguindo o protocolo do kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), com os primers EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3'). Os fragmentos do gene da EF1 α de *P. edulis* foram clonados e seqüenciados nesse trabalho e depositados no *GenBank* com os números de acesso DQ447160 e DQ447161 (Anexo 2). As condições de tempo e temperatura da PCR foram as mesmas da reação de amplificação do gene *MIPS*.

3.4. Análise da expressão do gene *PeMIPS* sob condições de estresse por frio e calor

Para a análise da expressão do gene *PeMIPS* sob condições de estresse por frio e calor, plantas após oito semanas de germinadas em sala de cultura com temperatura (26 ± 2 °C) e fotoperíodo (16 h de luz e 8 h de escuro) definido, foram colocadas em câmara de crescimento sob condições variadas de tempo (8 e 16 h), temperatura (5, 12, 27 e 37 °C) e luminosidade (claro e escuro), combinadas entre si. Os RNAs de folhas das plantas tratadas foram extraídos e isolados com o kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, CA), e o cDNA do gene *MIPS* sintetizado a partir do RNA total pela utilização da enzima transcriptase reversa de acordo com o protocolo do kit SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em seguida, realizou-se a PCR utilizando iniciadores específicos para o mRNA de interesse.

Para a PCR foi preparada uma reação com volume final de 25 µL, contendo cDNA num volume estabelecido de acordo com o controle interno da reação, 10 mM TRIS-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 30 mM de MgCl₂, 4 mM de cada dNTP, 1,5 U de Taq polimerase (InvitrogenTM) e 0,2 µM do par de primer específico para o gene *MIPS* de maracujazeiro (MIPSPeF e MIPSPeR₂), o volume final foi ajustado com água. As condições de tempo e temperatura da PCR foram de 95 °C (5 min), para desnaturar, e 20 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) com um ciclo final de 7 min a 72 °C. Como controle interno da RT-PCR semi-quantitativa utilizou-se o gene *EF1α* (fator de alongamento celular) do maracujazeiro seguindo as mesmas condições do gene *MIPS*.

3.5. Análise de Southern blot para verificação do número de cópias do gene *MIPS* no genoma de cinco espécies diferentes de *Passiflora*

Para a análise de Southern blot, primeiramente realizou-se a extração de DNA genômico a partir de 3 g de folha fresca de cinco espécies diferentes de maracujazeiro (*P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* e *P. coccinea*). As folhas foram colocadas no almofariz e adicionado nitrogênio líquido para congelamento instantâneo. As folhas congeladas foram trituradas com a ajuda de um pistilo até a obtenção de um pó fino. O pó foi rapidamente transferido para um tubo de polipropileno contendo 15 mL de tampão

CTAB (Anexo 1) pré-aquecido a 65 °C e incubado nessa temperatura entre 30 minutos a uma hora, agitando a cada 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) ao tubo. Ao final da incubação a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 5.000g e a fase aquosa (fase superior) transferida para novo tubo. A extração foi repetida duas vezes com clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1) (Romano, 1998).

Para a precipitação do DNA no extrato adicionou-se 0,6 volume de isopropanol gelado ou 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 10.000g, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com aproximadamente 5 mL de etanol 70 %. Por fim, o precipitado foi secado e dissolvido em 200 a 500 µL de TE (Anexo 1), e incubado a 4 °C por meia hora ou mais.

Os DNA genômicos (15 µg) extraído das folhas de *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* e *P. coccinea* foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição *EcoRI*, *XhoI* e *HindIII* (150 U). Após a digestão as amostras foram aplicadas no gel de agarose 1%, e a eletroforese realizada com aproximadamente 0,5 a 1 V/cm. Após a eletroforese as amostras foram transferidas do gel para a membrana de nylon HyBond N+ (Romano, 1998). A hibridização foi realizada usando um fragmento de 693 pb do gene *MIPS* de *Passiflora* como sonda. As sondas foram marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (3000 Ci/mol) usando-se primers aleatórios do DNA Labeling Kit (Pharmacia Biotech).

3.6. Filogenia do gene *MIPS*

A relação entre o gene *PeMIPS* e os genes *MIPS1* de outras 31 espécies de plantas foi determinada pelo alinhamento com as seqüências disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nih.nlm.gov) e do *TIGR* (www.tigr.org). Somente as seqüências codificantes completas foram usadas para a análise. O alinhamento foi executado usando o algoritmo do CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). As análises filogenéticas foram realizadas usando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). As freqüências médias de cada nucleotídeo eram similares (T = 23 %, C = 23 %, A = 27 %, G = 26 %), mas uma relação elevada de transição e transversão foram observadas. Assim, para considerar esta probabilidade desigual de tipos de substituição, o princípio Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) foi usado e as distâncias entre cada par das seqüências foram computadas. As árvores

filogenéticas foram construídas usando o algoritmo Neighbor Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com opção de eliminação completa. Os valores de bootstrap foram computados usando 10.000 repetições para avaliar a robustez dos agrupamentos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Clonagem e sequenciamento do gene *MIPS* de maracujazeiro (*Passiflora edulis*)

Para a clonagem do gene *MIPS*, seqüências de cDNA de diferentes espécies de plantas presentes no *Genbank* foram confrontadas no programa DNA MAN *version* 4.0 (Lynnon Biosoft). As regiões conservadas foram identificadas para a construção dos primers degenerados MIPSPeF e MIPSPeR. A PCR realizada com os primers mencionados amplificou um fragmento de DNA com 693 pb, usando como fita molde cDNA sintetizado de mRNA extraído de sementes de maracujá em diferentes estágios de desenvolvimento. O fragmento de DNA gerado foi seqüenciado e novamente confrontado, no programa *Blast 2 sequence*, com seqüências de cDNA do gene *MIPS* presentes no *Genbank*. Este fragmento foi clonado no vetor pCR2.1 TOPO 3.9 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), gerando o vetor pTOPOMIPSPe.

Após a amplificação e clonagem de um fragmento do gene *PeMIPS*, prosseguiu-se com a amplificação completa da seqüência do cDNA deste gene, utilizando como ferramenta o kit 5' e 3' RACE. Para o RACE foram sintetizados dois novos primers, MIPSPeRACEF e MIPSPeRACER, que juntamente com os primers do kit RACE (GeneRace 3' e GeneRace 5') foram utilizados para amplificação das extremidades do cDNA do gene *PeMIPS*. A amplificação da extremidade 5' foi realizada com a utilização dos primers GeneRace 5' e MIPSPeRACER, gerando um fragmento de 1,5 kb. E a amplificação da extremidade 3' foi realizada com os primers GeneRace 3' e MIPSPeRACEF, gerando um fragmento de 0,4 kb. Ambos os fragmentos foram clonados no vetor pCR2.1 TOPO 3.9 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA) e sequenciados. Ao final, a seqüência completa do gene *PeMIPS* foi obtida, mostrando conter 1.954 pb (Figura 6). A seqüência obtida foi comparada com outras 31 seqüências completas depositadas no *GenBank* e *TIGR*, e apresentou um alto grau de similaridade, de 74% a 86% (Tabela 2).

Uma análise realizada no programa TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) mostrou que a enzima *PeMIPS* não possui qualquer sinal de endereçamento para compartimentos

como apoplasto, retículo endoplasmático ou plastídios. Isso demonstra que possivelmente se trata de uma proteína citoplasmática.

Com a obtenção da seqüência codificante completa do gene estudado no presente trabalho, análises *in silico* foram realizadas. Em relação à tradução da proteína, dos 1.954 pb do cDNA amplificado 1.533 pb encontravam-se em fase aberta de leitura. A análise de predição da proteína putativa apresentou 510 aminoácidos com identidade aproximada de 85% a 93% quando comparada aos aminoácidos das proteínas MIPS de outras espécies de plantas com seqüências depositadas no *Genbank* e *TIGR*. Chun *et al.* (2003) ao isolar e caracterizar o gene *MIPS* de *Sesamum indicum*, verificaram após análises de predição da proteína, que a mesma possuía 510 aminoácidos, com massa molecular total de aproximadamente 56 kD. Estes valores de massa molecular foram compatíveis aos valores calculados de outras proteínas MIPS (Majumder *et al.* 1997). Em soja (*G. max*), o gene *MIPS1* foi isolado e caracterizado, e observou-se que dos 1.791 pb do cDNA amplificado 1.533 pb encontravam-se em fase aberta de leitura; por predição sua proteína putativa também possuía 510 aminoácidos, com massa molecular de 56,5 kD (Hegeman *et al.*, 2001).

Ao analisarmos a região 3' não traduzida (3' UTR), constatou-se que esta possui 268 pb com duas seqüências putativas de sinais de poliadenilação (ATTAA e AATAA), a 260 e 251 pb da cauda poli(A). Sinais de poliadenilação na região 3' UTR, podem ser encontrados em diferentes cDNA de muitas espécies de plantas, animais e até leveduras. Em *S. indicum* dois sinais de poliadenilação foram encontrados a 39 e 24 pb, anteriores à cauda poli (A) no cDNA do gene *MIPS* (Chun *et al.*, 2003).

Tabela 2. Alinhamento do gene *MIPS* de *P. edulis* com seqüências codificantes completas do gene *MIPS* de outras espécies.

Fonte/ N° de acesso	Tamanho da Seqüência Codificante (pb)	Similaridade (%)
<i>Citrus paradise</i> / (Z32632) ^a	1524	83
<i>Arabidopsis thaliana</i> / (U04876) ^b	1533	79
<i>Phaseolus vulgaris</i> / (AM048843) ^b	1533	81
<i>Oryza sativa</i> / (AB012107) ^b	1533	78
<i>Spirodela polyrrhiza</i> / (Z11693) ^b	1533	76
<i>Zea mays</i> / (AF56326) ^b	1533	78
<i>Porteresia coarctata</i> / (AF412340) ^b	1539	75
<i>Sesamum indicum</i> / (AF284065) ^b	1533	82
<i>Xerophyta viscosa</i> / (AY323824) ^b	1533	78
<i>Avena sativa</i> / (AB059557) ^b	1533	77
<i>Glycine Max</i> / (AY382834) ^b	1533	83
<i>Avicennia marina</i> / (AY028259) ^b	1530	80
<i>Nicotiana tabacum</i> / (AB059557) ^b	1533	81
<i>Brassica napus</i> / (U66307) ^b	1533	78
<i>Hordeum vulgare</i> / (AF056325) ^b	1533	78
<i>Triticum aestivum</i> / (AF120148) ^b	1533	79
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> / (U32511) ^b	1539	81
<i>Gorssypium hirsutum</i> / (TC27410) ^a	1533	83
<i>Aquilegia formosa x pubescens</i> / (TC14836) ^a	1533	80
<i>Vitis vinifera</i> / (TC45187) ^a	1533	84
<i>Lotus japonicus</i> / (TC8275) ^a	1533	81
<i>Medicago trunculata</i> / (TC93972) ^a	1533	80
<i>Allium cepa</i> / (TC248) ^a	1533	78
<i>Pinus sp.</i> / (TC64990) ^a	1533	74
<i>Populus sp.</i> / (TC19238) ^a	1533	86
<i>Solanum tuberosum</i> / (TC112573) ^a	1533	80
<i>Saccharum officinarum</i> / (TC65413) ^a	1533	78
<i>Lycopersicon esculentum</i> / (TC154132) ^a	1533	81
<i>Actinidia arguta</i> / (AY005128) ^b	1095	82
<i>Tripolium pratense</i> / (AB236831) ^a	1536	80
<i>Sueda maritima</i> / (AF433879) ^b	1533	77

^a Acessos encontrados no *TIGR*

^b Acessos encontrados no *Genbank*

134 pb untranslated 5' sequence (5'UTR)

AATAACACAACCACACAAGGCTTCAGAGAGTTGCGAAAGCAGATTAGCTCCTCTCTTTGTTGGCTTTGGGCCTTTTGGGTTCTCTTCTCG
TTTTAATCATCCACAGTTCTCTCCCTTCTGCTAACAAA

1 **ATC** TTCATCGACAGCTTTAAGGTTGAGAGTCCCTAACGTTAAGTACACAGAGGATGAGATT
1 M F I D T F K V E S P N V K Y T E D E I
61 CACTCGGTGTACAACATGAGACCACTGAGCTTGTTTCATGAGAACAGGAATGGTACCTAT
21 H S V Y N Y E T T E L V H E N R N G T Y
121 CAGTGGACTGTCAAACCCAAAAGTGTCCAATACGAATCAAGACCAGCATTTCATGTCCCC
41 Q W T V K P K T V Q Y E F K T S I H V P
181 AAACCTCGGGGTTATGCTCGTGGGGTGGGAGGAAACAATGGATCGTCTCTCACCGCGGT
61 K L G V M L V G W G G N N G S S L T G G
241 ATCATAGCCAACCCGAGAGGGAATCTCCTGGGCGACCAAGGACAAGGTGCAGCAAGCCAAC
81 I I A N R E G I S W A T K D K V Q Q A N
301 TACTTTGGCTCGCTAACCCAGGCTTCAACTATCCGAGTTGGGTCTTTCAATGGAGAGGAG
101 Y F G S L T Q A S T I R V G S F N G E E
361 ATTTATGCTCCATTCAAAGCCTGCTCCCCATGGTGAGCCCCGATGACGTTGTTATTGGA
121 I Y A P F K S L L P M V S P D D V V I G
421 GGATGGGACATAAGTGACATGAAGTGGCTGACGCCATGGCCAGGGCAAAAAGTCTTCGAC
141 G W D I S D M N L A D A M A R A K V F D
481 ATTGATCTGCAGAAACAACCTCAGGCCCTACATGGAATCCATGATCCCACTACCCGGAATA
161 I D L Q K Q L R P Y M E S M I P L P G I
541 TATGACCCGTGATTTTCATTGCTGCCAACCAAGGGTCACGTGCCAACAAATGTGATCACAGGC
181 Y D P D F I A A N Q G S R A N N V I T G
601 TCCAAGAAAGAACAACCTCAGCAAGTCATCAAGGACATCAGGGAGTTTAAAGGAAAAAAC
201 S K K E Q L Q Q V I K D I R E F K E K N
661 AAGGTAGACAAGGTGGTTGTGCTGTGGACTGCCAACACAGAGAGGTACAGCAATGTGCTC
221 K V D K V V V L W T A N T E R Y S N V V
721 GTGGGGCTAAATGACACCATGGAGAACCTCATGGCTGCACTGGAGAGGAATGAATCAGAG
241 V G L N D T M E N L M A A L E R N E S E
781 ATATCTCCATCAACTTTGTATGCCTTGGCCTGTGTGTTGGAAAATGTTCCTTTTGTGAAC
261 I S P S T L Y A L A C V L E N V P F V N
841 GGAAGCCCCCAGAACACCTTTGTTCCAGGGTTGATTGATCTGGCTATCAAGAGGAACAGT
281 G S P Q N T F V P G L I D L A I K R N S
901 TTGATTGGTGGGGATGACTTTAAGAGTGGTCAGACCAAAATGAAGTCCGTCCTGGTGGAT
301 L I G G D D F K S G Q T K M K S V L V D
961 TTCCTTGTGGTGTGGGATCAAGCCAACGTCGATAGTGAGCTACAACCATCTGGGCAAT
321 F L V G A G I K P T S I V S Y N H L G N
1021 AATGACGGCATGAATCTGTGAGCCGCGCAAACCTTCCGTTCCAAGGAGATCTCCAAGAGC
341 N D G M N L S A P Q T F R S K E I S K S
1081 AATGTTGTAGACGACATGGTCTCCAGCAATGGAATACTCTATGAACCTGGTGAACATCCT
361 N V V D D M V S S N G I L Y E P G E H P
1141 GACCACGTTGTGGTCATTAAGTATGTGCCATACGTGGGGGATAGCAAGAGGGGTATGGAC
381 D H V V V I K Y V P Y V G D S K R A M D
1201 GAGTACACCTCGGAGATATTCATGGGTGAAAGAGCACTATAGTGCTACACAATACGTGT
401 E Y T S E I F M G G K S T I V L H N T C
1261 GAAGACTCCCTGCTGGCTGCACCCATCATCCTGGACTTGGTTCCTCTCGCTGAGCTCAGT
421 E D S L L A A P I I L D L V L L A E L S
1321 ACCAGGATCCAGCTGAAAGCCGAGGGAGGGAAAGTTTCATTCTTTCCACCCGGTGGCT
441 T R I Q L K A E G E G K F H S F H P V A
1381 ACCATCCTCAGTTACCTCACAAAGGCTCCTCTGGTTCACCCAGGGACGCGGTAGTGAAT
461 T I L S Y L T K A P L V P P G T P V V N
1441 GCACCTTCAAAGCAGCTGCAATGCTGGAGAACATATTGAGAGCTTGTATTGGATTGGCT
481 A L S K Q R A M L E N I L R A C I G L A
1501 CCAGAGAATAACATGATTTTGAATACAAG **TGA** **AGTATTAAGAG** **AATAA** CAAGGATGAT
501 P E N N M I L E Y K *
1561 GGTGGGGAGCAGACCAGTTCATAAGCTGTAGAACAATGAATGTTCCCTTTTCTCTTTCC
AATCCAGTGTATTATGATGTCTGTCTGATATTTGCCATTACTAGGCATATTAGTTCTCTATGTTCTGGCTTTTAGCGTTGTGAGGCTTTTA
GCCCTCTGCTCTGGCATTTTCAATGACCGAGTACTCTTTTCATGTGGAAATAGTTTCATAAATAAAAAGTCTATAAATTCTGTTCAA
AAAAA

268 pb untranslated 3' sequence (3'UTR)

Figura 6. Sequência completa do cDNA do gene *PeMIPS* e da proteína deduzida *in silico*. A seqüência 5' UTR e 3' UTR possuem 134 e 268 pb, respectivamente. O realce em vermelho indica os codons de iniciação e terminação. O realce em amarelo os sinais de poliadenilação. E as letras em azul a cauda poli (A).

4.2. Análise da proteína PeMIPS

A dedução da seqüência de aminoácidos da proteína PeMIPS foi utilizada para comparar com a composição de aminoácidos de outras proteínas MIPS de plantas com acessos no *Genbank* e *TIGR*. A análise revelou que a proteína PeMIPS contém quatro motivos de polipeptídios altamente conservados que podem ser encontrados em outras espécies de plantas: GWGGNNG (domínio 1), VLWTANTERY (domínio 2), NGSPQNTFVPGL (domínio 3) e SYNHLGNNDG (domínio 4) (Figura 7). Estes motivos também foram encontrados em proteínas MIPS de animais e microrganismos, como *Anopheles gambiae* (XM320685), *Drosophila melanogaster* (AF071103), *Homo sapiens*, (AF207640), *Xenopus laevis* (BC077437), *Aspergillus fumigatus* (XM744144), *Pichia pastoris* (AF078915), *Entamoeba histolytica* (Y11270) e *Leishmania amazonensis* (U91965). Os motivos apresentados são essenciais para a funcionalidade da enzima MIPS, por serem domínios relacionados com ligações do co-fator NAD⁺ e de reações de catálise da enzima (Majumder *et al.*, 1997; Bachhawat & Mande, 1999). Esta constatação indica que o gene e a proteína praticamente não sofreram grandes mutações ao longo da evolução das espécies, e conseqüentemente, a manutenção da funcionalidade tornou-se indispensável para o metabolismo de diversos organismos.

```
MFIDTFKVESPNVKYTEDEIHSVYNYETTELVHENRNGTYQWTVKPKTVQYEFKTSIHVPKLGVMLVGWGGNN
GSSLTGGIIANREGISWATKDKVQQANYFGSLTQASTIRVGSFNDEEIIYAPFKSLLPMVSPDDVVIGGWDISD
MNLADAMARAKVFDIDLQKQLRPYMESMIPLPGIYDPDFIAANQGSRRANNVITGSKKEQLQQVIKDIREFKEK
NKVDKVVVLWTANTERYSNVVVGLNDTMENLMAALERNESEISPSTLYALACVLENVPFVNGSPQNTFVPGLII
DLAIKRNSLIGGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNLSAPQTFRSKEISKSNVDD
MVSSNGILYEPGEHPDHVVVIKYVPYVGDSKRAMDEYTSEIFMGKSTIVLHNTCEDSLLAAPIIIDLVLLAE
LSTRIQLKAEGEGKFHFSFHPVATILSYLTKAPLVPPGTPVNVNALSQRAMLENILRACIGLAPENNMILEYK*
```

Figura 7. Predição *in silico* da seqüência da proteína PeMIPS. O realce em amarelo indica os domínios catalíticos conservados da proteína.

4.3. Análise da expressão do gene *PeMIPS*

Na análise de expressão do gene *MIPS* de *P.edulis* utilizou-se RNA total de diferentes partes da planta: óvulo (Ov), grão-de-pólen (PG), caule (St), folha (L), pétala (Pt) e glândula foliar (LG) (Figura 8A), e também de sementes em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 8B). Para esta análise, realizou-se uma RT-PCR semi-quantitativa que tinha como gene controle o fator de alongamento celular de *P. edulis* (*PeEfa*). Todos os parâmetros da reação foram estabelecidos a partir do gene controle, que foi clonado e seqüenciado pela primeira vez neste trabalho. Somente após a padronização da RT-PCR realizou-se uma reação definitiva com os dois genes.

A expressão do gene *PeMIPS* nos órgãos do maracujazeiro foi observada unicamente em óvulo, grão-de-pólen e folha; nenhum sinal de transcritos pôde ser observado em caule, pétalas e glândula foliar (Figura 8A). Na semente, foi detectada expressão em todos os estágios de desenvolvimento analisados. Contudo, observou-se o nível máximo de expressão, com presença de um pico marcante, no nono dia após a polinização (Figura 8B). Apesar da baixa frequência de trabalhos caracterizando a expressão do gene *MIPS* em plantas. Estudos com *S. indicum*, também revelaram a expressão do gene *MIPS* em folha, caule e raiz; embora na folha os níveis de transcritos mostraram-se maior do que nos demais órgãos investigados (Chun *et al.*, 2003). Em soja (*G. max*), foram detectados transcritos em cotilédones germinados, raízes e folhas jovens, flores, embriões somáticos no estágio globular, e até em sementes em diferentes estágios de desenvolvimento. Especialmente nas sementes de soja, a expressão do gene *MIPS* ocorreu nos primeiros estágios de desenvolvimento, com sementes de até 10 mm de comprimento (Hegeman *et al.*, 2001). Diferentemente dos resultados de expressão encontrados em soja, a expressão do gene *PeMIPS* nas sementes de *P. edulis* ocorreu durante todos os estágios analisados, observando-se apenas um pico no nono dia após a polinização.

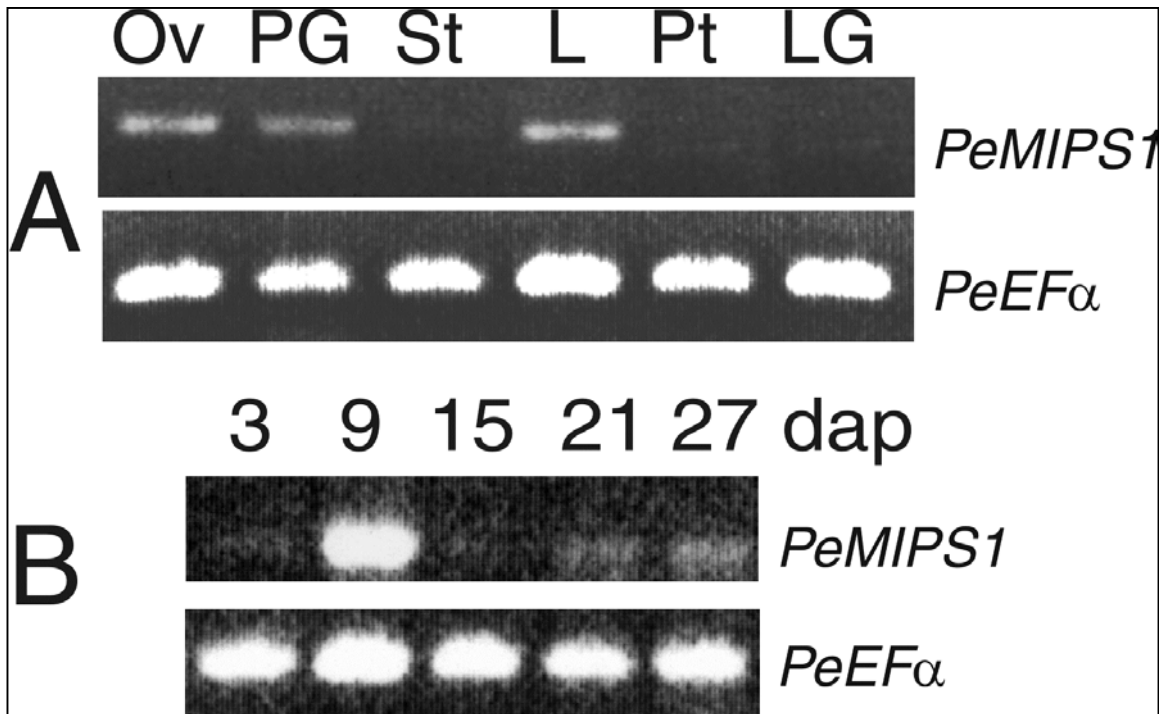


Figura 8. RT-PCR do gene *PeMIPS* em distintos órgãos e durante o desenvolvimento da semente. **A.** Análise da expressão do gene *PeMIPS* em diferentes órgãos do maracujazeiro: óvulo (Ov), grão-de-pólen (PG), caule (St), folha (L), pétala (Pt) e glândula foliar (LG). **B.** Análise da expressão na semente em diferentes estágios de desenvolvimento: três, nove, quinze, vinte e um, e vinte e sete dias após a polinização. Todos os parâmetros da reação foram estabelecidos a partir do gene *PeEFα* (Fator de alongamento celular de *P. edulis*).

4. 4. Análise da expressão do gene *PeMIPS* sob condições de estresse por frio e calor

O efeito da temperatura e da luz nos níveis de transcrição do gene *PeMIPS* endógeno foi estudado em plantas de maracujazeiro (*P. edulis*) com oito semanas após a germinação. Os resultados revelaram que em condições de frio (5 °C e 12 °C), na ausência de luz, o gene *PeMIPS* teve superexpressão nas primeiras 8 horas com um acentuado decréscimo a 5 °C após 16 horas (Figura 9A). Enquanto na presença de luz, os padrões de expressão foram bastante diferentes dos tratamentos no escuro, apresentando os níveis de expressão semelhantes com 8 e 16 horas a 5 °C, e um pico a 12 °C após 16 horas (Figura 9B). Já em altas temperaturas (27 °C e 37 °C), no escuro, foi observado um discreto aumento na expressão após 16 horas (Figura 9A). E na presença de luz, um pico de expressão a 27 °C com 16 horas. Excepcionalmente, a 37 °C os níveis de expressão foram quase indetectáveis em ambos os tempos (Figura 9B). O presente resultado corrobora com a hipótese da influência da luminosidade e temperatura sob a regulação do gene *MIPS* das espécies estudadas.

Em batata (*Solanum tuberosum*), foi observado que a luz induz nas folhas um aumento drástico no nível de expressão do gene *MIPS* (Keller *et al.*, 1998). Estes fatos reforçam a hipótese da influência da luz sob a expressão e atividade da proteína MIPS. RayChaudhury *et al.*, (1997) estudando a proteína MIPS de cloroplasto de algas e plantas superiores, observaram um aumento da atividade desta proteína sob condições de luz. Entretanto, mecanismos moleculares de expressão, regulação e até atividade da MIPS não são somente influenciados pela luz. Muitos estudos têm mostrado que este gene pode ser regulado em várias ocasiões. Surpreendentemente, em *Citrus sinensis* submetido a herbivoria e a danos mecânicos, viu-se que a transcrição do gene *MIPS* foi induzida com um pico após 48 horas e uma gradual diminuição após 96 horas (Mozoruk *et al.*, 2006). Estes resultados corroboram com o fato de que rápidas mudanças de inositol-fosfatos em diferentes sistemas de plantas têm sido observadas por diferentes estímulos, incluindo choque osmótico e ao frio, luz e elicitores bióticos (Perera *et al.*, 2006). Muitos dos genes regulados por estes fatores também podem ser induzidos pelo ácido abscísico (ABA) (Ishitani *et al.*, 1997; Seki *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Em arroz, plantas submetidas a tratamentos com ABA induziram o acúmulo de transcritos do gene *MIPS 2* a 4 horas após o

início do tratamento (Yoshida *et al.*, 2002). Sabe-se que o ABA tem um papel fundamental na aclimação das plantas ao frio (Li *et al.*, 2006). Muitas plantas de regiões temperadas têm a capacidade de se aclimatar ao frio aumentando sua tolerância quando expostas as baixas temperaturas (Chinnusamy *et al.*, 2006). Entretanto, o maracujazeiro, assim como outras espécies originadas de regiões tropicais e subtropicais, é sensível ao frio. Nestas espécies as baixas temperaturas podem levar ao estresse por desidratação, que impede a absorção de água pelas raízes e o transporte para as folhas (Levitt, 1980).

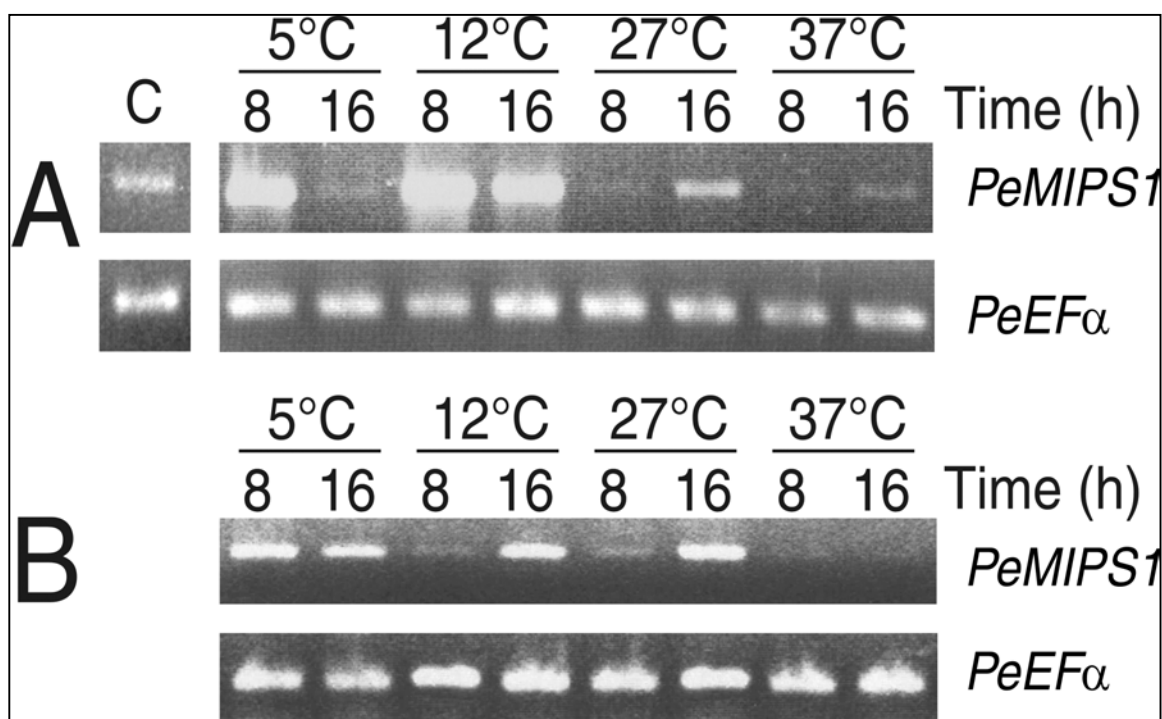


Figura 9. RT-PCR do gene *PeMIPS* em plantas oito semanas após a germinação, submetidas a condições de frio e calor. **A.** Na ausência de luz. **B.** Na presença de luz. Todos os parâmetros da reação foram estabelecidos a partir do gene *PeEFα* (Fator de alongamento celular de *P. edulis*).

4.5. Análise de Southern blot para verificação do número de cópias do gene *MIPS* no genoma de cinco espécies diferentes de maracujazeiro

O Southern blot foi realizado com a finalidade de estimar o número de cópias do gene *MIPS* no genoma de cinco espécies diferentes de maracujazeiro (*P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* e *P. coccinea*). Neste experimento foi usado como sonda um fragmento de 693 pb do cDNA do gene *PeMIPS* que se encontrava clonado no vetor pTOPOPeMIPS. Durante o preparo da sonda, o fragmento foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, liberando-o do vetor de clonagem. Ainda com relação à sonda, realizou-se uma análise de possíveis sítios de restrições no interior da seqüência com o programa DNA MAN version 4.0 (Lynnon Biosoft), para garantir que durante a reação de restrição não fosse formado fragmentos menores da sonda, podendo alterar desta forma o resultado. Entretanto, Chun *et al.* (2003) ao tentarem estimar o número de cópias do gene *MIPS* em *S. indicum*, utilizaram como sonda a seqüência completa de cDNA do gene estudado, que era de 1.845 pb. Hegeman *et al.* (2001) também utilizaram como sonda a seqüência completa do cDNA do gene *MIPS* de soja (*G. max*), que era de 1.791 pb. Embora em muitos trabalhos utilizem-se seqüências completas de cDNA para estimar o número de cópias do gene *MIPS* no genoma de muitos organismos, em *Mesembryanthemum crystallinum* e *A. thaliana*, foi utilizado um fragmento de cDNA de aproximadamente 300 pb como sonda (Ishitani *et al.*, 1996). Indicando que o tamanho da sonda não é fator limitante neste tipo de análise.

Com relação à hibridização, as amostras de DNA genômico de folha das cinco espécies de maracujazeiro foram digeridas separadamente com três enzimas de restrição (*EcoRI*, *XhoI* e *Hind III*), produzindo quinze amostras diferentes do DNA. A membrana contendo as quinze amostras de DNA foi lavada em baixa e alta estringência (Figura 10). Em baixa estringência, um grande número de bandas fortes foram visíveis na membrana em todas as amostras, que desapareceram quando a mesma foi lavada em alta estringência. Digestões com *HindIII* em condições de alta estringência apresentaram diferentes padrões de hibridização entre as cinco amostras de maracujazeiro, revelando um polimorfismo no sítio de restrição desta enzima. Uma única banda de hibridização foi verificada nas amostras digeridas com *XhoI*. O resultado obtido em condições de baixa estringência indica

que poderão existir diversas seqüências do gene *MIPS* no DNA genômico das espécies analisadas. Entretanto, uma única banda de aproximadamente 3 kb que foi detectada sob condições de alta estringência (digestão com *Xho*I) indica que o genoma de *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* e *P. coccínea* possui uma cópia do gene *PeMIPS* que foi clonado no presente trabalho (Figura 10). Pesquisas têm mostrado que este gene é membro de uma família multigênica em algumas espécies de plantas. Por exemplo, em *A. thaliana* o gene *MIPS* (*Atmips*) consiste de *Atmips-1* (Johnson, 1994), *Atmips-2* (Johnson & Burk, 1995) e *Atmips-3* (Ishitani *et al.*, 1996). Em soja (*G. max*) e milho (*Z. mays*), estima-se conter na família do gene *MIPS* no mínimo quatro a sete membros, respectivamente (Larson & Raboy, 1999). Contraditoriamente, o maracujazeiro parece possuir uma única cópia deste gene no seu genoma. Desta forma, o presente resultado mostra-se bastante significativo, pois se trata do primeiro estudo do gene *MIPS* com planta frutífera, além de ser a primeira espécie de planta estudada que possui uma única cópia deste gene em seu genoma. Uma análise ainda necessita ser realizada no sentido de identificar outros genes similares presentes no genoma de *P. edulis*.

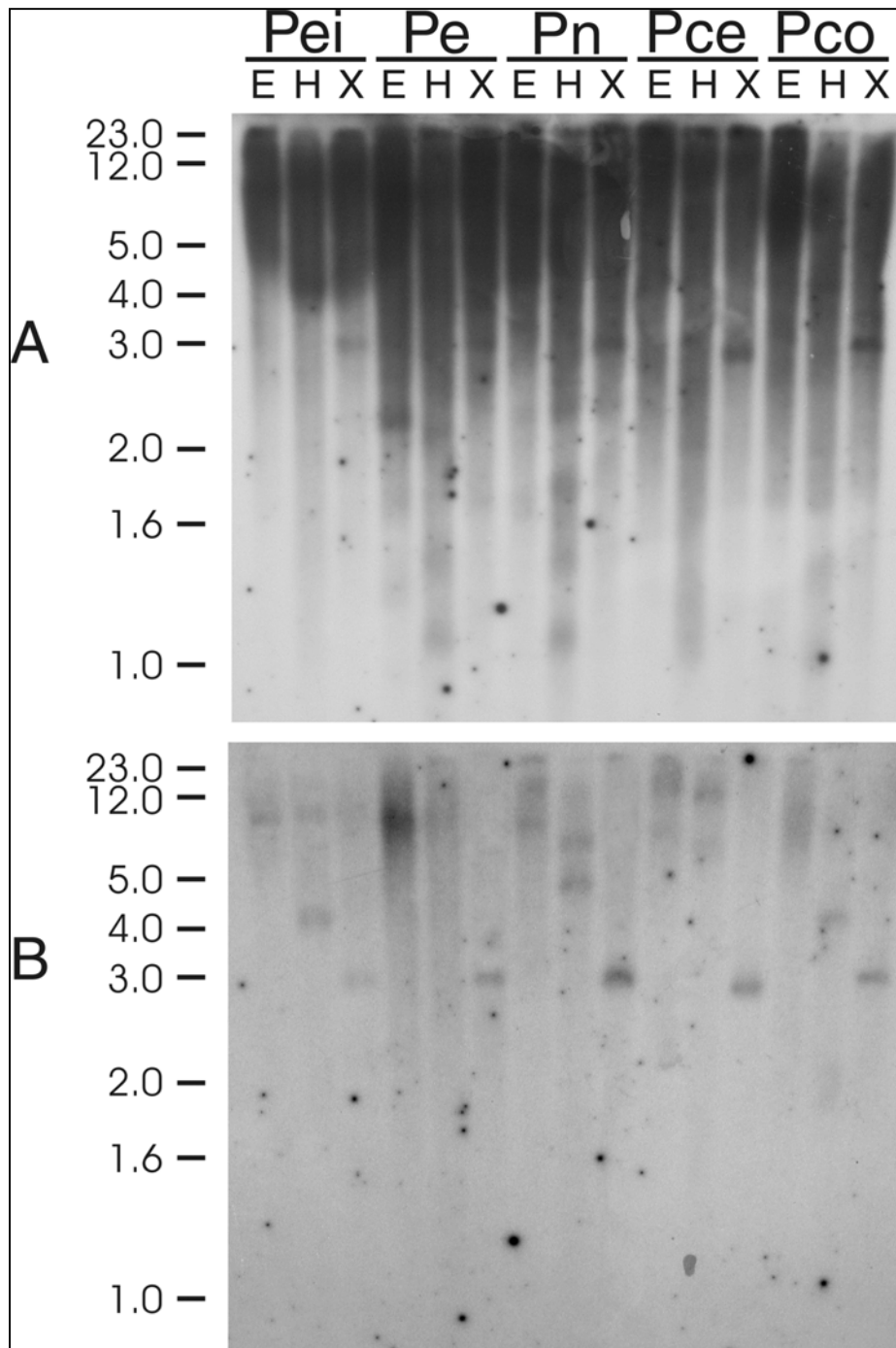


Figura 10. Análise de Southern blot no genoma do maracujazeiro. Os DNAs extraídos de folhas de *P. edulis* (Pe), *P. eichleriana* (Pei), *P. caerulea* (Pce), *P. nítida* (Pn) e *P. coccínea* (Pco) foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* (E), *HindIII* (H) e *XhoI* (X). Um fragmento de 693 pb do cDNA do gene *PeMIPS* foi utilizado como sonda no blot sob baixa e alta estringências. O marcador de peso molecular (em kb) está indicado no lado esquerdo.

4.6. Análise filogenética do gene *PeMIPS*

A análise filogenética do gene *PeMIPS* reuniu todos os acessos de plantas do *Genebank* e *TIGR* que continham as seqüências codificante completa de cDNA, separando os diferentes genes *MIPS* em grupos taxonômicos bastante distintos (Figura 11). Após a análise, percebeu-se que a árvore filogenética havia agrupado três principais ramos taxonômicos. No primeiro, reuniram-se todas as monocotiledôneas, com exceção do *Triticum aestivum*, que surpreendentemente ficou ligado às dicotiledôneas, e a *Spirodela polyrrhiza*, que é uma dicotiledônea e ficou próxima às monocotiledôneas. No segundo, as gimnospermas, com o gene *MIPS* de *Pinus* sp. como único representante. E no terceiro, o grupo da árvore com maior número de representantes, as dicotiledôneas, dividida em seis ordens principais: Brassicales, Caryophyllales, Solanales, Lamiales, Malpighiales e Fabales. Além de grupos com representantes únicos, como *Vitis vinifera*, *Allium cepa*, *Actinidia arguta*, *Aquilegia formosa x pubescens*, *Citrus paradise* e *Gorssypium hirsutum* (Figura 11). Com relação ao gene *MIPS* de *P. edulis*, este ficou agrupado na mesma raiz do gene *MIPS* de *Populus* sp. Sendo ambas as espécies pertencetes à ordem Malpighiales. Muitos outros estudos envolvendo análises filogenéticas do gene *MIPS* corroboram com o resultado apresentado no presente trabalho. Styer (2000) estudando a expressão do gene *MIPS* em plantas, Chun *et al.* (2003) estudando o gene *MIPS* de *S. indicum* e Chatterjee *et al.* (2004) com o gene *MIPS* de *Synechocystis* sp, encontraram padrões semelhantes em suas árvores filogenéticas.

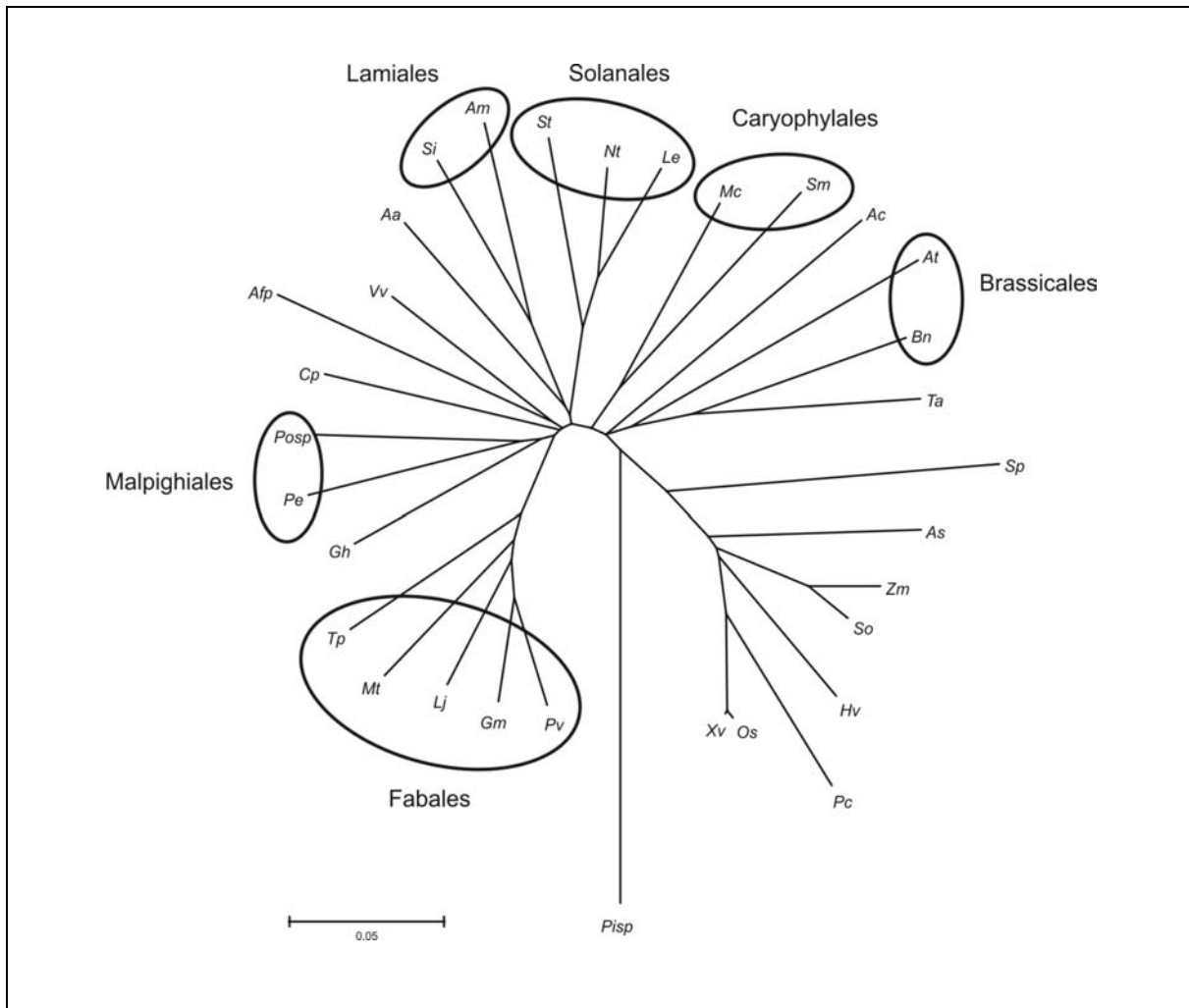


Figura 11. Análise filogenética das seqüências de cDNA do gene *MIPS*. As seqüências foram retiradas dos bancos de acesso, *Genebank* e *TIGR* e os agrupamentos foram realizados usando 10.000 repetições (máxima parcimônia). São acessos da árvore: Pisp = *Pinus sp.*, Xv = *Xerophyta viscosa*, Os = *Oryza sativa*, Pc = *Porteresia coarctata*, Hv = *Hordeum vulgare*, So = *Saccharum officinarum*, Zm = *Zea mays*, As = *Avena sativa*, Sp = *Spirodela polyrrhiza*, Ta = *Triticum aestivum*, Bn = *Brassica napus*, At = *Arabidopsis thaliana*, Ac = *Allium cepa*, Sm = *Sueda maritima*, Mc = *Mesembryanthemum crystallinum*, Le = *Lycopersicon esculentum*, Nt = *Nicotiana tabacum*, St = *Solanum tuberosum*, Am = *Avicennia marina*, Si = *Sesamum indicum*, Aa = *Actinidia arguta*, Vv = *Vitis vinifera*, Afp = *Aquilegia formosa x pubescens*, Cp = *Citrus paradise*, Posp = *Populus sp.*, Pe = *Passiflora edulis*, Gh = *Gorssypium hirsutum*, Tp = *Tripolium pratense*, Mt = *Medicago trunculata*, Lj = *Lotus japonicus*, Gm = *Glycine max*, Pv = *Phaseolus vulgaris*.

5. Conclusão

O presente trabalho sugere papéis importantes para o gene *MIPS* não só no metabolismo básico, mas também no estabelecimento de programas de desenvolvimento e resposta das plantas a mudanças ambientais. Os resultados demonstraram que o gene *MIPS* de *Passiflora edulis* clonado (*PeMIPS*), é preferencialmente expresso em folhas, grãos-de-pólen, óvulos e sementes nove dias após a polinização. O *PeMIPS* é diferentemente regulado durante o estresse ao frio e calor e em resposta a presença da luz, indicando que as vias subseqüentes após a síntese de *mio*-inositol são importantes na resposta ao estresse ambiental. Supomos que essa resposta tenha uma correlação com a adaptação ecológica do maracujazeiro, que por ser uma espécie adaptada a ambientes tropicais e subtropicais, possui tolerância a períodos curtos de frio (em torno de 12 °C) sem sofrer injúrias, mas não tolera temperaturas mais baixas por um tempo prolongado. Nosso conhecimento acerca da relação estresse e expressão gênica ainda está longe de ser completa, e existem lacunas, principalmente no que diz respeito a espécies tropicais. Conseqüentemente, outros genes envolvidos com a resposta ao estresse devem ser estudados, clonados e caracterizados. Além disso, são necessários estudos para localização de *PeMIPS* em compartimentos subcelulares de distintos tecidos vegetais, assim como silenciamento gênico específico em plantas transgênicas para a melhor compreensão do seu papel durante o desenvolvimento da semente.

6. Referências Bibliográficas

- AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, G. (1959) **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit**. Havaí: University of Hawaii, p. 44, (University Hawaii Technical Bulletin, 39).
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. (2004) *Biologia molecular da célula*. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.* – 4. ed. Porto Alegre: **Artmed**. p. 451-452.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215:403-410.
- BACHHAWAT, N. & MANDE, S.C. (1999) Identification of the INO1 gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv reveals a novel class of inositol 1-phosphate synthase enzyme. **J Mol Biol.** 291:531-536.
- BLUMWALD, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. **Curr Opin Cell Biol** 12:431-434.
- BOHNERT, H.J., SHEVELEVA, E. (1998) Plant stress adaptations – making metabolism move. **Curr Opin Plant Biol** 1:267-274.
- BRUCKNER, C.H.; MELLETTI, L.M.M.; OTONI, W.C.; ZERBINI JUNIOR, F.M. (2002) Maracujazeiro. In: *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa: UFV, p.373-410.
- BRUCKNER, C.H.; MELLETTI, M.C. (2001) Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. **Porto Alegre: Cinco Continentes**, p. 395.
- BURSSSENS, S., HIMANEN, K., VAN DE COTTE, B., BEECKMAN, T., MONTAGU, M.V., INZE, D., VERBRUGGEN, N. (2000) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **Planta** 211:632-640.
- CHAGAS, C.M. (1991) Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil. In: RUGGIERO, C. (Coord.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: Funep, p. 175-186.
- CHATTERJEE, A., MAJEE, M., GHOSH, S., MAJUMDER, A. L. (2004) sll1722, an unassigned open reading frame of *Synechocystis* PCC 6803, codes for L- myo-inositol 1-phosphate synthase. **Planta**. 218:989-998.

- CHUN, J.A.; JIN, U.H.; LEE, J.W.; YI, Y.B.; HYUNG, N.I.; KANG, M.H.; PYEE, J.H.; SUH, M.C.; KANG, C.W.; SEO, H.Y.; LEE, S.W.; CHUNG, C.H. (2003) Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum*L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. **Planta**. 216:874-880.
- CRONQUIST, A. (1988) The evolution and classification of flowering plants. **New York: The New York Botanical Garden, Bronx**, New York, p. 554.
- EMANUELSSON, O., NIELSEN, H., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**. 300:1005-1016.
- ENGLISH, P.D.; DIETZ, M.; ALBERSHEIM, P. (1966) Myo-inositol kinase: partial purification and identification of product. **Science**, v. 151, p. 198-199.
- GIBSON, S., ARONDEL, V., IBA, K., AND SOMERVILLE, C. (1994). Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**. 106: 1615–1621.
- HEGEMAN, C.E., GOOD, L. L., GRABAU, E. A. (2001) Expression of D-*myo*-Inositol-3-Phosphate Synthase in Soybean. Implications for Phytic Acid Biosynthesis. **Plant Physiology**. 125: 1941-1948.
- HICKEY, M .; KING, C. (1988) 100 families of flowering plants. **Cambridge University Press, Cambridge**, p. 130-133.
- HUANG L, LEE J, SITARAMAN K, GALLEGO A, RACHTCHIAN A. (2000) A New Highly Sensitive Two-Step RT-PCR System. **Focus**. 22:6-7.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção agrícola municipal – Culturas temporárias e perenes, v. 29, <http://www.ibge.gov.br> (03 setembro 2004).
- ISHITANI, M., MAJUMDER, A. L., BORNHOUSER, A., MICHALOWSKI, C. B., JENSEN, R. G., & BOHNERT, H. J. (1996) Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. **Plant J**. 9:279-293.
- JOHNSON, M.D. & BURK, D.H. (1995) Isozyme of 1-myoinositol-1-phosphate synthase from *Arabidopsis*. **Plant Physiol**. 109:721-726.

- JOHNSON, M.D. (1994) The *Arabidopsis thaliana* myo-inositol-1-phosphate synthase. **Plant Physiol.** 105:1023-1024.
- JORGENSEN, P.M.; LAWESSON, J.E.; HOLM-IELSEN, L.B. (1984) A guide to collecting passionflowers. **Annals of the Missouri Botany Garden**, St. Louis, v.71, p. 1172-1174.
- KIMURA, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16:111-120.
- LARSON, S.R.; RABOY, V. (1999) Linkage mapping of maize and barley myo-inositol 1-phosphate synthase DNA sequences: correspondence with a low phytic acid mutation. **Theoretical and Applied Genetics.** 99 (1-2):27-36.
- LEITE, R.A.S.;BLISKA, F.M.M.;GARCIA, A.E.B. (1994) Aspectos econômicos da produção e mercado. In: ITAL, **Maracujá. Campinas: ITAL**, p. 154-176.
- LEMTIRI-CHLIEH, F., MACROBBIE, E.A., WEBB, A.A., MANISON, N.F., BROWNLEE, C., SKEPPER, J.N., CHEN, J., PRESTWICH, G.D. AND BREARLEY, C.A. (2003) Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p. 1091-1095.
- LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. (2004) **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**, Cruz das Almas: Embrapa, p 396.
- LOEWUS FA, MURTHY PPN (2000) *Myo*-Inositol metabolism in plants. **Plant Sci** 150: 1-19.
- LOEWUS, F.A (1990) Inositol metabolism in plants, In: Boss WF, Morre DJ, Loewus FA (eds) **Wiley-Liss, Inc, New York.** 9:13-19.
- LOEWUS, M.W., SASAKI, K., LEAVITT, A.L., MUNSELL, L., SHERMAN, W.R. AND LOEWUS, F.A. (1982) Enantiomeric form of myo-inositol-1-phosphate produced by myo-inositol-1-phosphate synthase and myo-inositol kinase in higher plants. **Plant Physiol.**, v. 70, p. 1661-1663.
- LOPES, S.C. (1994) Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp, In: São José, A.R. **Maracujá produção e mercado.** Vitória da Conquista: UESB, p. 19-23.

- MAJUMDER AL, CHATTERJEE A, GHOSH DASTIDAR K, MAJEE M (2003) Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase. **FEBS Lett.** 533:3-10.
- MAJUMDER AL, JOHNSON MD, HENRY SA (1997) 1L-myo-Inositol-1-phosphate synthase. **Biochim Biophys Acta.** 1348:245-256.
- MAJUMDER, A.N.L. & BISWAS, B.B. (1973) Further characterization of phosphoinositol kinase isolated from germinating mung bean seeds. **Phytochemistry.** v. 12, p. 315-319.
- MAOUT, L. E.; DECAISNE, J. (1976) A general system of botany. Longmans, **Green London and Company.** p. 446-449.
- MAY, P.G.; SPEARS JÚNIOR, E.E. (1988) Andromonoecy and variation in phenotypic gender of *Passiflora incarnata* (Passifloraceae). **American Journal of Botany.** v. 75, p.1830-1841.
- MELLETTI, L.M.M; MAIA, L.M. (1999) **Maracujá: produção e comercialização.** Campinas: Instituto Agronômico, p. 62.
- OGA, S., DEFREITAS, P.C.D., GOMES DA SILVA, A.C., HANADA, S. (1984) Pharmacological trials of crude extracts of *Passiflora alata*. **Planta Medica,** 51, p. 303-306.
- PEREIRA, A.L.C.; CAMPACCI, C.A.; CIANCIULLI, P.L. (1971) Maracujá: seu cultivo, espécie e moléstias. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Campinas. **Anais Campinas:** SBF, p. 641-658.
- PERERA, I.Y.; HUNG, C.Y.; BRADY, S.; MUDAY, G.K.; BOSS, W.F. (2006) A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. **Plant Physiology.** 140: 746-760.
- QUESADA V, PONCE MR, MICOL JL (2000) Genetic analysis of salttolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics.** 154: 421-436.
- RABOY, V. (1997) Accumulation and storage of phosphate and minerals. In: Larkins BA, Vasil IK (eds) Cellular and molecular biology of plant seed development. **Kluwer Publishers,** The Netherlands, pp 441-477.
- RABOY, V.; GERBASI, P.; YOUNG, K.; STONEBERG, S.; PICKETT, S.; BAUMAN, A.; MURTHY, P.; SHERIDAN, W.; ERTL, D. (2000) Origin and seed phenotype of maize *low phytic acid 1-1* and *low phytic acid 2-1*. **Plant Physiol,** v. 124, p.355-368.

- RAYCHAUDHURI A, HAIT NC, DASGUPTA S, BHADURI TJ, DEB R, MAJUMDER AL (1997) L-myo-inositol 1-phosphate synthase from plant sources: characteristics of the chloroplastic and cytosolic enzymes. **Plant Physiol.** 115:727-736.
- RAYCHAUDHURI A, MAJUMDER AL (1996) Salinity induced enhancement of L-myo-inositol 1-phosphate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Environ** 19:1337-1342.
- RENDLE, A.B. (1959) Classification of flowering plants. **Cambridge University Press, Cambridge**, p. 211-213.
- ROMANO, E. (1998) Manual de transformação genética de plantas. In: extração de DNA de tecidos vegetais. **Embrapa**, Brasília, 309p.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, P.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURIGAN, J.F.; BAUMGATNER, J.C.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. DE P. (1996) **Maracujá para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 64.
- SAFRANY, S.T., CAFFREY, J.J., YANG, X.N., SHEARS, S.B. (1999) Diphosphoinositol polyphosphates: The final frontier for inositide research? **Biological Chemistry.** 380:945-951.
- SAIARDI, A., SCIAMBI, C., MCCAFFERY, J.M., WENDLAND, B., SNYDER, S.H. (2002) Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 99: 14206-14211.
- SAITOU, N.; NEI, M. (1987) The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution.** 4 (4):406-425.
- SAVITCI, L.A.; GASPARINO-FILHO, J.; MORETTI, V.A. (1994) Identificação do potencial da fruta brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 32., Brasília, 1994. Anais. Brasília: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, v. 2, p. 969-979.
- SCHOLZ, S., SONNENBICHLER, J., SCHAFFER, W., AND HENSEL, R. (1992) Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: A new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*, **FEBS Lett.** 306: 239-242.

- SHEN, X.; XIAO, H.; RANALLO, R.; WU, W.H.; WU, C. (2003) Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphate. **Science**, v. 299, p. 112-114.
- SHI, J.; WANG, H.; HAZEBROEK, J.; ERTL, D.S.; HARP, T. (2005) The maize acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. **The Plant Journal**, v. 42, p. 708-719.
- SHI, J.; WANG, H.; WU, Y.; HAZEBROEK, J.; MEELEY, R.B.; ERTL, D.S. (2003) The maize low-phytic acid mutant Ipa2 is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. **Plant Physiol.**, v. 131, p. 507-515.
- STEIN AJ, GEIGER JH (2002) The crystal structure and mechanism of 1-L-myo-inositol-1-phosphate synthase. **J Biol Chem** 277:9484-9491.
- STROTHER, S. (1980) Homeostasis in germinating seeds. **Annals of Botany**, v. 45, p. 217-218.
- STYER J (2000) Regulating inositol biosynthesis in plants: *myo*-inositol phosphate synthase and myo-inositol monophosphatase. **MS thesis**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- TANAKA, K., YOSHIDA, T. AND KASAI, Z. (1976) Phosphorylation of myo-inositol by isolated aleurone particles of rice. **Agric. Biol. Chem.**, v. 40, p. 1319-1325.
- TAYLOR; L. (1996) Maracujá, Herbal Secrets of the Rainforest. **Prime Publishing Inc.**, Austin, TX.
- VANDERPLANK, T. (1996) Passion flowers. **Cambridge Press**, MIT, p 224.
- WEI, J.Z., TIRAJOH A., E.ENDY J., PLANT, A.L. (2000) Characterization of salt-induced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and the role played by abscisic acid. **Plant Sci**. 159:135-148.
- YORK, J.D.; ODOM, A.R.; MURPHY, R.; IVES, E.B.; WENTE, S.R. (1999) A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. **Science**, v. 285, p. 96-100.
- YOSHIDA, K.T.; WADA, T.; KOYAMA, H.; MIZOBUCHI-FUKUOKA, R.; NAITO, S. (1999) Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. **Plant Physiol.**, v.119, p. 65-72.

ZHOU JR.; ERDMAN JW. (1995) Phytic acid in health and disease. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 35(6):495-508.

Anexo 1

Soluções e Reagentes

DTT 1M

Dissolver 3,09 g de DTT em 20 mL de acetato de sódio 10 mM, pH 5,2. Esterilizar por filtração. Distribuir em alíquotas de 1 mL e estocar a -20 °C.

TE pH 8,0

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	1 mL	10 mM
EDTA 500 mM, pH 8,0	200 µL	1 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

TBE 10X

Dissolver 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico e 40 mL de EDTA 500 mM, pH 8,0, em água destilada. Completar o volume até 1 litro.

SDS 20%

Dissolver 200 g de SDS em 700 mL de água destilada, em banho-maria a 50 °C, no mínimo. Completar o volume até 1 L com água destilada.

Solução de Denhardt 50X

Dissolver lentamente em 50 mL de água destilada, em agitador magnético, 1g de BSA, 1g de Ficoll tipo 400 e 1 g de PVP. Completar o volume até 100 mL com água destilada. Dividir em alíquotas e armazenar a -20 °C.

Gel de agarose 1%

Para preparar 100 mL de gel. Pesar 1 g de agarose e dissolver por aquecimento em tampão TBE 0,5 X.

Tampão SSPE 20X

Componente	Quantidade	Concentração final
NaCl	175,3 g	3 M
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27,6 g	0,2 M
Na ₂ .EDTA. ₂ H ₂ O	7,4 g	20 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Ajustar o pH para 7,4 com 10 N NaOH.

Tampão SSC 20X

Componente	Quantidade	Concentração final
NaCl	175,3 g	3 M
Citrato de sódio	88,2 g	0,3 M
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

EDTA 500 mM, pH 8,0

Adicionar 186,1 g de Na₂.EDTA.2H₂O a 800 mL de água destilada e homogeneizar com agitador magnético. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH (aproximadamente 20 g de NaOH em pastilhas).

O EDTA não irá solubilizar totalmente até que a solução atinja o pH 8,0. Completar o volume até 1 litro. Esterilizar em autoclave.

Glicerol 10%

Misturar 10 mL de glicerol puro a 90 mL de água destilada e autoclavar.

Tampão Tris HCL 1 M

Dissolver 121,1 g de Tris base em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH adicionando HCl concentrado, nas seguintes quantidades:

pH	HCl
7,4	70 mL
7,6	60 mL
8,0	42 mL

Solução de pré-hibridização

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	12,5 mL	5 X
Solução de Denhardt 100X	2,5 mL	5X
SDS 10%	2,5 mL	0,5%
DNA de esperma de salmão 10 mg/mL	100 µL	20 µg/mL
Água	q.s.p. 50 mL	

Solução de Lavagem I

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	50 mL	2X
SDS 10%	5 mL	0,1%
Água	q.s.p. 500 mL	

Solução de Lavagem II

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	25 mL	1X
SDS 10%	5 mL	0,1%
Água	q.s.p. 500 mL	

Solução de Lavagem III

Componente	Quantidade	Concentração Final
SSC 20X	2,5 mL	0,1X
SDS 10%	5 mL	0,1%
Água	q.s.p. 500 mL	

Anexo 2

Submissão das seqüências ao *Genbank*

LOCUS DQ489558 1951 bp mRNA linear PLN 16-MAY-2006
 DEFINITION *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* myo-inositol 1-phosphate synthase
 (mips) mRNA, complete cds.
 ACCESSION DQ489558
 VERSION DQ489558.1 GI:95104694
 KEYWORDS .
 SOURCE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*
 ORGANISM [Passiflora edulis f. flavicarpa](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 rosids; eurosids I; Malpighiales; Passifloraceae; *Passiflora*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1951)
 AUTHORS Aragao, F.J.L. and Abreu, E.F.M.
 TITLE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* mRNA for myo-inositol 1-phosphate synthase (mips gene)
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1951)
 AUTHORS Aragao, F.J.L. and Abreu, E.F.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-APR-2006) Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia,
 Embrapa, PqEB W5 Norte, Brasilia, DF 70770-900, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1951
 /organism="Passiflora edulis f. flavicarpa"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:237848"
 /note="forma: flavicarpa"
gene 1..1951
 /gene="mips"
CDS 133..1665
 /gene="mips"
 /codon_start=1
 /product="myo-inositol 1-phosphate synthase"
 /protein_id="[ABF51620.1](#)"
 /db_xref="GI:95104695"

 /translation="MFIDTFKVESPNVKYTEDEIHSVYNYETTELVHENRNGTYQWTV
 KPKTVQYEFKTSIHVPKLGVMVLVGGWNGSSLTGGIIANREGISWATKDKVQQANYF
 GSLTQASTIRVGSFNAGEEIIYAPFKSLLPMVSPDDVVIGWDISDMNLADAMARAKVFD
 IDLQKQLRPYMESMIPLPGIYDPDFIAANQGSRRANNVITGSKKEQLQQVIKDIREFKE
 KNKVDKVVVLWTANTERYSNVVVGLNNDTMENLMAALERNESEISPSTLYALACVLENV
 PFVNGSPQNTFVPLGLIDLAIKRNSLIGGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVS
 YNHLGNNDGMNLSAPQTFRSKEISKSNVDDMVSSNGILYEPGEHPDHVVVIKYVPYV
 GDSKRAMDEYTSEIFMGGKSTIVLHNTCEDSLLAAPIIIDLVLLELSTRIQLKAEGE
 GKFSFHPVATILSYLTKAPLVPPGTPVNVNALSQRAMLENILRACIGLAPENNMILE
 YK"
 ORIGIN
 1 aataacacaa ccacacaaag gcttcagaga gttgCGaaag cagattagct
 cctctctttg
 61 tttggctttg ggccttttgg gttctcttct cgttttaatc atccacagtt
 ctctcccctt

121	cctgctaaca	aaatgttcat	cgacacgttt	aaggttgaga	gtcctaacgt
taagtacaca					
181	gaggatgaga	ttcactcggg	gtacaactat	gagaccactg	agcttgttca
tgagaacagg					
241	aatggtacct	atcagtggac	tgtcaaacc	aaaactgtcc	aatacgaatt
caagaccagc					
301	attcatgtcc	ccaaactcgg	ggttatgctc	gtgggggtggg	gaggaaacaa
tggatcgtct					
361	ctcaccggcg	gtatcatagc	caaccgagag	ggaatctcct	gggcgaccaa
ggacaaggtg					
421	cagcaagcca	actactttgg	ctcgctaacc	caggcttcaa	ctatccgagt
tgggtctttc					
481	aatggagagg	agattttatgc	tccattcaaa	agcctgctcc	ccatggtgag
ccccgatgac					
541	gttggttattg	gaggatggga	cataagtgac	atgaacttgg	ctgacgccat
ggccagggca					
601	aaagtcttcg	acattgatct	gcagaaacaa	ctcaggccct	acatggaatc
catgatccca					
661	ctacccggaa	tatatgaccc	tgatttcatt	gctgccaacc	aagggtcacg
tgccaacaat					
721	gtgatcacag	gctccaagaa	agaacaactt	cagcaagtca	tcaaggacat
cagggagttt					
781	aaggaaaaaa	acaaggtaga	caaggtgggt	gtgctgtgga	ctgccaacac
agagaggtac					
841	agcaatgtcg	tcgtggggct	aatgacacc	atggagaacc	tcatggctgc
actggagagg					
901	aatgaatcag	agatatctcc	atcaactttg	tatgccttgg	cctgtgtggt
ggaaaatggt					
961	ccttttgtga	acggaagccc	ccagaacacc	tttgttcag	ggttgattga
tctggctatc					
1021	aagaggaaca	gtttgattgg	tggggatgac	tttaagagtg	gtcagaccaa
aatgaagtcc					
1081	gtcctgggtg	atctccttgt	tgggtgctggg	atcaagccaa	cgtcgatagt
gagctacaac					
1141	catctgggca	ataatgacgg	catgaatctg	tcagcgccgc	aaactttccg
ttccaaggag					
1201	atctccaaga	gcaatgttgt	agacgacatg	gtctccagca	atggaatact
ctatgaacct					
1261	ggtgaacatc	ctgaccacgt	tgtggtcatt	aagtatgtgc	catacgtggg
ggatagcaag					
1321	agggctatgg	acgagtacac	ctcggagata	ttcatgggtg	gaaagagcac
tatagtgcta					
1381	cacaatacgt	gtgaagactc	cctgctggct	gcacccatca	tcctggactt
ggttcttctc					
1441	gctgagctca	gtaccaggat	ccagctgaaa	gccgagggag	agggaaagtt
tcattctttc					
1501	caccgggtgg	ctaccatcct	cagttacctc	acaaggctc	ctctggttcc
cccagggacg					
1561	ccggtagtga	atgcactttc	aaagcagcgt	gcaatgctgg	agaacatatt
gagagcttgt					
1621	attggattgg	ctccagagaa	taacatgatt	ttggaataca	agtgaagtat
taagaagaat					
1681	aacaaggatg	atggtgggga	gcagaccagt	tcataagctg	tagaaacaat
gaatgttccc					
1741	ttttctcttt	ccaatccagt	gtttattgat	gtctgtctga	tatttgccat
tactaggcat					

```
1801  attagttctc  tatgttctgg  cttttagcgt  tgtgtaggct  tttagcccct
ctgctctggc
1861  attttcaatg  accgagctac  tcttttcatg  tggaaatagt  tcataaatat
aaaactgtct
1921  ataaattctg  ttcaaaaaaa aaaaaaaaaa a
```

LOCUS DQ447161 358 bp mRNA linear PLN 05-
 APR-2006
 DEFINITION *Passiflora edulis* translation elongation factor 1a-2 (EF1a2)
 mRNA,
 partial cds.
 ACCESSION DQ447161
 VERSION DQ447161.1 GI:90895962
 KEYWORDS .
 SOURCE *Passiflora edulis*
 ORGANISM [Passiflora edulis](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
 eudicotyledons;
 rosids; eurosids I; Malpighiales; Passifloraceae; *Passiflora*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 358)
 AUTHORS Abreu,E.F.M. and Aragao,F.J.L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-MAR-2006) LTG, Embrapa Recursos Geneticos e
 Biotecnologia, PqEB W5 Norte, Brasilia, DF 70770-900, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..358
 /organism="Passiflora edulis"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[78168](#)"
[gene](#) <1..>358
 /gene="EF1a2"
[CDS](#) <1..>358
 /gene="EF1a2"
 /codon_start=2
 /product="translation elongation factor 1a-2"
 /protein_id="[ABE01408.1](#)"
 /db_xref="GI:90895963"

 /translation="VAVKDLKRGFVASNSKDDPAKEAANFTAQVIIMNHPGQIGNGYA
 PVLDCHTSHIAVKFSEILTKIDRRSGKELEKEPKFLKNGDAGFVKMIPTKPMVVETFS
 EYPPLGRFAVRDMRQTV"
 ORIGIN
 1 tgttgctggt aaggatttga agcgtggttt tgtggcctca aactccaagg
 atgatoctgc
 61 caaggaggca gccaaacttca cagcccaagt tatcatcatg aatcaccctg
 gccagattgg
 121 aaatggttat gccccagtcc tcgactgcca cacatcccac attgctgtga
 aatthttctga
 181 aattctgacc aagattgata gacgatctgg taaggagctt gagaaggagc
 ccaagttctt
 241 aaagaacggt gatgccggat ttgtgaagat gattcccacc aagcccatgg
 tggtaggagac
 301 tttttctgag taccctocac ttggtcgttt cgctgttagg gacatgcgtc aaactggt

LOCUS DQ447160 358 bp mRNA linear PLN 05-
 APR-2006
 DEFINITION *Passiflora edulis* translation elongation factor 1a-1 (EF1a1)
 mRNA,
 partial cds.
 ACCESSION DQ447160
 VERSION DQ447160.1 GI:90895950
 KEYWORDS .
 SOURCE *Passiflora edulis*
 ORGANISM [Passiflora edulis](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
 Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
 eudicotyledons;
 rosids; eurosids I; Malpighiales; Passifloraceae; *Passiflora*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 358)
 AUTHORS Abreu,E.F.M. and Aragao,F.J.L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-MAR-2006) LTG, Embrapa Recursos Geneticos e
 Biotecnologia, PqEB W5 Norte, Brasilia, DF 70770-900, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..358
 /organism="Passiflora edulis"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[78168](#)"
[gene](#) <1..>358
 /gene="EF1a1"
[CDS](#) <1..>358
 /gene="EF1a1"
 /codon_start=2
 /product="translation elongation factor 1a-1"
 /protein_id="[ABE01407.1](#)"
 /db_xref="GI:90895951"

 /translation="VAVKDLKRGYVASNSKDDPTKEANFTSQVIIMNHPGQIGNGYA
 PVLDCHTSHIAVKFSEILTKIDRRSGKELEKEPKFLKNGDAGFVKMIPTKPMVVETFS
 EYPPLGRFAVRDMRQTV"
 ORIGIN
 1 tgttgctggt aaggatttga agcgtgggta tgttgcttcc aactcgaagg
 atgatoctac
 61 aaaggaggct gccaaacttca cctctcaggt catcatcatg aaccaccctg
 gacagatcgg
 121 caacggatac gccccagtgcc tgcactgccac cacatcacac attgccgtca
 agttttctga
 181 aatcttgacc aagatcgaca ggcgggtctgg caaggagctg gagaaagagc
 ccaaattctt
 241 gaagaacggt gatgctggat tcgtgaagat gattcctacc aagcccatgg
 tggatggagac
 301 cttctocgag taccctoctc ttggctogatt tgctgttagg gacatgcgtc aaactggt

Anexo 3

Resumo do trabalho apresentado no 52º Congresso Brasileiro de Genética

Cloning and Characterization of the Expression of *MIPS1* Gene from *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

Abreu, EFM (1,2); Fischmann, GDPA (1); [Aragão, FJL \(1\)](#)

(1) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (2) Departamento de Botânica, Universidade de Brasília.

Emanuel@cenargen.embrapa.br

Key words: *Passiflora edulis*, *MIPS*.

Inositol, a ubiquitous compound found in all organisms, participates in such cellular functions as, membrane trafficking, signaling, stress protection, cell wall biosynthesis, hormonal homeostasis, regulation of cellular metabolism and growth control. In plants, *myo*-inositol-1-phosphate, is synthesized from glucose 6-phosphate in a reaction catalyzed by the enzyme *myo*-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) which is encoded by *myo*-inositol-1-phosphate synthase (*MIPS*). We have recently demonstrated that the expression of *MIPS1* gene in developing soybean (*Glycine max*) seeds is essential for both cotyledon and embryo development. In this work, we report the isolation of a full-length *MIPS* cDNA of 1,954 bp from developing seeds of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) designated *PeMIPS1*. The full-length was entered into the NCBI *Genbank* database using the accession number DQ489558. In addition, we characterized the expression of the putative gene during seed development and other organs, such as stem, petals, leaves, ovules, microspores and leaf glands. Our results demonstrated that *MIPS1* gene from *P. edulis* is expressed at high-level only in early cotyledonary stages (3-9 days after pollination). This fact may suggest that the conversion of glucose 6-phosphate to *myo*-inositol-1-phosphate occurs earlier in seed development. Southern blot analysis revealed the presence of a single copy of the gene in the genome. Phylogenetics analysis showed the gene bears a similar root with other *MIPS* sequences from other species of the order Malpighiales. Similar *MIPS* encoding sequences from other *Passiflora* species of Amazon and Brazilian Cerrado origins, are being cloned and sequenced.

Anexo 4

Artigo concluído e submetido ao periódico *Annals of Botany*

Isolation and characterization of a *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress

EMANUEL F. M. ABREU^{1,2} and FRANCISCO J. L. ARAGÃO^{1*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Introdução e Expressão de Genes, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF, Brazil.

²Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, CP 04457, 70919-970, Brasília, DF, Brazil.

Running title: Characterization of a *MIPS* gene from yellow passion fruit (*P. edulis*)

* Author for correspondence. E-mail aragao@cenargen.embrapa.br

Background and Aims: Myo-inositol-1L-phosphate synthase (MIPS) catalyses the conversion of D-glucose 6-phosphate to 1-L-*myo*-inositol-1-phosphate, the first and rate-limiting step in the biosynthesis of all inositol-containing compounds. Inositol phospholipids play a vital role in membrane trafficking and signalling pathways, auxin storage and transport, phytic acid biosynthesis, cell wall biosynthesis, and production of stress-related molecules. In the present study, we characterised an *MIPS* cDNA from developing *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* seeds and investigated its spatial and differential expression, as well as changes in its transcription during exposure of growing plants to cold and heat stresses.

Methods: MIPS encoding gene was isolated by PCR methods and transcript levels were examined using semi-quantitative RT-PCR during seed development and in response to heat and cold stress. In addition, the copy number of the cloned *PeMIPS1* gene in the genome of *Passiflora edulis*, *Passiflora eichleriana*, *Passiflora caerulea*, *Passiflora nitida* and *Passiflora coccinea* was determined by Southern blot analyses.

Key Results: Full-length cDNA clone of the *PeMIPS1* from *P. edulis* was isolated and characterised. Southern blot analyses indicated that the genomic DNA might have diverse sequences of MIPS-encoding genes and one copy of the cloned *PeMIPS1* gene in the genomes of *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* and *P. coccinea*. RT-PCR expression analyses revealed the presence of *PeMIPS1* transcripts in ovules, pollen grains and leaves, and during the seed developmental stages, where it peaked at nine days after pollination. The *PeMIPS1* gene is differentially regulated under cold- and heat-stress, presenting a light-responsive transcription.

Conclusions: Experimental data suggest that *PeMIPSI* plays an important role in the establishment of developmental programs and during the response of plants to environmental changes. The *PeMIPSI* is differentially regulated during cold and heat stress, presenting a light-response pattern, indicating that the extension of the inositol pathway is an important aspect for environmental stress response.

Key words: *Passiflora*, passion fruit, MIPS, *myo*-inositol-1L-phosphate synthase, gene expression, abiotic stress

INTRODUCTION

Myo-inositol-1L-phosphate synthase (MIPS) (EC 5.5.1.4) and *myo*-inositol monophosphatase (IMP) (EC 3.1.3.25) are involved in the *de novo* inositol biosynthesis pathway (Loweus and Loweus, 1983, Loweus, 1990; Raboy 2002). MIPS catalyzes the conversion of D-glucose 6-phosphate to 1-L-*myo*-inositol-1-phosphate (MIP), the first and rate-limiting step in the biosynthesis of all inositol-containing compounds. Inositol is a negative feedback inhibitor of this conversion (Majumder *et al.*, 1997). IMP catalyzes the dephosphorylation of MIP to produce inositol. An alternative route to produce intracellular inositol pools is by recycling or scavenging inositol phosphates through the phosphatidylinositol signalling pathway and by *myo*-inositol polyphosphate breakdown (for review see Downes *et al.*, 2005).

Inositol phospholipids play a vital role in membrane trafficking and signalling pathways, auxin storage and transport, phytic acid biosynthesis, cell wall biosynthesis, and production of stress-related molecules (Loewus, 1990; Loewus and Murthy, 2000; Stevenson *et al.*, 2000; Downes *et al.*, 2005). The phosphorylated derivatives are essential as a phosphorus store and as a second messenger in signal transduction. In addition, *myo*-inositol polyphosphates participate in chromatin remodelling, gene expression and mRNA export (Odom *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2003). Recently, we demonstrated that the lack of expression of *GmMIPS* in immature soybean seeds leads to an absence of accumulation of phytate globoids and seed development (Nunes *et al.*, 2006).

Inositol phosphate biosynthesis pathway in developing seeds is poorly understood (Hitz *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2005). Hegeman *et al* (2001) found detectable levels of MIPS

protein mainly during seed development, indicating high-level expression only in early cotyledonary stages. This fact suggests that the conversion of glucose 6-phosphate to *myo*-inositol-1-phosphate occurs earlier in seed development. It is also suggested that inositol and the *o*-methyl inositol esters function in salt tolerance by protecting cellular structures from reactive oxygen species such as hydrogen peroxide, and by controlling turgor pressure (for review see Loewus and Murthy, 2000). MIPS is the first enzyme in a metabolic pathway to D-pinitol, which is a cyclic sugar alcohol involved in the tolerance of drought stress that accumulates to higher concentrations in salt-tolerant legumes (Bohnert and Sheveleva, 1998; Bray *et al.*, 2000).

MIPS coding sequences have been isolated and characterised for some plant species, such as *Spirodela polyrrhiza* (Smart and Fleming, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Johnson, 1994), *Citrus paradisi* (Abu-Abied and Holland, 1994), *Mesembryanthemum crystallinum* (Ishitani *et al.*, 1996), *Nicotiana tabacum* (Hara *et al.*, 2000), *Glycine max* (Hegeman *et al.*, 2001), *Hordeum vulgare* (Larson and Raboy, 1999), *Oryza sativa* (Yoshida, 1999), *Zea mays* (Larson and Raboy, 1999) and *Sesamum indicum* (Chun *et al.*, 2003). MIPS-encoding sequences represent multigene families in some plant species. Seven sequences were found in maize (Larson and Raboy, 1999), two in *Arabidopsis* (Johnson and Sussex, 1995), at least four in soybean (Hegeman *et al.*, 2001) and at least three copies in *S. indicum* (Chun *et al.*, 2003). The MIPS gene from *M. crystallinum* may also belong to a multigene family as suggested by low-stringency Southern analysis (Ishitani *et al.*, 1996). The multiple MIPS genes in plant species may be applied to attune its differential expression to specific physiological functions.

In this study, we have characterised an MIPS cDNA from developing *Passiflora edulis* seeds and examined its spatial and differential expression, as well as changes in its

transcription during exposure of growing plants to cold and heat stresses. Few studies have characterised *MIPS* gene expression in tropical species. The yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) is rich in ascorbic and malic acids, niacin, riboflavin, carotenoids, alkaloids (mainly harman) and the juice is slightly sedative. The fruit is commercially important in Australia, USA (Hawaii and Southern Florida), South Africa and Brazil. (Knight and Sauls, 2005). Despite its importance, there is no information about genes associated with seed development and that are responsive to environmental stress.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Leaves from *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* and *P. coccinea* from the Amazon and Brazilian Cerrado (high-altitude savannah) were collected from the Germplasm Collection at Embrapa Cerrados (Planaltina, DF, Brazil). Fruits from *P. edulis* f. *flavicarpa* were collected from plants cultivated in the field. For Southern analyses, leaves were protected from light with aluminium foil for two days and harvested. Seeds used for obtaining plants for abiotic stress assays were purchased from Feltrin Sementes (Farroupilha, RS, Brazil). Plant tissues were harvested, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA or RNA extraction.

Cloning the PeMIPS1 gene

Total RNA was extracted using the RNaseasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) from 200 mg of fresh tissue from immature embryos. Remaining genomic DNA was eliminated by DNase digestion of the RNA samples. Eight micrograms of total RNA were used to produce total cDNA using the Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Degenerated primer MIPSPeF (5'-TTCATCAATGGCAGCCCHCARAACAC-3') and MIPSPeR2 (5'-TCACTTGTAYTCCARRATCATGTTATT-3') (H=A or C or T; R=G or A; Y=C or T) based on conserved regions of available plant MIPS gene were used to amplify an internal sequence from the *PeMIPSI* gene. RT-PCR reactions were carried out in a thermocycler (PTC-100, MJ Researcher, USA) in 50 µl solution containing 40 ng of cDNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 250 nM of each dNTP; 200 nM of each primer, 5 U of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The mixture was treated at 95°C (5 min) and subjected to 35 cycles of amplification (95°C for 1 min, 55°C for 1 min, 68°C for 1 min) with a final elongation cycle of 5 min at 68°C. The fragments were cloned into the pCR2.1 TOPO vector for PCR products (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced by using universal M13 and T7 primers on automatic sequencer (ABI Prism 3700).

To obtain a full-length *PeMIPSI* cDNA sequence, 5'- and 3'-rapid amplifications of cDNA ends (RACE)-PCR were carried out. Gene-specific primers were designed from the internal sequenced fragment and the cDNA end was amplified by using the 5'- and 3'-RACE System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), using the reverse-specific nested primer MIPSPeRACER (5'-GAGGTGTA CTCTCGTCCATAGC-3') in combination with the GeneRacerTM5'-Primer (Invitrogen), and the forward-specific primer MIPSPeRACEF (5'-GTGAACATCCTGACCACGTTG-3') in combination with GeneRacerTMOligo dT

(Invitrogen). Nested-PCRs were carried out as described above. PCR products were cloned into the pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced.

Phylogenetics

The relationship between the *PeMIPSI* and the *MIPSI* genes from another 31 plant species was determined by aligning it with sequences available at GenBank (www.ncbi.nih.nlm.gov) and the TIGR Gene Indices (www.tigr.org). Only complete coding sequences were used for analysis. The alignment was performed using CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic analyses were carried out using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) version 3.1 software program (Kumar *et al.*, 2004). Mean frequencies of each nucleotide were similar (T = 23%, C = 23%, A = 27%, G = 26%), but a high transitions:transversions ratio was observed. Thus, to consider this unequal probability of the substitution types, the Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) was used to compute distances between each pair of sequences. Phylogenetic trees were then constructed using the neighbour-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987). Bootstrap values were computed using 1,000 replicates to evaluate support for the groupings.

RT-PCR expression analysis

Developing seeds [3, 9, 15, 21 and 27 days after pollination (dap)], leaves, ovules, pollen grains, stems, leaf glands, and petals were removed from plants cultivated under field conditions and used for total RNA extraction as described above. For abiotic stress assays, plants eight weeks after germination maintained at room temperature and light

intensity $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ were transferred to a growth chamber (Conviroon, Winnipeg, Canada) at 5, 12, 27 and 37°C, 85% relative humidity, under darkness or light intensity of $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for a period of 8 and 16h. Leaves were collected for total RNA extraction as described. Total RNA was used to produce cDNA using the reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the protocol suggested by the manufacturer. PCR reactions were carried out as described above, except that Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used and that 25 ng of cDNA was used as a template, in reactions with 20 cycles of amplification. The number of amplification cycles was previously optimised in order to stop the reaction at the exponential stage, ensuring that amplification was semi-quantitative. Primers MIPSPeF and MIPSPeR2 were used to amplify a 693 bp fragment from the *PeMIPS* sequences. As an internal control, primers EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') and EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3') were utilised to amplify 358 bp within the passion fruit housekeeping gene, *PeEF α* , elongation factor EF-1 α (GenBank accessions DQ447160 and DQ447161; cloned and sequenced in this work). PCR reactions with total RNA presented no amplified fragments, while PCR reaction with genomic DNA presented a higher fragment for both *PeMIPS1* and *EF-1 α* genes, suggesting presence of intron(s) within the sequence. Fragments of the MIPS-encoding sequence amplified from expressing plant tissues were cloned into the pGEMT-Easy and sequenced. Experiments were repeated three times.

Genomic Southern blot analysis

Genomic DNA was isolated from leaves using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Southern blotting was carried out as described (Sambrook and Russell, 2001). Genomic DNA (15 µg) was digested with *EcoRI*, *HindIII* and *XhoI*, separated on 1% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Hybridization was carried out at 55°C using the 693 bp internal fragment from *PeMIPS1* gene, labelled with $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (3,000 Ci.mol⁻¹) using a random primer DNA labelling kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Membranes were washed twice in 2X SSC (1X SSC = 150 mM NaCl and 15 mM sodium citrate), 0.1% (w/v) SDS at room temperature for 15 min and once in 1X SSC, 0.1% (w/v) SDS at 65°C for 15 min. Stringent washing was carried out using 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS at 65°C for 15 min prior to exposing the membrane for autoradiography.

RESULTS

Isolation of an MIPS-encoding gene from P. edulis.

A full-length *MIPS* cDNA of 1,951 bp was isolated from developing passion fruit seeds and entered into the NCBI GenBank database with the accession number DQ489558. The cDNA contains one open reading frame of 1,533 bp encoding 510 amino acids. In the 3'-nontranslational region, the putative polyadenylation signal sequences (AATAA and ATTAA) were found upstream of the poly (A) tail. The nucleotide sequence of *PeMIPS1* gene coding region was compared with sequences of *MIPS* genes from 31 plant species

available in the GenBank and TIGR databases and showed a high similarity (from 74% to 86%). The deduced amino acid sequence was used to compare the amino acid composition of the PeMIPS1 polypeptide to those of other plant MIPS. The analysis revealed a high similarity of 85 to 93%. The TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) and ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) program algorithms predicted no signal, chloroplast transit or mitochondrial targeting peptides in the N-terminal region of the PeMIPS1.

The PeMIPS1 polypeptide contains four highly conserved motifs found in other plant species: GWGGNNG (domain 1), VLWTANTER (domain 2), NGSPQNTFVPGL (domain 3) and SYNHLGNNDG (domain 4). These motifs are found in animal and microorganism species, such as *Anopheles gambiae* (GenBank accession No. XM320685), *Drosophila melanogaster* (GenBank accession No. AF071103), *Homo sapiens*, (GenBank accession No. AF207640), *Xenopus laevis* (GenBank accession No. BC077437), *Aspergillus fumigatus* (GenBank accession No. XM744144), *Pichia pastoris* (GenBank accession No. AF078915), *Entamoeba histolytica* (GenBank accession No. Y11270) and *Leishmania amazonensis* (GenBank accession No. U91965).

Phylogenetic analysis divided *MIPS* genes into clusters in agreement with taxonomic differentiation (Figure 1). The rootless phylogenetic tree obtained in the phylogenetic analysis of *MIPS* genes showed four main branches. The first includes the *Pinnus* sp, the only gymnosperm species present. The second main branch encompasses the sequences of monocots. The third branch is formed by *MIPS* from *S. polyrrhiza*, an aquatic plant. The fourth main branch comprises the sequences of dicotyledonous species. Surprisingly, *Triticum aestivum* rooted with dicotyledonous species. The branch of the dicotyledonous species was split into six conspicuous observable sub-branches. The main sub-branch is formed by species from the order Fabales (*Glycine max*, *Trifolium pratense*,

Lotus japonicus, *Medicago truncatula* and *Phaseolus vulgaris*). *P. edulis* MIPS rooted with *Populus* sp.; both species are from the order Malpighiales. The other sub-branches are formed by the orders Solanales (*Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* and *Lycopersicon esculentum*), Lamiales (*Sesamum indicum* and *Avicennia marina*), Brassicales (*Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*) and Caryophyllales (*Mesembryanthemum crystallinum* and *Sueda maritima*) (Figure 1).

Southern analysis of MIPS-encoding genes in five species of Passiflora

Southern blot analyses were performed to determine the sequences related to the *PeMIPS1* clone in the *Passiflora* species genome. Genomic DNA was digested with *EcoRI*, *HindIII* and *XhoI* separately and probed with the 693-bp internal fragment from *PeMIPS1* gene. At low stringency, a high number of strong bands were visible, which disappeared when the blot was washed at high stringency (Figure 2). Digestions with *HindIII* presented a distinct pattern among species showing a polymorphism within the enzyme site. A single hybridizing band was observed with *XhoI* digestions (Figure 2B). Results obtained under low-stringency conditions indicated that there might be diverse sequences of MIPS-encoding genes in genomic DNA. The strong signal in one band, approximately 3 kb, obtained under high-stringency conditions after digestion with *XhoI*, indicated that the genome of *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* and *P. coccinea* may have one copy of the cloned *PeMIPS1* gene.

Levels of PeMIPS1 transcripts in organs and developing seeds of P. edulis

RT-PCR expression analyses were carried out to detect endogenous *PeMIPS1* transcripts in different *P. edulis* organs and developing seeds. Results revealed the presence of *PeMIPS1* transcripts in ovules, pollen grains and leaves, and no signal could be observed in stems, petals or leaf gland (Figure 3A). *PeMIPS1* transcripts were observed in all seed developmental stages analysed. However, the expression peaked in seeds at nine days after pollination (Figure 3B). As development progressed, *MIPS* transcript levels decreased. A similar level of the *PeEF α* (elongation factor EF-1 α) housekeeping gene was observed for all RT-PCR amplifications. The 693 bp-fragment that corresponds to the *PeMIPS1* encoding sequence amplified from expressing tissues was sequenced and revealed 100% identity with the cloned *PeMIPS1* gene.

Levels of PeMIPS1 transcripts in response to cold- and heat-stress under light and dark conditions

The effect of temperature and light on the transcript levels of the endogenous *PeMIPS1* gene was studied in growing plants (eight weeks after germination). Results revealed that under dark conditions *PeMIPS1* transcripts were upregulated during a short period under cold stress (5°C), whereas at higher temperatures (27°C and 37°C), transcription levels increased slightly after 16h (Figure 4A). The highest expression levels were observed at 12°C at 8 and 16h, with a slight decrease at 16h. Plants exposed to 5°C showed *PeMIPS* induction after 8h of cold stress but a decrease at 16h. Enhanced transcription of the *PeMIPS1* gene was also observed after 16h at 27°C but not at 37°C, which showed the lowest amounts of transcripts compared to control (Figure 4A). Under

continuous light conditions (Figure 4B), enhanced *PeMIPSI* transcription was observed after 16h at 12°C and 27°C, when compared to the transcriptional level observed after 8h (Figure 4B). *PeMIPSI* transcripts were *quasi* undetectable at 37°C.

DISCUSSION

The phylogenetic tree constructed on the basis of multiple alignments of *MIPS* genes shows clear segregation of these genes into monocotyledonous and dicotyledonous. It is possible that the divergence of *MIPS* genes happened after the divergence of monocotyledons and dicotyledons. Alignment of the DNA sequence of the gene-encoding plant-MIPS revealed remarkable evolutionary conservation. The presence of conserved sequences and conservative changes observed in a wide range of organisms indicates the central role that this enzyme plays in biological systems. MIPS catalyzes the synthesis of *myo*-inositol 1-phosphate, which is a precursor to compounds connected to essential cellular functions, such as phosphorus storage, signal transduction, actin remodelling, membrane trafficking, stress protection, hormonal homeostasis and cell-wall biosynthesis (Loewus and Murthy, 2000; Stevenson *et al.*, 2000; Downes *et al.*, 2005).

Genomic Southern blot suggests that several MIPS, MIPS-related genes or pseudogenes might be present in the five studied *Passiflora* species. However, only one copy of the cloned *PeMIPSI* gene was found in the genome of *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* and *P. coccinea*. Although several copies of the MIPS-encoding genes have been observed in plant genome, the exact copy number for each gene from MIPS family members has not been determined for most species. In rice, genomic Southern analysis suggested that a single gene encoding the *RINO1* gene was present in the genome

(Yoshida *et al.*, 1999). Seven sequences were found in maize (Larson and Raboy, 1999), two in *Arabidopsis* (Johnson and Sussex, 1995), two in common ice (Ishitani *et al.*, 1996) and at least four in soybean (Hegeman *et al.*, 2001). The multiple MIPS genes in crop plants may be used to attune differential MIPS expression to specific physiological functions.

Transcripts of the *PeMIPS1* were detected in ovules, pollen grains, developing seeds and leaves of plants cultivated in field conditions. However, no signal was observed in stems, petals or leaf gland. This demonstrated that the expression of the *PeMIPS1* gene is organ-specific and such differential regulation would coordinate inositol metabolism with cellular growth (Ishitani *et al.*, 1996; Majumder *et al.*, 1997). In soybean, steady-state RNA levels of the *GmMIPS1* gene were higher in developing seeds than in other tissues, including flowers, leaves, germinating cotyledons, and somatic embryos (Hegeman *et al.*, 2001). *In silico* northern analyses generated from Soybean EST database predict an expression pattern of four highly similar MIPS-coding sequences. ESTs from *GmMIPS3* were only observed in leaf and bud libraries, while ESTs from *GmMIPS1* were only observed in immature cotyledons (Hegeman *et al.*, 2001). In addition, data from 15 EST libraries showed that *GmMIPS1* is the seed preferred gene, although it is expressed in other tissue types while the *GmMIPS2* is expressed in many tissues but not in developing seeds (Hitz *et al.*, 2002). This suggested that the expression of distinct *MIPS* genes is spatially controlled by regulatory sequences. In *S. indicum* *SeMIPS1* transcription was observed in leaves, stem, root and developing seeds (Chun *et al.*, 2003). In rice, transcripts of an MIPS-encoding gene (*RINO1*) accumulated at high levels in developing seeds, but not in leaves, roots or flowers (Yoshida *et al.*, 1999). Our data suggested that the MIPS-encoding sequences might present a distinct pattern when compared to other plants. However, more

studies should be conducted to associate *MIPS* gene transcription with specific environmental conditions.

A marked peak in MIPS RNA level was observed nine days after pollination, showing that the gene is regulated at the transcriptional level during seed development. Similar results were observed in soybean. *GmMIPS* transcript was observed in cotyledons at the earliest developmental stages, with a peak in 2- to 4-mm seeds (Hegeman *et al.*, 2001). In contrast, no recognisable differences in levels of *SeMIPS1* gene transcription were found between developing stages of *S. indicum* seeds (Chun *et al.*, 2003).

Our results suggest that conversion of glucose-6-P to *myo*-inositol-1-phosphate occurs earlier in *P. edulis* seed development. This expression pattern of *PeMIPS1* may be correlated with the accumulation of phytate, which is a storage reserve of phosphorus in seeds (Loewus and Murthy, 2000). It has been assumed that MIPS is a key regulatory enzyme in the biosynthetic pathway of phytate (Yoshida *et al.*, 1999). However, we recently observed absence of seed development in transgenic soybean plants silencing the *GmMIPS1* gene (Nunes *et al.*, 2006). This suggests that MIPS expression during early stages of seed development is closely related to the essentiality of inositol biosynthesis for several biochemical pathways in plants (Downes *et al.*, 2005), rather than phytate accumulation. In this work all sequenced PCR-amplified fragments presented 100% identity with the cloned *PeMIPS1* gene. *P. edulis* may have other MIPS-coding genes, and sequences are highly similar; because of this and the fact that we have not used sequence-specific primers for RT-PCR analysis, we cannot definitively conclude that the *PeMIPS1* gene is the only MIPS-encoding gene expressed in the organs studied.

Plants are exposed to a wide range of abiotic and biotic stimuli for which effective, fitness-based responses must be applied. Both high and low temperatures are important

environmental signals for all living organisms; they are the most important environmental factors that limit geographical distribution, growth, development, and survival of many plant species. Most plants from temperate regions can increase tolerance to freezing temperatures by being exposed to low non-freezing temperatures, a process known as cold acclimation (Chinnusamy *et al.*, 2006). However, plants from tropical and subtropical origins are sensitive to chilling temperatures (0°C–10°C) and are assumed to be incapable of cold acclimation. RT-PCR analyses were carried out to analyse the effect of cold and heat stress on the transcript levels of *PeMIPSI*. Results revealed that *PeMIPSI* transcripts were upregulated, after a short period (8h) under cold stress (5°C), which decreased after 16h (Figure 4A). It has been shown that sugars and ABA have similar effects on MIPS gene transcriptional levels (Yoshida *et al.*, 2002). These molecules induced transcript accumulation of the MIPS-encoding gene (*RINO1*) in rice. mRNA accumulation revealed that the highest accumulation level occurred 2-4 h after initiation of the combined treatment and the signal declined thereafter (Yoshida *et al.*, 2002). In *M. crystallinum*, salinity stress was observed to induce fivefold the upregulation of *MIPS* mRNA expression and free inositol accumulation approximately tenfold (Ishitani *et al.*, 1996). Interestingly, our results were similar to those observed in *Citrus sinensis* submitted to herbivory from xylem-feeding leafhopper and to mechanical damage. Both treatments induced an MIPS transcript that peaked after 48 h of treatment and was only slightly increased after 96 h (Mozoruk *et al.*, 2006). These results agree with the documented fact that rapid changes in inositol phosphates have been observed in different plant systems with many different stimuli, including osmotic and cold shock, light and biotic elicitors (Perera *et al.*, 2006).

Many of the genes regulated by biotic and abiotic factors can also be induced by the phytohormone abscisic acid (ABA) or by osmotic stress treatment (Ishitani *et al.*, 1997;

Seki *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Indeed, high and low non-freezing temperatures and osmotic stresses appear to have several features in common. Low temperatures can lead to dehydration stress by impairing water absorption by the roots and water transport to the shoots (Levitt, 1980). In addition, ABA is known to play an important role in cold acclimation (Li *et al.*, 2006). Plants adapt to ambient temperature by adjusting membrane fluidity, metabolism, and gene expression profiles (Levitt, 1980; Murata and Los, 1997; Thomashow, 1999). In this context, MIPS catalyzes the first-committed and rate-limiting step in the biosynthesis of compounds involved in the tolerance of abiotic stress, such as D-pinitol and D-ononitol, D-glucuronate used in the production of cell wall components, polyunsaturated phospholipids, glycoproteins, gums, and mucilage (Miquel *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1998; Bray *et al.*, 2000; Rathinasabapathi, 2000).

Under continuous light conditions *PeMIPS1* transcripts were upregulated in most temperatures tested, except at 37°C (Figure 4B). In potato, it was observed that light drastically increased *StIPS-1* (an MIPS-encoding gene) transcript level in leaves (Keller *et al.*, 1998). Earlier studies revealed the presence of algal and higher plant chloroplastic inositol synthases that exhibit enhanced activity during growth under light conditions (Adhikari *et al.*, 1987; RayChaudhury *et al.*, 1997). In addition, two forms of enzymatically active MIPS have been detected in the chloroplasts of *Oryza sativa*. The 80 kDa subunit is the predominant species in dark-grown etioplasts while light/dark-grown chloroplasts accumulate the 60 kDa subunit. It appears that a light- and salt-mediated interplay of protease and kinase system regulates the processing and activation of the chloroplast inositol synthases in higher plants (Hait *et al.*, 2002). There are few studies on the possible importance of inositol biosynthesis on light-dependent pathways. A plastid-located pathway from inositols to D-glucuronate and further to L-ascorbate has been postulated

(Loewus, 1988). Apparently, L-ascorbate supports chloroplast integrity under stress conditions which require protection against radical oxygen species. Nelson *et al* (1998) suggested that *myo*-inositol acts to facilitate sodium sequestration, protect photosynthesis and sustain membrane biosynthesis. It seems that in the common ice, photosynthesis can simultaneously control root growth via inositol supply and osmotic stress protection via ononitol and pinitol availability in the roots. The sequence analysis of the predicted PeMIPS1 indicated that the N-terminal region contains no signal, chloroplast transit or mitochondrial targeting peptides. It suggests that *PeMIPS1* encodes a cytosolic rather than an organelle-addressed MIPS protein. However, the absence of a convincing transit peptide in PeMIPS1 does not preclude its targeting to a plastidic site for inositol synthesis. A MIPS from *M. crystallinum* that does not contain a transit peptide for chloroplast import presented enhanced activity only in chloroplasts from light-grown, salt-tolerant rice plants (RayChaudhuri and Majumder, 1996). Moreover, experimental data have suggested that a MIPS enzyme from *Phaseolus vulgaris*, which does not have a recognizable transit peptide, is also present in plasma membranes, plastids, mitochondria, endoplasmic reticule, nuclei, and cell walls (Lackey *et al.*, 2003). Additionally, the program PSORT (Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences) predicted a conserved transmembrane motif (CEDSLLAAPIILDLVLLAELSTR), located approximately 68 amino acids from the carboxy terminus in both *Phaseolus vulgaris* and *P. edulis* MIPS.

CONCLUSION

The experimental data presented here suggest important roles for MIPS not only in basic metabolism, but also in the establishment of developmental programs and during the response of plants to environmental changes. Results demonstrated that a MIPS-encoding gene cloned from *P. edulis*, called *PeMIPS1*, is preferentially expressed in leaves, pollen grains, ovules and seeds nine days after pollination. The *PeMIPS1* is differentially regulated during cold and heat stress, presenting a light-response pattern, indicating that the extension of the inositol pathway is an important aspect for environmental stress response. There is correlation of these results with ecological adaptation of passion fruit, a typical species adapted to tropical and subtropical environment that endures winter chills for a short period without injury, but does not tolerate severe or prolonged freezing. Our knowledge of stress proteins/genes is still far from complete, and there are lacunae with respect to behaviour in tropical plant species. Consequently, other stress-responsive genes should be studied, cloned and characterised. Additionally, studies are required for localization of *PeMIPS1* in subcellular compartments of distinct plant tissues, as well as *MIPS* silencing in transgenic plants, to develop a greater understanding of its role during seed development.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Marcelo Fidelis Braga (Embrapa Cerrados, Brazil) and Fundação Zoobotânica do Distrito Federal (Brasília, Brazil) for providing some of the samples used in

this study, and Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (Universidade Federal do Ceará, Brazil) for critical reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Abu-Abied M, Holland D. 1994.** The gene *c-ino1* from *Citrus paradisi* is highly homologous to *tur1* and *ino1* from yeast and *Spirodela* encoding for *myo*-inositol phosphate synthase. *Plant Physiology* **106**: 1689.
- Adhikari J, Majumder AL, Bhaduri TJ, DasGupta S, Majumder AL. 1987.** Chloroplast as a locale of L-*myo*-inositol 1-phosphate synthase. *Plant Physiology* **85**: 611-614.
- Bohnert HJ, Sheveleva E. 1998.** Plant stress adaptations – making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 267-274.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. 2000.** Response to abiotic stress. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1158–1203.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K. 2006.** Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* **126**: 52–61.
- Chun JA, Jin UH, Lee JW, Yi YB, Hyung NI, Kang MH, Pyee JH, Suh MC, Kang CW, Seo HY, Lee SW, Chung CH. 2003.** Isolation and characterization of a *myo*-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta* **216**: 874-880.

- Downes CP, Gray A, Lucocq JM. 2005.** Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends in Cell Biology* **15**: 259-268.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. 2000.** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**: 1005-1016.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. 1999.** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**: 978-984.
- Hait NC, RayChaudhury A, Das A, Bhattacharyya S, Majumder AL. 2002.** Processing and activation of chloroplast L-*myo*-inositol 1-phosphate synthase from *Oryza sativa* requires signals from both light and salt. *Plant Science* **162**: 559-568.
- Hara K, Yagi M, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2000.** Screening of wound-responsive genes identifies an immediate-early expressed gene encoding a highly charged protein in mechanically wounded tobacco plants. *Plant and Cell Physiology* **41**: 684-691.
- Hegeman CE, Good LL, Grabau EA. 2001.** Expression of D-*myo*-Inositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **125**: 1941–1948.
- Hitz WD, Carlson TJ, Kerr PS, Sebastian SA. 2002.** Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiology* **128**: 650-660.
- Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ. 1996.** Coordinate transcriptional induction of *myo*-inositol metabolism during environmental stress. *Plant Journal* **9**: 537-548.

- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhul J-k. 1997.** Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* **9**: 1935-1949.
- Johnson MD, Sussex IM. 1995.** 1-L-*myo*-inositol 1-phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **107**: 613-619.
- Johnson MD. 1994.** The *Arabidopsis thaliana myo*-inositol 1-phosphate synthase (EC5.5.1.4). *Plant Physiology* **105**: 1023-1024.
- Keller R, Brearley CA, Trethewey RN, Müller-Röber B. 1998.** Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-*myo*-inositol 3-phosphate synthase. *Plant Journal* **16**: 403-410.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Knight RJ, Sauls JW. 2005.** The Passion Fruit. University of Florida IFAS Extension HS60.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Lackey KH, Pope PM, Johnson MD. 2003.** Expression of 1L-*myo*-inositol-1-Phosphate Synthase in Organelles. *Plant Physiology* **132**: 2240-2247.
- Larson SR, Raboy V. 1999.** Linkage mapping of maize and barley *myo*-inositol 1-phosphate synthase DNA sequences: correspondence with a low phytic acid mutation. *Theoretical and Applied Genetics* **99**: 27-36.

- Levitt J. 1980.** *Responses of plants to environmental stress. Chilling, Freezing and High temperature stress*, Vol. 1. *Academic Press*, New York, NY: 137-141.
- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G., Bevan MW. 2006.** Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine. *Genome Research* **16**: 414- 427.
- Loewus FA, Loewus MW. 1983.** *myo*-Inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **34**: 137-161.
- Loewus FA, Murthy PPN. 2000.** *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* **150**: 1-19.
- Loewus FA. 1988.** Ascorbic acid and its metabolic products. In: Preiss, J, ed. *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, 85-107.
- Loewus FA. 1990.** Inositol biosynthesis. In: Morré DJ, WF, Loewus FA, eds. *Inositol Metabolism in Plant*. New York: Wiley-Liss, 13-19.
- Majumder AL, Johnson MD, Henry SA. 1997.** L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1348**: 245-256.
- Miquel M, James D, Dooner JH, Browse J. 1993.** *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 6208-6212.
- Mozoruk J, Hunnicutt LE, Cave RD, Hunter WB, Bausher MG. 2006.** Profiling transcriptional changes in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck challenged by herbivory from the xylem-feeding leafhopper *Homalodisca coagulata* (Say) by cDNA macroarray analysis. *Plant Science* **170**: 1068-1080.

- Murata N, Los DA. 1997.** Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology* **115**: 875-879.
- Nelson DE, Rammesmayer G, Bohnert HJ. 1998.** Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *Plant Cell* **10**: 753-764.
- Nunes ACS, Vianna GR, Cuneo F, Amaya-Farfán J, Capdeville G, Rech EL, Aragao FJL. 2006.** RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* **224**: 125-132.
- Odom AR, Stahlberg A, Wentz SR, York JD. 2000.** A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* **287**: 2026-2029.
- Perera I Y, Hung CY, Brady S, Muday GK, Boss WF. 2006.** A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. *Plant Physiology* **140**: 746-760.
- Raboy V. 2002.** Progress in breeding low phytate crops. *Journal of Nutrition* **132**: 503-505.
- Rathinasabapathi B. 2000.** Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany* **86**: 709-716.
- RayChaudhuri A, Majumder AL. 1996.** Salinity-induced enhancement of l-myoinositol 1-phosphate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell and Environment* **19**: 1437-1442.
- RayChaudhuri A, Hait NC, DasGupta S, Bhaduri TJ, Deb R, Majumder AL. 1997.** L-myoinositol 1-phosphate synthase from plant sources: characteristics of the chloroplastic and cytosolic enzymes. *Plant Physiology* **115**: 727-736.

- Saitou N, Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook J, Russell DW. 2001.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2002.** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **31**: 279-292.
- Shen X, Xiao H, Ranallo R, Wu WH, Wu C. 2003.** Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science* **299**: 112-114.
- Shi J, Wang H, Hazebroek J, Ertl DE, Harp T. 2005.** The maize low-phytic acid 3 encodes a *myo*-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *Plant Journal* **42**: 708-719.
- Smart CC, Fleming AJ. 1993.** A plant gene with homology to D-*myo*-inositol-3-phosphate synthase is rapidly and spatially upregulated during an abscisic-acid-induced morphogenic response in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Journal* **4**: 279-293.
- Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S, Boss WF. 2000.** Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Science* **5**: 252-258.
- Thomashow MF. 1999.** Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 571-599.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- Yoshida KT, Fujiwara T, Naito S. 2002.** The synergistic effects of sugar and abscisic acid on *myo*-inositol-1-phosphate synthase expression. *Physiologia Plantarum* **114**: 581–587.
- Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchi-Fukuoka R, Naito S. 1999.** Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of *myo*-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiology* **119**: 65-72.

Figure Legends

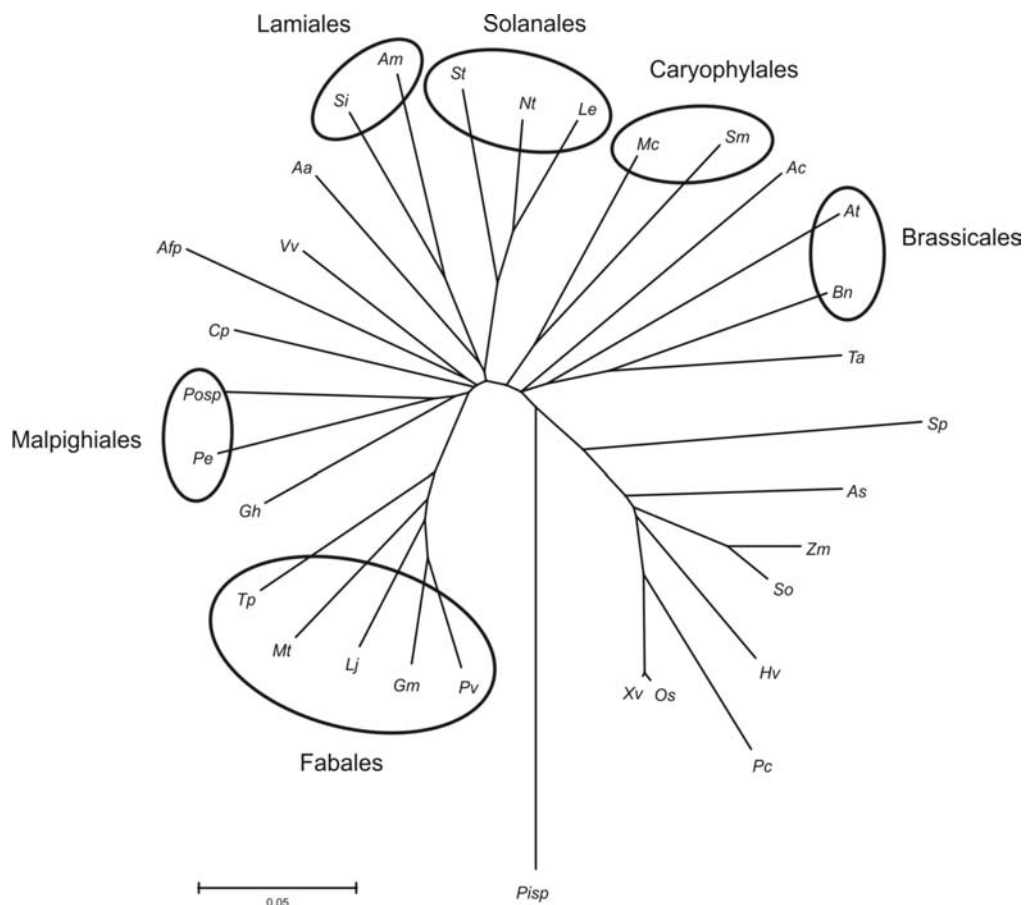


FIG. 1. Bootstrap consensus phylogenetic tree of *myo*-inositol-1-phosphate synthase (*MIPS*) genes from plant species. The tree includes sequences of *MIPS* available in GenBank and TIGR databases. Abbreviation of the species and accession number of each sequence are: Aa: *Actinidia arguta* (AY005128); Ac: *Allium cepa* (TC248); Afp: *Aquilegia formosa x pubescens* (TC14836); At: *Arabidopsis thaliana* (U04876); As: *Avena sativa* (AB059557); Am: *Avicennia marina* (AY028259); Bn: *Brassica napus* (U66307); Cp: *Citrus paradise* (Z32632); Gm: *Glycine max* (AY382834); Gh: *Gorssypium hirsutum* (TC27410); Hv: *Hordeum vulgare* (AF056325); Lj: *Lotus japonicus* (TC8275); Le:

Lycopersicon esculentum (TC154132); Mt: *Medicago trunculata* (TC93972); Mc: *Mesembryanthemum crystallinum* (U32511); Nt: *Nicotiana tabacum* (AB059557); Os: *Oryza sativa* (AB012107); Pv: *Phaseolus vulgaris* (AM048843); Pisp: *Pinus sp.* (TC64990); Posp: *Populus sp.* (TC19238); Pc: *Porteresia coarctata* (AF412340); So: *Saccharum officinarum* (TC65413); Si: *Sesamum indicum* (AF284065); St: *Solanum tuberosum* (TC112573); Sp: *Spirodela polyrrhiza* (Z11693); Sm: *Sueda maritima* (AF433879); Tp: *Tripolium pratense* (AB236831); Ta: *Triticum aestivum* (AF120148); Vv: *Vitis vinifera* (TC45187); Xv: *Xerophyta viscosa* (AY323824); Zm: *Zea mays* (AF56326).
Bootstrap values >50% are displayed on the nodes.

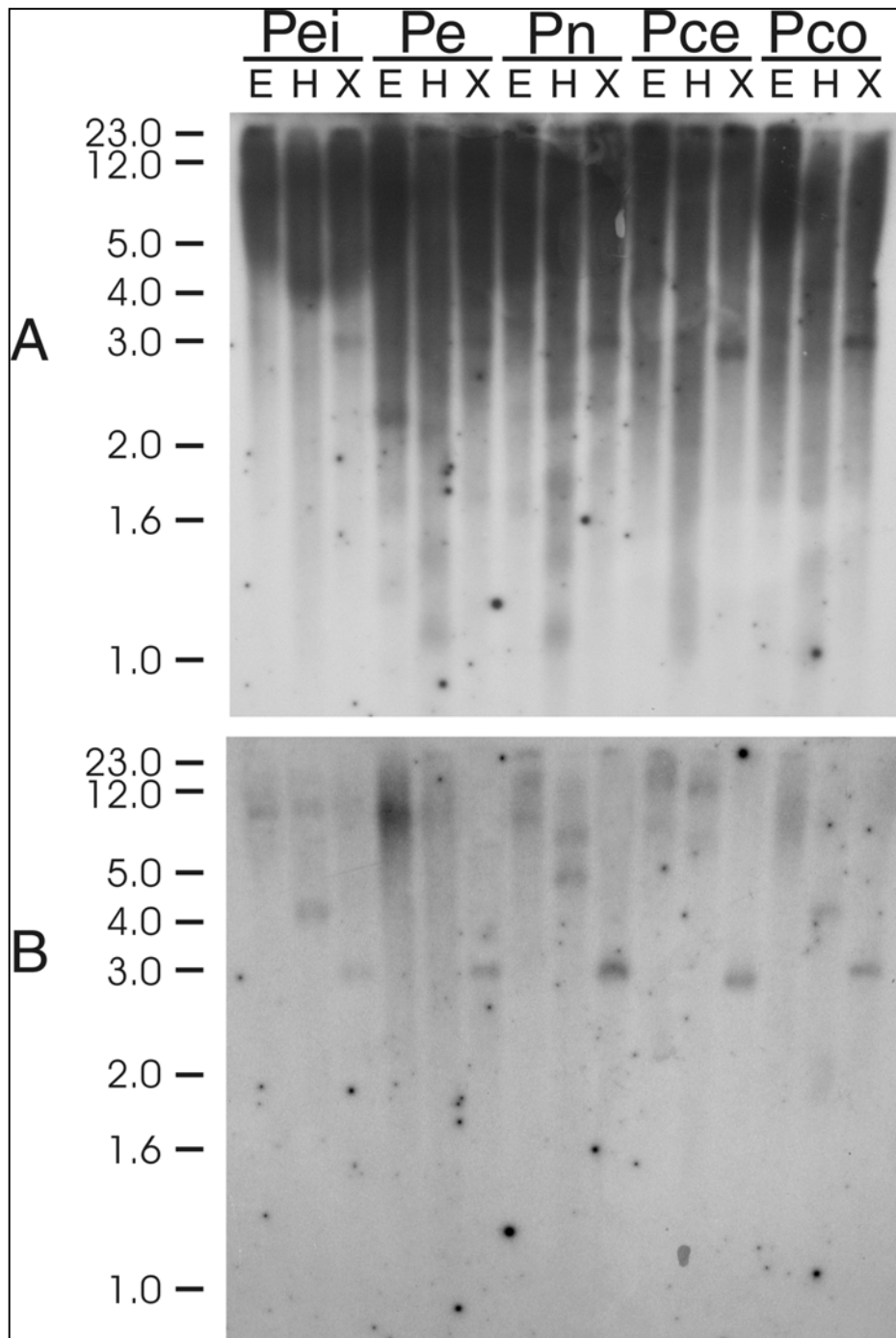


FIG. 2. Southern blot analysis of *MIPS* gene in the genome of *Passiflora* species. Genome of *P. edulis* (Pe), *P. eichleriana* (Pei), *P. caerulea* (Pca), *P. nitida* (Pn) and *P. coccinea* (Pco) were digested with *Eco*RI (E), *Hind*III (H) and *Xho*I (X). Membrane was probed with

the 693 bp internal fragment from *PeMIPSI* gene at low- (A) and high-stringency of washing conditions.

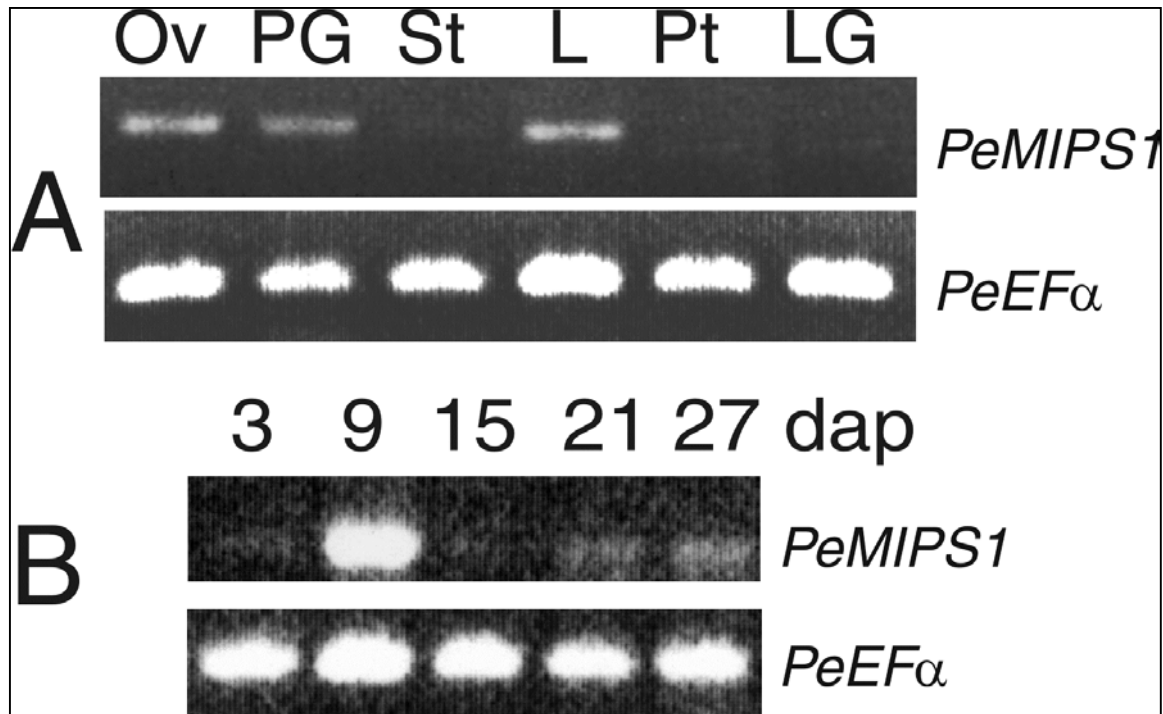


FIG. 3. Differential transcription of the *PeMIPSI* gene from passion fruit (*P. edulis*) in different organs (A) and developing seeds (B) 3, 9, 15, 21 and 27 days after pollination (dap). Ov: ovules, PG: pollen grains, St: stem, L: leaves, Pt: petals, LG: leaf gland. The upper bands are consistent with the expected fragment amplified from the *PeMIPSI* gene and the lower band corresponds to transcripts from the *PeEFα* gene (elongation factor EF-1 α) (internal control).

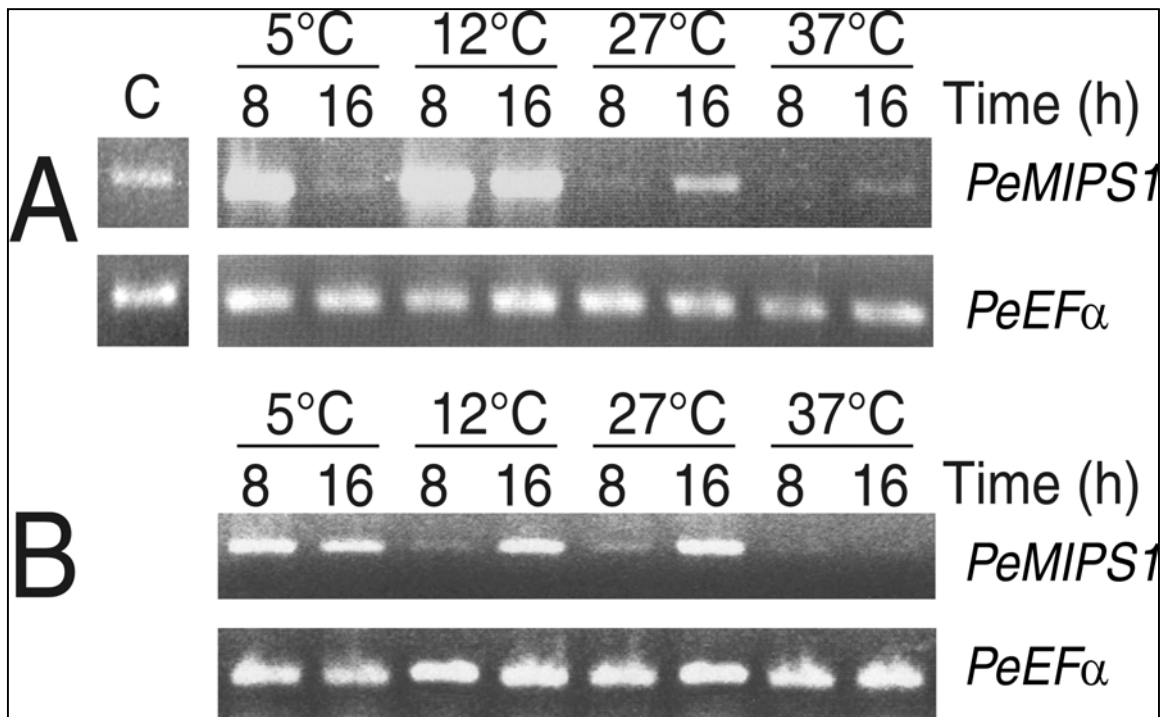


FIG. 4. Effects of temperature and light on transcription of the *PeMIPS1* gene in leaves of passion fruit plants eight weeks after germination. Plants were exposed for 8 and 16 h at different temperatures under dark (A) and continuous light intensity of $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (B) conditions. C is a plant before treatment (maintained at room temperature and light intensity of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The upper bands are consistent with the expected fragment amplified from the *PeMIPS1* gene and the lower band corresponds to transcripts from the *PeEFα* gene (elongation factor EF-1α) (internal control).