

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS GENES DA VIA DE BIOSÍNTESE DE
TIAMINA NA EVOLUÇÃO DE PLANTAS**

Leila Lourenço Furtado

Unai
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS GENES DA VIA DE BIOSÍNTESE DE
TIAMINA NA EVOLUÇÃO DE PLANTAS**

Leila Lourenço Furtado

Orientador: Prof. Dr. Anderson Alvarenga Pereira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Micheline Carvalho Silva

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências Agrárias,
como parte dos requisitos para a conclusão
do curso.

Unai
2017

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS GENES DA VIA DE BIOSÍNTESE DE
TIAMINA NA EVOLUÇÃO DE PLANTAS**

Leila Lourenço Furtado

Orientador: Prof. Dr. Anderson Alvarenga Pereira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Micheline Carvalho Silva

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências Agrárias,
como parte dos requisitos para a conclusão
do curso.

Aprovado em 29 / 08 / 2017

Prof. Dr. Wellington Ferreira Campos- UFVJM/ICA

Prof. Dr. Eric Koiti Okiyama Hattori– UFVJM/ICA

Prof^a. Dr^a. Micheline Carvalho Silva – UFVJM/ICA

Artigo

Artigo apresentado segundo as normas da Revista Brasileira de Ciências

Agrárias

Relações filogenéticas dos genes da via de biossíntese de tiamina na evolução de plantas

Leila Lourenço Furtado^{1,2}, Wellington Ferreira Campos¹, Micheline Carvalho Silva¹,
Anderson Alvarenga Peixoto¹

¹Universidade Federal dos Vales dos Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Instituto de Ciências Agrárias,
Campus Unaí-MG. Avenida Vereador João Narciso, 1380. Cachoeira. CEP 38610-000 ²Autor para
correspondência: e-mail leilafurtado24@hotmail.com

Resumo

Por meio das análises da biologia molecular, tentamos definir as relações entre os organismos e inferir uma ordem evolutiva entre as espécies, através de características genômicas das espécies. A Vitamina B1 (Tiamina) é um micronutriente requerido por todos os organismos. Em face da importância da referida coenzima, este trabalho analisou os genes da via da biossíntese da tiamina na evolução de plantas terrestres, usando ferramentas de análises filogenéticas. As sequências de proteínas dos genes *THII*, *THI*, *THIC* e *TPK* foram alinhadas e se determinaram as relações filogenéticas. O gene *THII* não conseguiu demonstrar uma topologia explicativa, ao passo que os demais apresentaram grande semelhança da topologia demonstrada pelo APG IV (2016). O gene *TPK* se mostrou o melhor para efetivar a separação dos grandes grupos (criptógamas, angiospermas e gimnospermas), enquanto que o gene *THIC* conseguiu, dentro das angiospermas, melhor separar as monocotiledôneas e as eudicotiledônias. Assim, avaliando-se as variações, em nível proteico, dos genes em questão, pôde-se refletir a evolução dos grandes grupos de plantas, e até mesmo as proximidades entre espécies, famílias e ordens, mesmo não se avaliando as variações dos nucleotídeos.

Palavras-chave: *THIC*; *THI*; *TPK*; *TH*; Angiospermas

Abstract

Through the analysis of molecular biology, we try to define the relationships between organisms and infer an evolutionary order among species, through the genomic characteristics of the species. Vitamin B1 (Thiamine) is a micronutrient required by all organisms. In view of the importance of this coenzyme, this work analyzed the genes of the thiamine biosynthesis pathway in the evolution of terrestrial plants, using phylogenetic analysis tools. The protein sequences of the TH11, TH1, TH1 and THK genes were aligned and the phylogenetic relationships determined. The TH11 gene was not able to demonstrate an explanatory topology, whereas the others presented a high similarity of the topology demonstrated by the APG IV (2016). The TPK gene was shown to be the best for the separation of the large groups (cryptogams, angiosperms and gymnosperms), while the THIC gene was able to separate the monocotyledons and eudicotyledons within the angiosperms. Thus, by evaluating the variations at the protein level of the genes in question, it was possible to reflect the evolution of the large groups of plants, and even the proximity between species, families and orders, not even evaluating nucleotide variations.

Keywords: THIC; TH11; TPK; TH1; Angiosperms

1. INTRODUÇÃO

1.1. FILOGENIA DOS GRUPOS VEGETAIS

Partindo-se do princípio de que todos os organismos e suas características são oriundos de evolução, é possível determinar, com análises comparativas, relações de parentesco e uma ordem evolutiva entre os seres vivos. Para tanto, os estudos da biologia comparativa e sistemática classificam as espécies para se obter essa compreensão (Judd et al., 2009).

As primeiras classificações foram baseadas em características morfológicas ambientais, relacionando, assim, ancestrais e descendentes e determinando uma ordem das espécies vegetais conhecidas (Judd et al., 2009).

A teoria mais aceita da evolução das plantas é a das mudanças morfológicas que permitiram que as espécies saíssem do meio aquático e se reproduzissem sem ter a água como dispersante (Evert e Eichhorn, 2014). Assim, as plantas são ordenadas em criptógamas, formadas por plantas avasculares e vasculares sem sementes, seguidas pelas vasculares com sementes, que são as gimnospermas, com sementes nuas, e as angiospermas, com sementes cobertas (Evert e Eichhorn, 2014).

Com o avanço da biologia molecular, as análises tornaram-se cada vez mais detalhadas, e as relações entre os organismos foram definidas não só por meio de caracteres visuais como também das características genômicas das espécies. Dessa maneira, tornou-se exequível a comparação de organismos morfolologicamente distintos (Evert e Eichhorn, 2014).

A filogenia molecular, como ferramenta para classificação, foi utilizada pela primeira vez em angiospermas em 1998, ocasião em que se determinou o grupo das monocotiledôneas como monofilético e o grupo das dicotiledôneas como parafilético, ocorrendo a necessidade da divisão desse último grupo e, por consequência, da criação das eudicotiledôneas (APG, 1998). Desde então, o uso de dados moleculares tem sido primordial para os trabalhos filogenéticos.

Dentro do maior grupo de plantas, as angiospermas, os grandes grupos assumem uma topologia específica. As plantas basais ocupam os três primeiros ramos, com Amborellales, Nymphaeales e Austrobaileyales. O clado seguinte contém as Magnoliids, Chloranthales, Monocotiledôneas e Eudicotiledôneas (APG, 2016).

Para as análises moleculares, é necessário escolher marcadores genéticos, que nada mais são que um gene encontrado nos indivíduos de interesse, que expresse não só a evolução biológica como também a relação de evolução entre os organismos.

Esses podem ser genes de cloroplastos, mitocondriais ou nucleares. O primeiro gene de cloroplasto escolhido para a classificação de plantas foi o gene *rbcl*, que produz uma subunidade da enzima Rubisco. Entretanto, esse gene se mostrou bastante conservado (Judd et al., 2009) e tem sido pouco utilizado. Atualmente, os genes de cloroplasto que mais atendem às relações filogenéticas são os genes *ndhF*, *rpoA*, *RpoC2* e *atpB*. Os genes mitocondriais mais utilizados na filogenia de plantas são o *atp1*, *atpA* e *matR*, e os marcadores nucleares, que são os genes de RNA ribossomal, conhecidos como os marcadores da região ITS (Internal Transcribed Spacer) (Judd et al., 2009).

1.2. OS GENES DA VIA DE BIOSÍNTESE DA TIAMINA

A Vitamina B1 (Tiamina) é uma coenzima requerida por todos os organismos. Sua forma ativa, a tiamina-difosfato (TDP), é um cofator essencial para enzimas de vias metabólicas-chave, tais como glicólise, síntese de Acetil-CoA, ciclo de Krebs, fermentação alcoólica, via das pentoses-fosfato, ciclo de Calvin, via de aminoácido de cadeia ramificada e biossíntese de pigmentos em organismos fotossintetizantes (Müller et al., 2009; Goyer, 2010). Além disso, a tiamina e a TDP podem desempenhar um importante papel em respostas contra estresses abiótico e biótico em plantas (Ribeiro et al., 2005; Rapala-Kozik et al., 2008, 2011, 2012; Tunc-Ozdemir et al., 2009; Boubakri et al., 2013).

Bactérias, fungos e plantas podem biossintetizar tiamina. Por outro lado, os animais dependem de uma fonte de tiamina na sua dieta (Leonardi e Roach, 2004; Nosaka, 2006; Jurgenson et al., 2009; Goyer, 2010). Os vegetais são a principal fonte de vitamina B₁ para a dieta animal (Fitzpatrick et al., 2012). Ressalte-se que a depleção dos índices de aquisição dessa vitamina pode causar a redução da atividade das enzimas dependentes de TDP, ocasionando diferentes quadros clínicos, tais como a síndrome de Wernicke-Korsakoff e a doença de beribéri (Kril, 1996).

A tiamina é uma molécula composta pelos heterociclos pirimidina e tiazole, unidos por uma ponte de metileno. Seu grupo hidroxila pode ser fosforilado para gerar tiamina-monofosfato (TMP), tiamina-difosfato (TDP) e tiamina-trifosfato (TTP) (Goyer, 2010; Gerds et al., 2012). Essa via apresenta duas ramificações que culminam na produção de dois heterociclos, 4-metil-5-(2-hidroxi-etil)-tiazole fosfato (HET-P) e 4-amino-2-metil-

5-hidroximetilpirimidina difosfato (HMP-PP) (Goyer, 2010; Rapala-Kozik, 2011; Gerdes et al., 2012).

Em eucariotos, o estudo dessa via tem sido conduzido, principalmente, em *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Kowalska e Kozik, 2008; Jurgenson et al., 2009; Goyer, 2010). Já foram identificados pelo menos seis genes da via de biossíntese de tiamina nos vegetais (Goyer, 2010; Gerds et al., 2012; Bettendorff e Wins, 2013).

O gene *THII* foi caracterizado em *Zea mays* L. (Belanger et al., 1995), *Arabidopsis thaliana* (Machado et al., 1996) e *Oryza sativa* L. (Wang et al., 2006). O gene *THII* foi detectado no cloroplasto e na mitocôndria de *A. thaliana* e é responsável pela produção de tiazole, precursor da tiamina (Chatterjee et al., 2011).

Os genes *THIC* e *THI* foram caracterizados em *A. thaliana* e estão localizados no estroma dos cloroplastos (Raschke et al., 2007; Kong et al., 2008). A fosfometilpirimidina sintase (gene *THIC*) converte 5-aminoimidazole ribonucleotídeo (AIR) em HMP-P. Em seguida, HMP-P é fosforilado por uma proteína bifuncional, gene *THI*, resultando em HMP-PP (Ajjawi et al., 2007; Rapala-Kozik et al., 2007).

A tiamina pirofosfoquinase, gene *TPK*, está localizada no citosol de *A. thaliana* e catalisa a pirofosforilação de tiamina para gerar TDP (Ajjawi et al., 2007).

Devido a importância dos genes da via da biossíntese da tiamina este trabalho visa analisar a evolução de plantas, usando ferramentas de análises filogenéticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As sequências de proteínas dos genes *THII*, *THI*, *THIC* e *TPK* presentes no organismo *A. thaliana* foram utilizadas para a criação do banco de dados, usando o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990) no banco de dados genômicos UniProt (UniProt, 2014), com o código de acesso de cada gene mostrado na Tabela 1.

Para seleção das sequências, foram usados os seguintes parâmetros: Target database Uniref100 com E-Threshold 0,01 e matriz Blosun-62. Foram consideradas apenas as sequências com identidade maior que 40%, bem como as sequências de plantas terrestres; as demais foram descartadas. Foram utilizadas 98 espécies, sendo duas criptógamas, quatro gimnospermas e o restante, angiospermas, contemplando os grupos informais Fabids, Lamids e Malvids, das eudicotiledôneas, e Commelinids, das monocotiledôneas, contidos no APG IV (2016).

Para o alinhamento, usou-se o software *Bioedit sequence alignment* editor (Tippmann, 2004), com a ferramenta ClustalW Multiple alignment (Thompson et al., 1994) com *bootstraps* 1000, e os programas Muscle (Edgar, 2004) e Mafft (Katoh et al., 2002), disponíveis nos sites <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> e <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>, respectivamente. Foram geradas árvores das sequências de proteínas *TH1*, *TH11*, *TH1C* e *TPK*, separadamente, nos três algoritmos de alinhamentos.

O software Molecular Evolutionly Genetics Analysis (MEGA) v. 6.06 (Tamura et al., 2013) foi usado para determinar as relações filogenéticas entre as sequências alinhadas do banco de dados, utilizando-se o teste Neighbor-joining Tree, com *bootstrap* method 1000. Após a obtenção das árvores e a constatação dos táxons duplicados, as sequências foram filtradas de forma que permanecesse somente um exemplar de cada espécie, tendo como parâmetro comparativo o maior valor de identidade.

Os códigos de todas as espécies apresentadas nas árvores estão no Anexo 1. São considerados valores de *bootstrap* baixo os inferiores a 50%; médio, os de 50% a 75%, e alto, os superiores a 75%. Os valores de bootstrap inferiores a 50% não foram mostrados nas árvores.

Tabela 1: Códigos de acesso do Uniprot

Gene	Nº de Acesso Uniprot
<i>TH1</i>	Q5M731
<i>TH11</i>	Q38814
<i>TH1C</i>	082392
<i>TPK</i>	Q8LBL1

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As topologias das árvores não apresentaram diferenças que expressassem mudanças relevantes nas relações filogenéticas, conforme igualmente constatado por Edgar (2004), que, avaliando os programas de alinhamento citados, concluiu que estes apresentam particularidades que só revelam diferenças de execução quando examinados em grandes quantidades de avaliações.

A árvore gerada a partir das sequências proteicas *TH11* não expressou uma topologia explicativa (Anexo 2), com clados sustentados por baixo *bootstrap*. Assim, a

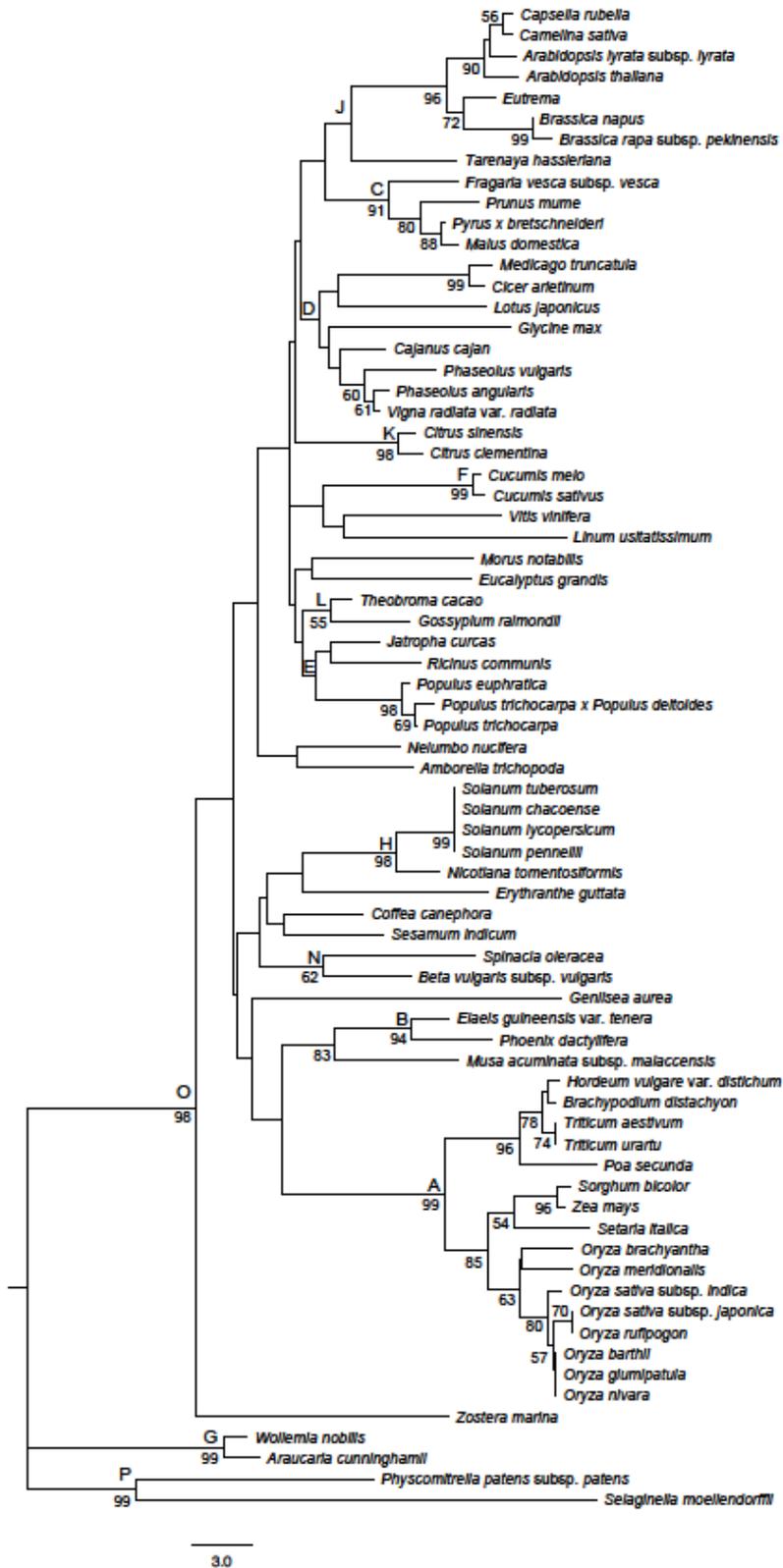


Figura 2: Árvore filogenética com base nas sequências proteicas *THIC*, utilizando o software MEGA 6, através do algoritmo Neighbor-joining Tree e *bootstrap* de 1000 replicações. A= Poales, B=Arecales, C=Rosales, D=Fabales, E= Malpighiales, F=Cucurbitales, G=Pinales (Gminospermas), H=Solanales, J= Brassicales, K=Sapindales, L= Malvales, N=Caryophyllales, O= Angiosperma e P=Criptógamas

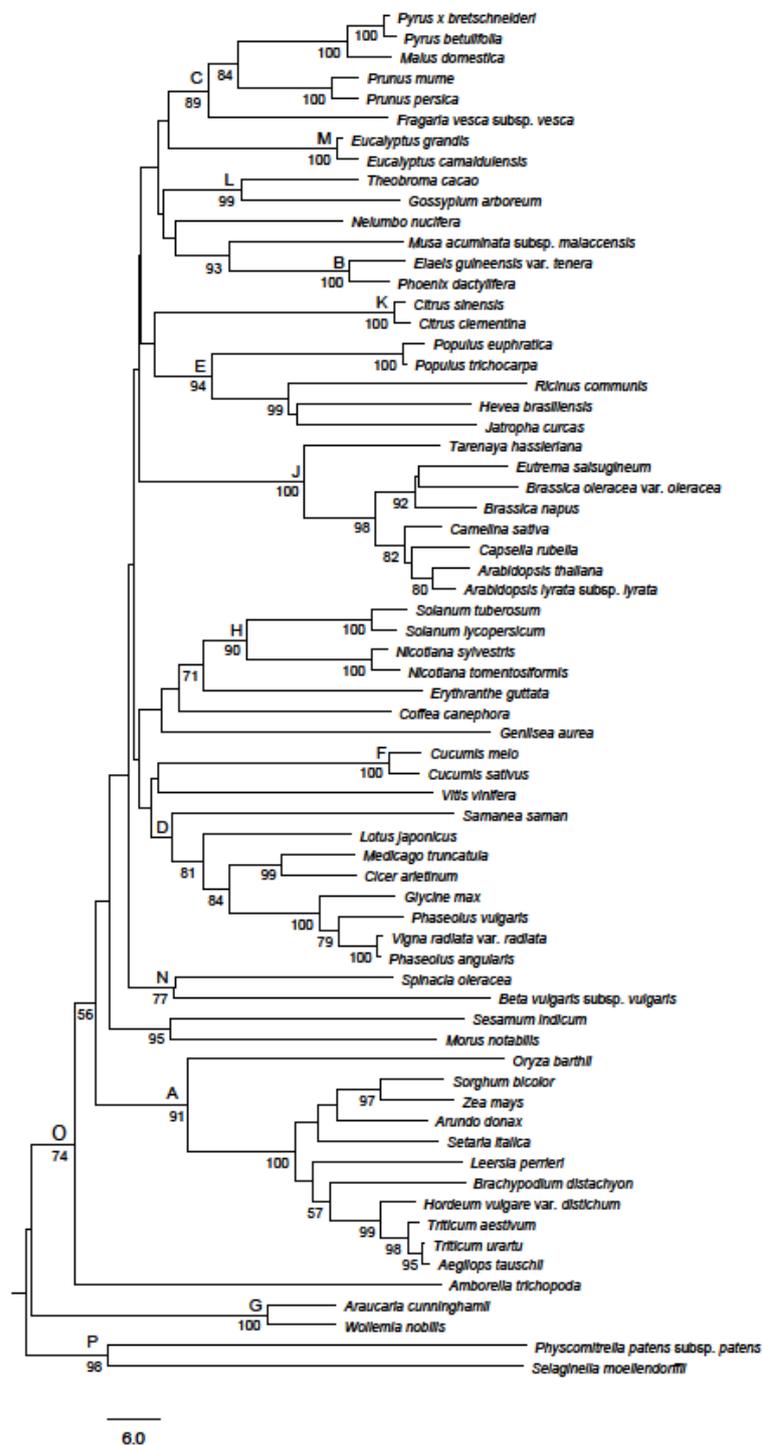


Figura 3: Árvore filogenética com base nas sequências proteicas *THIC*, utilizando o software MEGA 6, através do algoritmo Neighbor-joining Tree e *bootstrap* de 1000 replicações. A= Poales, B=Arecales, C=Rosales, D=Fabales, E= Malpighiales, F=Cucurbitales, G=Pinales (Gminospermas), H=Solanales, J= Brassicales, K=Sapindales, L= Malvales, M=Caryophyllales , N=Caryophyllales, O= Angiosperma e P=Criptógamas

Os grandes grupos – como briófitas e pteridófitas (criptógamas), gimnospermas e angiospermas (ramos P, G e O respectivamente) – foram bem posicionados, mas a relação entre eles, não. Na sequência proteica *THI*, as gimnospermas são mais basais (*bootstrap* de 77%) que as criptógamas, no entanto, ambas basais às angiospermas (Fig. 1). Na sequência proteica *THIC*, observou-se uma politomia, não sendo possível afirmar qual o grupo mais basal, se criptógamas ou gimnospermas, mas ainda assim se apresentaram como ancestrais das angiospermas (Fig. 2). Na sequência proteica *TPK*, as criptógamas, gimnospermas e angiospermas ficaram separadas (Fig. 3), conforme evolução dos grupos nos filós de plantas (Evert e Eichhorn, 2014).

Dentro das angiospermas, a espécie *Amborella trichopoda* Baill se mostrou basal a todas as angiospermas (Fig. 1, 2, 3), assim como demonstrada pelo APG IV (2016). O ramo foi assegurado por médios *bootstraps*, 74% na sequência proteica *TPK* (Fig. 3) e baixo na sequência proteica *THI* (Fig. 1). Contudo, a sequência proteica *THIC*, *A. trichopoda* ficou como espécie irmã de *Nelumbo nucifera* Gaertn., no entanto, com baixo *bootstrap* (Fig. 2).

As relações de grupos informais dentro das angiospermas, identificados no APG IV (2016), Fabids, Malvids, Commelinids e Lamiids não estão resolvidas em nenhuma das árvores apresentadas neste trabalho. No entanto, os grupos formais como ordens estão bem delimitados (Fig. 1, 2 3).

Dentro de Fabids, as ordens Rosales (ramo C) e Fabales (ramo D) são monofiléticas em as sequências proteicas (Fig. 1, 2, 3). Os membros da ordem Rosales se agruparam com alto suporte, 89% e 91% nas sequências proteicas *TPK* e *THIC*, respectivamente (Fig. 2, 3). Na sequência proteica *THI*, o baixo *bootstrap* foi influenciado pela inclusão do gênero *Morus* (Rosales) (Fig. 1). O gênero *Morus* ficou agrupado com a espécie *Sesamum indicum* L. (ordem Lamiales) na sequência proteica *TPK* (Fig. 3), com alto *bootstrap* (95%) e, *Eucalyptus grandis* W. Hill na sequência proteica *THIC*, com baixo *bootstrap* (Fig. 2). Malpighiales (ramo E) é monofilética com baixo *bootstrap* na sequência proteica *THIC*, alto em *TPK* (94%) e médio em *THI* (64%), como também Cucurbitales (ramo F) nas sequências proteicas *THI*, *THIC* e *TPK* (99%, 99% e 100%) (Fig. 1, 2, 3). As Fabales ficaram agrupadas com *bootstrap* alto (98%) na sequência

proteica *THI* e baixo nos demais (Fig. 1). *Linum usitatissimum* L. foi amostrado apenas na árvore da sequência proteica *THIC* e, embora a espécie pertença a Malpighiales, neste estudo, agrupou-se com representantes de Vitales e Cucurbitales (Fig. 2). As famílias Salicaceae (gênero *Populus*) e Euphorbiaceae (gêneros *Ricinus* e *Jatropha*), da ordem Malpighiales, agruparam-se com *bootstrap* médio (64%) em *THI* e alto (94%) em *TPK* e baixo em *THIC* (Fig. 1, 2, 3). Salicaceae se mostrou basal à Euphorbiaceae em *THI* e *TPK* (Fig 1, 3).

Dentro de Commelinids, foram observadas as ordens Arecales (ramo B), Poales (ramo A) e Zingiberales (gênero *Musa*) (Fig. 1, 2, 3). Poales demonstrou ser monofilético nas sequências proteicas *TPK*, *THIC* e *THI* (91%, 99% e 99%) (Fig. 1, 2, 3). Arecales e Zingiberales estão em um mesmo clado, com alto *bootstrap* em todas as árvores, *THI* (82%), *THIC* (83%) e *TPK* (93%), e Zingiberales é basal. Apenas no gene *THIC*, observou-se todo o grupo Commelinids monofilético, entretanto, com baixo *bootstrap* (Fig. 2).

Segundo o APG IV (2016), Alismatales, representada pela espécie *Zostera marina* L., apresenta posição basal dentro das monocotiledôneas, com somente Acorales basal a ela. Na sequência proteica *THIC*, *Z. marina* se mostrou basal não só às monocotiledônias como também a todo o grupo das angiospermas, com *bootstrap* de 98% (Fig. 2).

As ordens Brassicales (ramo J), Myrtales (ramo M), Malvales (ramo L) e Sapindales (ramo K) foram evidentes em Malvids. Brassicales é monofilética, com alto *bootstrap* (100%) em *TPK*, médio (68%) em *THI* e baixo em *THIC* e, em todas as árvores, o gênero *Tarenaya* é o mais basal (Fig. 1, 2, 3). Foram monofiléticos, Myrtales no gene *TPK* (100%), Malvales com alto *bootstrap* no gene *TPK* (99%), médio em *THI* (70%) e baixo em *THIC* e Sapindales nos genes *TPK* (100%), *THIC* (98%), *THI* (99%) (Fig. 1, 2, 3).

Em Lamiids, as ordens Lamiales (ramo I), Solanales (ramo H) e Gentianales (gênero *Coffea*) foram observadas. Solanales é monofilética, com alto *bootstrap* na sequência proteica *TPK* (90%), *THIC* (98%) e *THI* (99%), assim como as ordens Solanales e Gentianales (baixo *bootstrap* [*THIC*], 71% [*TPK*]). No grupo Lamids, os gêneros *Genlisea* e *Sesamum* estão separados dos demais nas árvores dos genes *THI* e *THIC* e dos genes *THI* e *TPK*, respectivamente (Fig. 1, 2, 3).

A diferença encontrada nos clados, quando comparados genes homólogos de vários grupos, pode ser explicada pelas mutações que não alteraram a funcionalidade do gene. O acúmulo de mutações faz com que grupos mais próximos, na ordem evolutiva, tendam

a ter menores diferenças quando comparados a grupos mais distantes (Evert e Eichhorn, 2014).

Segundo Judd et al. (2009), há genes que não refletem a história evolutiva do organismo, pois há diversos fatores que influenciam as diferenças das sequências. Os principais são as mutações que aleatoriamente podem aproximar indivíduos que se assemelham pelo acaso; a hibridação, que com o cruzamento pode transferir seu DNA para linhagens diferentes, e o polimorfismo, que pode ser perdido (Judd et al., 2009). Assim, as histórias dos genes não são necessariamente a história do organismo.

4. CONCLUSÃO

Os genes da via da biossíntese da tiamina *THI*, *THIC* e *TPK*, usados como marcadores, demonstraram grande semelhança da topologia explicitada pelo APG IV (2016). O gene *TPK* se mostrou o melhor para efetivar a separação dos grandes grupos (criptógamas, angiospermas e gimnospermas), enquanto que o gene *THIC* conseguiu, dentro das angiospermas, melhor separar as monocotiledôneas e as eudicotiledônias. Assim, quando se avaliam as variações, em nível proteico, dos genes em questão, reflete-se a evolução dos grandes grupos de plantas e até mesmo as proximidades entre espécies, famílias e ordens, mesmo não se avaliando as variações nos nucleotídeos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UFVJM/ PRPPG/ PIBIC-CNPq pelo financiamento da bolsa e a UFVJM Instituto de Ciências Agrárias (Campus Unai-MG) pela disponibilização da infraestrutura.

Agradeço a orientação do Prof. Dr. Anderson Alvarenga Pereira e a coorientação da Prof^a. Dr^a. Micheline Carvalho Silva, que me apoiaram durante todo o trabalho, bem como a ajuda do Prof. Dr. Wellington Ferreira Campos que me deu a oportunidade de participar do projeto.

REFERÊNCIAS

- Ajjawi, I., Milla, M.A.R., Cushman, J., Shintani, D. K. 2007. Thiamin pyrophosphokinase is required for thiamin cofactor activation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, vol. 65, pp.151-162. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9205-4>.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* vol. 215, no 3, pp. 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- APG IV, 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 181, no 1, pp. 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.
- APG, 1998. "An ordinal classification for the families of flowering plants." *Annals of the Missouri botanical Garden*, vol. 85, no. 4, pp. 531-553. <http://www.jstor.org/stable/2992015>.
- Belanger, F., Leustek, T., Chu, B., Kirz, A. 1995. Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher plant plastids and its developmental regulation. *Plant Molecular Biology*, vol. 29, pp. 809–821. <https://doi.org/10.1007/BF00041170>.
- Bettendorff, L. e WINS, P., 2013. Thiamine triphosphatase and the CYTH superfamily of proteins. *FEBS J.* (in press). Vol. 280, no.24 pp. 6443–6455. <https://doi.org/10.1111/febs.12498>.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M.A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A., Soustre-Gacougnolle, I. 2013. Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology*, vol. 13, pp. 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-31>.
- Chatterjee, A., Abeydeera, N.D., Bale, S., Pai, P.J., Dorrestein, P.C., Russell, D.H., Ealick, S.E., Begley, T.P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* THI4p is suicide thiamine thiazole synthase. *Nature*, vol. 478, pp. 542-546. <https://doi.org/10.1038/nature10503>.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

Evest F. R.; e Eichhorn, S. E., 2014. Raven Biologia vegetal. Revisão técnica: Jane Elizabeth Kraus; tradução: Ana Claudia M. Vieira et.al. 8ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. il. 856 p.

Fitzpatrick, T.B., Basset, G.J., Borel, P., Carrari, F., DellaPenna, D., Fraser, P.D., Hellmann, H., Osorio, S., Rothan, C., Valpuesta, V., Caris-Veyrat, C., Fernie, A.R. 2012. Vitamin deficiencies in humans: can plant science help? *Plant Cell*, vol. 24, pp. 395-414. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093120>.

Gerdes, S., Lerma-Ortiz, C., Frelin, O., Seaver, S.M., Henry, C.S., de Crécy-Lagard, V., Hanson, A.D. 2012. Plant B vitamin pathways and their compartmentation: a guide for the perplexed. *Journal of Experimental Botany*, vol. 63, pp. 5379-5395. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers208>.

Goyer, A., 2010. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, vol. 71, pp. 1615–1624. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.022>.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. Tradução: André Olmos Simões...(et al.). 3ª ed. Porto Alegre: Arned, 2009. 632 p.: il. color.; 28cm.

Jurgenson, C.T., Begley, T.P., Ealick, S.E. 2009. The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annual Review Biochemistry*, vol. 78, pp. 569-603. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.072407.102340>.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no 14, pp. 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.

Kong, D., Zhu, Y., Wu, H., Cheng, X., Liang, H., Ling, H.Q., 2008. AtTHIC, a gene involved in thiamine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Research*, vol. 18, pp. 566–576.

Kowalska, E. e Kozik, A., 2008. The genes and enzymes involved in the biosynthesis of thiamin and thiamin diphosphate in yeasts. *Cellular e Molecular Biology Letters*, vol. 13, pp. 271-282. <https://doi.org/10.2478/s11658-007-0055-5>.

Kril, J.J., 1996. Neuropathology of thiamine deficiency disorders. *Metabolic Brain Disease*, vol. 11, pp. 9-17. <https://doi.org/10.1007/BF02080928>.

Leonardi, R. e Roach, P. L., 2004. Thiamine biosynthesis in *Escherichia coli*: *in vitro* reconstitution of the thiazole synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pp. 17054-17062.

Machado, C.R., de Oliveira, R.L., Boiteux, S., Praekelt, U.M., Meacock, P.A., Menck, C.F. 1996. Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Molecular Biology*, vol. 31, pp. 585–593. <https://doi.org/10.1007/BF00042231>.

Müller, M., Gocke, D., Pohl, M., 2009. Thiamin diphosphate in biological chemistry: exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis. *The FEBS Journal*, vol. 276, pp. 2894–2904. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07017.x>.

Nosaka, K., 2006. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 72, pp. 30–40. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0464-9>.

Rapala-Kozik, M., Olczak, M., Ostrowska, K., Starosta, A., Kozik, A., 2007. Molecular characterization of the *thi3* gene involved in thiamine biosynthesis in *Zea mays*: cDNA sequence and enzymatic and structural properties of the recombinant bifunctional protein with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (phosphate) kinase and thiamine monophosphate synthase activities. *Biochemical Journal*, vol. 408, pp. 149–159. <https://doi.org/10.1042/BJ20070677>.

Rapala-Kozik, M., Kowalska, E., Ostrowska, K., 2008. Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, pp. 4133–4143. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern253>.

Rapala-kozik, M., Wolak, N., Kujda, M., Banas, A.K., 2012. The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and

osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC Plant Biology*, vol. 12, pp. 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-2>.

Rapala-kozik, M., 2011. Vitamine B1 (thiamine): a cofactor for enzymes involved in the main metabolic pathways and an environmental stress protectant. *Advances in Botanical Research*, vol. 58, pp. 37-90.

Raschke, M., Bürkle, L., Müller, N., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Arigoni, D., Amrhein, N., Fitzpatrick, T.B., 2007. Vitamin B1 biosynthesis in plants requires the essential iron sulfur cluster protein, THIC. *Proceedings of National Academy of Sciences USA.*, vol. 104, pp. 19637–19642. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709597104>.

Ribeiro, D.T., Farias, L.P., de Almeida, J.D., Kashiwabara, P.M., Ribeiro, A.F., Silva-Filho, M.C., Menck, C.F., Van Sluys, M.A., 2005. Functional characterization of the thi1 promoter region from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, pp. 1797-1804. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri168>.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, vol. 30, no. 12, pp. 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J., 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*, vol. 22, pp. 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

Tippmann, H. F., 2004. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Briefings in bioinformatics*, vol. 5, no. 1, pp. 82-87. <https://doi.org/10.1093/bib/5.1.82>.

Tunc-ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Misra, A.N., Mittler, R., Shintani, D., 2009. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, vol. 151, pp. 421–432. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140046>.

Uniprot consortium, 2014. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, vol. 43, pp. 204-212. <https://doi.org/10.1093/nar/gku989>.

Wang, G., Ding, X., Yuan, M., Qiu, D., Li, X., Xu, C., Wang, S., 2006. Dual function of rice OsDR8 gene in disease resistance and thiamine accumulation. *Plant Molecular Biology*, vol. 60, pp. 437–449. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-4770-x>.

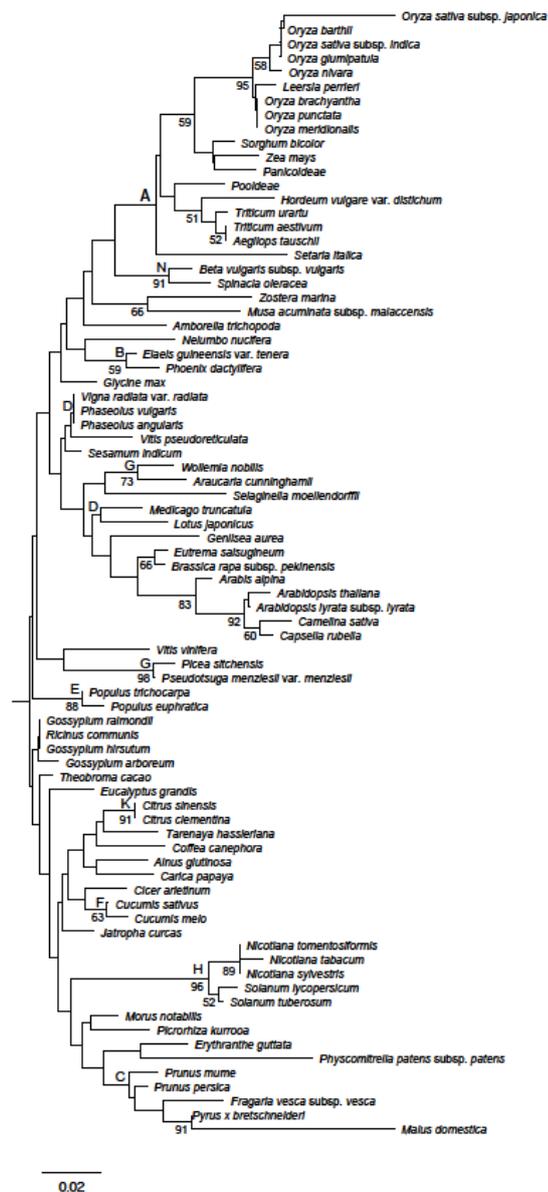
ANEXO 1- Lista das espécies com o número de acesso do uniprot para os genes *TH1*, *TPK*, *THIC* e *THI1*. * indica ausência de dados.

Aegilops tauschii Coss. M8APH3, M8BYU2, *, M8D2G6; *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *, *, *, Q38709; *Amborella trichopoda* Baill U5DCJ2, U5CWN2, W1NF63, W1PGT1; *Arabidopsis lyrata* subsp. *Lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz D7KML2, D7MKJ8, D7LLB4, D7MUD1; *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Q5M731, Q8LBL1, O82392, Q38814; *Arabis alpina* L. A0A087HQI0, *, *, A0A087GB32; *Araucaria cunninghamii* Doce A0A0D6R245, A0A0D6QY71, A0A0D6QVK1, A0A0D6QSQ2; *Arundo donax* L. A0A0A9GFD6, A0A0A9D3Y2, *, *; *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* L. A0A0J8C613, A0A0J8CLK8, A0A0J8BYS7, UPI00053F4093; *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. I1ITR8, I1GN82, I1GPL5, *; *Brassica campestris* L. UPI0004F171FF, *, *, *; *Brassica napus* L. A0A078G8S0, UPI0006AAFA57, A0A078I3N6, *; *Brassica oleracea* var. *oleracea* L. A0A0D3CCK2, A0A0D3EBG3, *, *; *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis* Kitam. M4E6Z5, *, M4DPD1, M4E1U2; *Cajanus cajan* (L.) Huth *, *, A0A151SZB3, *; *Camelina sativa* (L.) Crantz UPI00053B5383, UPI00053B0F84, UPI000539BC4F, UPI000539ABFC; *Capsella rubella* Reut. R0ILW2, R0EXI5, R0HRT4, R0GAJ7; *Carica papaya* L. *, *, *, C0LSI6; *Cicer arietinum* L. UPI00032A9095, UPI00032AABBD, UPI0006417188, UPI00032A7CBF; *Citrus clementina* Hort. (L.) Osbeck V4T678, V4TZ01, V4RUB9, V4TXU9; *Citrus sinensis* (L.) Osbeck A0A067EGP5, A0A067EYZ8, A0A067FUE0, O23787; *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner A0A068TNQ2, A0A068UYY9, A0A068UNI0, A0A068UDT8; *Cucumis melo* L. UPI0004A5FBE1, UPI0004A5E7D1, UPI0004A5ECBC, UPI0004A5D9BB; *Cucumis sativus* L. UPI0002B4127A, A0A0A0K3G0, A0A0A0LXK6, A0A0A0L546; *Elaeis guineensis* var. *tenera* Becc. UPI00057B50D1, UPI00057A667D, UPI00057B2579, UPI00057B0B30; *Erythranthe guttata* (DC.) G.L. Nesom A0A022QF08, A0A022R0E2, A0A022RNA8, A0A022R521; *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *, Q9LLM5, *, *; *Eucalyptus grandis* W. Hill A0A059B9U1, A0A059BX26, A0A059D506, A0A059BVX8; *Eutrema salsugineum* (Pall.) Al-Shehbaz & S.I. Warwick V4KA22, V4LGL4, *, V4LKP6; *Eutrema* R. Br. *, *, V4MG28, *; *Fragaria vesca* subsp. *Vesca* L. UPI0005CA9DED, UPI0002C2F09E, UPI0002C2F88E, UPI0002C35CE3; *Genlisea aurea* A. St.-Hil. S8EEU3, S8C1R5, S8C8N0, S8DJI4; *Glycine max* (L.) Merr. *, A0A0R0G7W6, I1N019, I1LE84; *Gossypium arboreum* L. A0A0B0PE51, A0A0B0MPY9, *, A0A0B0N4J4; *Gossypium hirsutum* L. *, *, *, D6N3H1; *Gossypium*

raimondii Ulbr. A0A0D2S7Y9, *, A0A0D2QSD0, A0A0D2R2M2; *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. *, B5A9S7, *, *; *Hordeum vulgare* var. *distichum* (L.) Thell. M0XD69, Q4G306, M0W5F0, M0UIS4; *Jatropha curcas* L. A0A067KRT8, A0A067KSV6, A0A067LDP0, A0A067KS68; *Leersia perrieri* (A. Camus) Launert A0A0D9XXM1, A0A0D9VZ39, *, A0A0D9WZP5; *Linum usitatissimum* L. *, *, I6XCQ8, *; *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen *, I3S745, I3SF11, I3TAU0; *Malus domestica* Borkh. UPI000498C6E5, PI0004989B3E, UPI00049901B9, UPI000498C0E9; *Medicago truncatula* Gaertn. G7INQ6, G7K4P7, A0A072UW11, I3SW28; *Morus notabilis* C.K. Schneid. W9S3N5, W9QNK2, W9RP88, W9S2E9; *Musa acuminata* subsp. *Malaccensis* (Ridl.) N.W. Simmonds M0T6I0, M0S038, M0TCF9, UPI0005123ED5; *Nelumbo nucifera* Gaertn. UPI00052EADC4, UPI00052EA995, UPI00052E7368, UPI00052EC39C; *Nicotiana sylvestris* Speg. UPI000520B8B3, UPI000520BC4E, *, UPI0005204F07; *Nicotiana tabacum* L. *, *, *, Q84QE4; *Nicotiana tomentosiformis* Goodsp. UPI00051AC0CB, UPI00051C8D5E, UPI00051B38CC, UPI00051AD554; *Oryza barthii* A. Chev. A0A0D3HS80, A0A0D3GLF3, A0A0D3FMF0, A0A0D3GRW0; *Oryza brachyantha* A. Chev. & Roehr. J3NC02, *, J3LRK4, J3MLI7; *Oryza glaberrima* Steud. I1R4Q4, *, *, *; *Oryza glumipatula* Steud. A0A0E0BPZ7, *, A0A0D9ZBL5, A0A0E0AKT3; *Oryza meridionalis* N.Q. Ng *, *, A0A0E0EV21, A0A0E0ECC4; *Oryza nivara* Sharma & Shastri A0A0E0HCG9, *, A0A0E0GRU2, A0A0E0I0L2; *Oryza punctata* Kotschy A0A0E0MKH0, *, *, A0A0E0LLJ3; *Oryza rufipogon* Griff. A0A0E0RES3, *, A0A0E0NZJ5, *; *Oryza sativa* subsp. *Indica* S. Kato *, *, A2XKN7, A2YM28; *Oryza sativa* subsp. *Japonica* S. Kato Q2QWK9, *, Q10F62, A0A0N7KNK4; *Panicoideae* *, *, *, K3XX15; *Phaseolus angularis* W. Wight A0A0L9VGA1, A0A0L9UU70, A0A0L9VC25, A0A0L9TZX6; *Phaseolus vulgaris* L. V7BU17, V7B954, V7BL78, V7BFF7; *Phoenix dactylifera* L. UPI0004E5814F, UPI0004E56999, UPI0004E5513D, UPI0004E56B95; *Physcomitrella patens* subsp. *Patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. A9T4D5, A9TVB3, A9U0I3, UPI000161FB4E; *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière *, *, *, A9NRW5; *Picrorhiza kurrooa* Royle *, *, *, Q5G1J2; *Poa secunda* J. Presl *, *, Q9AXS1, *; *Pooideae* *, *, *, I1GTU4; *Populus euphratica* Olivier UPI00057B4D3C, UPI00057B5089, UPI000579D2F3, UPI00057AFDEF; *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray A9PGH5, B9GFL3, B9HP68, A9PEX7; *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* Torr. & A. Gray *, *, A9PJ85, *; *Prunus mume* (Siebold) Siebold & Zucc. UPI00046D9DFC, UPI00046DBAB5, UPI00046DF6A2, UPI00046DC0F4; *Prunus persica* (L.) Batsch M5XRD0, M5WTX1,

*, M5WMT5; *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco *, *, *, Q3V7Y4; *Pyrus betulifolia* Bunge *, A0A0G2UF26, *, *; *Pyrus x bretschneideri* Rehder UPI000510A48D, UPI00051174C8, UPI000511A599, UPI0005111E64; *Ricinus communis* L. B9SXF8, B9S9U1, B9SHY3, B9SA39; A0A059Q1X5; *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *, Q9ZPL3, *, *; *Selaginella moellendorffii* Hieron. D8T631, D8RPT8, D8S5P4, D8RPN5; *Sesamum indicum* L. UPI00058169C8, UPI00058159E6, UPI00058168AD, UPI0005815A8F; *Setaria italica* (L.) P. Beauv. K3Y6B8, K3Y961, K4A6X6, K3ZUR5; T1DFJ7; *Solanum chacoense* Bitter *, *, A0A0V0IMA9, *; *Solanum lycopersicum* Lam. K4B1X0, K4CXD3, K4C390, K4CH99; *Solanum pennellii* Correll *, *, UPI0007347802, *; *Solanum tuberosum* L. UPI0003D26A89, Q9AR58, M0ZYC4, M1BNZ3; *Sorghum bicolor* (L.) Moench C5YTC8, C5X097, C5WPN8, C5X2M4; *Spinacia oleracea* L. A0A0K9RTY9, A0A0K9RWE1, A0A0K9QDD5, A0A0K9Q9I3; *Tarenaya hassleriana* Iltis UPI00053C638C, UPI00053C5982, UPI00053CA000, UPI00053C10E8; *Theobroma cacao* L. A0A061E742, A0A061F563, A0A061GZX3, A0A061F760; *Triticum aestivum* L. W5GCA7, W5F7S1, A0A096UR65, W5HZJ1; *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan M8A776, M7Z2H2, M7YHQ6, M8AMX9; *Vigna radiata* var. *radiata* (L.) R. Wilczek UPI0007115B2F, UPI0007113058, UPI000711CD8A, UPI000711B5A8; *Vitis pseudoreticulata* W. T. Wang *, *, *, I6QND1; *Vitis vinifera* L. D7TGZ0, UPI00053F6A20, F6GUU1, F6H9A9; *Wollemia nobilis* W.G. Jones, K.D. Hill & J.M. Allen *, A0A0C9RZF8, A0A0C9S833, A0A0C9RJ48; *Zea mays* L. B6TMJ4, B7ZZI8, C0PEH3, Q41738; *Zostera marina* L. A0A0K9NJZ0, *, A0A0K9PA89 e A0A0K9PJK1.

ANEXO 2: Árvore filogenética com base nas sequências do gene *TH11*. Utilizou-se o software MEGA 6, através do algoritmo Neighbor-joining Tree e um *bootstrap* de 1000 replicações. A=Poales, B=Arecales, C=Rosales, D=Fabales, E=Malpighiales, F=Cucurbitales, H=Salanales, G=Pinales (Gminospermas), K=Sapindales e N=Caryophyllales.



Anexo 3: Normas da revista a ser submetido o artigo.

Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN (on line) 1981-0997. Recife, v.10, n.2, abr.-jun., 2015 agraria.pro.br/ojs-2.4.6

Objetivo e Política editorial

A **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (RBCA)** é editada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) com o objetivo de divulgar artigos científicos, para o desenvolvimento científico das diferentes áreas das Ciências Agrárias. As áreas contempladas são: Agronomia, Engenharia Agrícola, Engenharia Florestal, Engenharia de Pesca e Agricultura, Medicina Veterinária e Zootecnia. Os artigos submetidos à avaliação devem ser originais e inéditos, sendo vetada a submissão simultânea em outros periódicos. A reprodução de artigos é permitida sempre que seja citada explicitamente a fonte.

Forma e preparação de manuscritos

O trabalho submetido à publicação deverá ser cadastrado no portal da revista (<http://www.agraria.pro.br/ojs-2.4.6>). O cadastro deverá ser preenchido apenas pelo autor correspondente que se responsabilizará pelo artigo em nome dos demais autores.

Só serão aceitos trabalhos depois de revistos e aprovados pela Comissão Editorial, e que não foram publicados ou submetidos em publicação em outro veículo. Excetuam-se, nesta limitação, os apresentados em congressos, em forma de resumo.

Os trabalhos subdivididos em partes 1, 2..., devem ser enviados juntos, pois serão submetidos aos mesmos revisores. Solicita-se observar as seguintes instruções para o preparo dos artigos.

Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente deve apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.

Composição sequencial do artigo

- a.** Título: no máximo com 15 palavras, em que apenas a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula.
- b.** Os artigos deverão ser compostos por, **no máximo, 8 (oito) autores**;
- c.** Resumo: no máximo com 15 linhas;
- d.** Palavras-chave: no mínimo três e no máximo cinco, não constantes no Título;
- e.** Título em inglês no máximo com 15 palavras, ressaltando-se que só a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula;

- f. Abstract: no máximo com 15 linhas, devendo ser tradução fiel do Resumo;
- g. Key words: no mínimo três e no máximo cinco;
- h. Introdução: destacar a relevância do artigo, inclusive através de revisão de literatura;
- i. Material e Métodos;**
- j. Resultados e Discussão;**
- k. Conclusões devem ser escritas de forma sucinta, isto é, sem comentários nem explicações adicionais, baseando-se nos objetivos da pesquisa;
- l. Agradecimentos (facultativo);
- m. Literatura Citada.

Observação: Quando o artigo for escrito em inglês, o título, resumo e palavras-chave deverão também constar, respectivamente, em português ou espanhol, mas com a sequência alterada, vindo primeiro no idioma principal.

Edição do texto

- a. Idioma:** Português, Inglês e Espanhol
- b. Processador:** Word for Windows;
- c. Texto:** fonte Times New Roman, tamanho 12. Não deverá existir no texto palavras em negrito;
- d. Espaçamento:** duplo entre o título, resumo e abstract; simples entre item e subitem; e no texto, espaço 1,5;
- e. Parágrafo:** 0,5 cm;
- f. Página:** Papel A4, orientação retrato, margens superior e inferior de 2,5 cm, e esquerda e direita de 3,0 cm, no máximo de 20 páginas não numeradas;
- g.** Todos os itens em letras maiúsculas, em negrito e centralizados, exceto Resumo, Abstract, Palavras-chave e Key words, que deverão ser alinhados à esquerda e apenas as primeiras letras maiúsculas. Os subitens deverão ser alinhados à esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula;
- h.** As grandezas devem ser expressas no SI (Sistema Internacional) e a terminologia científica deve seguir as convenções internacionais de cada área em questão;
- i. Tabelas e Figuras (gráficos, mapas, imagens, fotografias, desenhos)**
 - Títulos de tabelas e figuras deverão ser escritos em fonte Times New Roman, estilo normal e tamanho 9;
 - As tabelas e figuras devem apresentar larguras de 9 ou 18 cm, com texto em fonte Times New Roman, tamanho 9, e ser inseridas logo abaixo do parágrafo onde foram citadas pela primeira vez. Exemplo de citações no texto: Figura 1; Tabela 1. Tabelas e figuras que

possuem praticamente o mesmo título deverão ser agrupadas em uma tabela ou figura criando-se, no entanto, um indicador de diferenciação. A letra indicadora de cada subfigura numa figura agrupada deve ser maiúscula e com um ponto (exemplo: A.), e posicionada ao lado esquerdo superior da figura e fora dela. As figuras agrupadas devem ser citadas no texto da seguinte forma: Figura 1A; Figura 1B; Figura 1C.

- As tabelas não devem ter tracejado vertical e o mínimo de tracejado horizontal. Exemplo do título, o qual deve ficar acima: Tabela 1. Estações do INMET selecionadas (sem ponto no final). Em tabelas que apresentam a comparação de médias, mediante análise estatística, deverá existir um espaço entre o valor numérico (média) e a letra. As unidades deverão estar entre parêntesis.

- As figuras não devem ter bordadura e suas curvas (no caso de gráficos) deverão ter espessura de 0,5 pt, e ser diferenciadas através de marcadores de legenda diversos e nunca através de cores distintas. Exemplo do título, o qual deve ficar abaixo: Figura 1. Perda acumulada de solo em função do tempo de aplicação da chuva simulada (sem ponto no final). Para não se tornar redundante, as figuras não devem ter dados constantes em tabelas. Fotografias ou outros tipos de figuras deverão ser escaneadas com 300 dpi e inseridas no texto. O (s) autor (es) deverá (ão) primar pela qualidade de resolução das figuras, tendo em vista uma boa reprodução gráfica. As unidades nos eixos das figuras devem estar entre parêntesis, mas, sem separação do título por vírgula.

Exemplos de citações no texto

a. Quando a citação possuir apenas um autor: ... Freire (2007) ou ... (Freire, 2007).

b. Quando possuir dois autores: ... Freire & Nascimento (2007), ou ... (Freire & Nascimento, 2007).

c. Quando possuir mais de dois autores: Freire et al. (2007), ou (Freire et al., 2007).

Literatura citada

O artigo deve ter, preferencialmente, no máximo **25 citações bibliográficas**, sendo a maioria em **periódicos recentes (últimos cinco anos)**.

As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

As referências citadas no texto deverão ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e conter os nomes de todos os autores, separados por ponto e vírgula.

As citações devem ser, preferencialmente, de publicações em periódicos, as quais deverão ser apresentadas conforme os exemplos a seguir:

a. Livros

Mello, A.C.L. de; Vêras, A.S.C.; Lira, M. de A.; Santos, M.V.F. dos; Dubeux Júnior, J.C.B; Freitas, E.V. de; Cunha, M.V. da. Pastagens de capim-elefante: produção intensiva de leite e carne. Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2008. 49p.

b. Capítulo de livros

Serafim, C.F.S.; Hazin, F.H.V. O ecossistema costeiro. In: Serafim; C.F.S.; Chaves, P.T. de (Org.). O mar no espaço geográfico brasileiro. Brasília- DF: Ministério da Educação, 2006. v. 8, p. 101-116.

c. Revistas

Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers).

Quando o artigo tiver a url.

Oliveira, A. B. de; Medeiros Filho, S. Influência de tratamentos pré-germinativos, temperatura e luminosidade na germinação de sementes de leucena, cv. Cunningham. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.7, n.4, p.268-274, 2007. <http://agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path%5B%5D=183&path%5B%5D=104>. 29 Dez. 2012.

Quando o artigo tiver DOI.

Costa, R.B. da; Almeida, E.V.; Kaiser, P.; Azevedo, L.P.A. de; Tyszka Martinez, D. Tsukamoto Filho, A. de A. Avaliação genética em progênies de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. na região do Pantanal, estado do Mato Grosso. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.6, n.4, p.685-693, 2011. <https://doi.org/10.5039/agraria.v6i4a1277>.

d. Dissertações e teses

Bandeira, D.A. Características sanitárias e de produção da caprinocultura nas microrregiões do Cariri do estado da Paraíba. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 116p. Tese Doutorado.

e. WWW (World Wide Web) e FTP (File Transfer Protocol)

Burka, L.P. A hipertext history of multi-user dimensions; MUD history. <http://www.aka.org.cn/Magazine/Aka4/interhisE4.html>. 29 Nov. 2012.

Não serão aceitas citações bibliográficas do tipo apud ou citado por, ou seja, as citações deverão ser apenas das referências originais.

Citações de artigos no prelo, comunicação pessoal, folder, apostila, monografia, trabalho de conclusão de curso de graduação, relatório técnico e trabalhos em congressos, devem ser evitadas na elaboração dos artigos.

Outras informações sobre a normatização de artigos

- 1) Os títulos das bibliografias listadas devem ter apenas a primeira letra da primeira palavra maiúscula, com exceção de nomes próprios. O título de eventos deverá ter apenas a primeira letra de cada palavra maiúscula;
- 2) O nome de cada autor deve ser por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome, sendo apenas a primeira letra maiúscula;
- 3) Não colocar ponto no final de palavras-chave, keywords e títulos de tabelas e figuras. Todas as letras das palavras-chave devem ser minúsculas, incluindo a primeira letra da primeira palavra-chave;
- 4) No Abstract, a casa decimal dos números deve ser indicada por ponto em vez de vírgula;
- 5) A Introdução deve ter, preferencialmente, no máximo 2 páginas. Não devem existir na Introdução equações, tabelas, figuras, e texto teórico sobre um determinado assunto;
- 6) Evitar parágrafos muito longos;
- 7) Não deverá existir itálico no texto, em equações, tabelas e figuras, exceto nos nomes científicos de animais e culturas agrícolas, assim como, nos títulos das tabelas e figuras escritos em inglês;
- 8) Não deverá existir negrito no texto, em equações, figuras e tabelas, exceto no título do artigo e nos seus itens e subitens; 9) Em figuras agrupadas, se o título dos eixos x e y forem iguais, deixar só um título centralizado;
- 10) Todas as letras de uma sigla devem ser maiúsculas; já o nome por extenso de uma instituição deve ter maiúscula apenas a primeira letra de cada nome;
- 11) nos exemplos seguintes o formato correto é o que se encontra no lado direito da igualdade: 10 horas = 10 h; 32 minutos = 32 min; 5 l (litros) = 5 L; 45 ml = 45 mL; l/s = L.s⁻¹; 27°C = 27 °C; 0,14 m³/min/m = 0,14 m³.min⁻¹.m⁻¹; 100 g de peso/ave = 100 g de peso por ave; 2 toneladas = 2 t; mm/dia = mm.d⁻¹; 2x3 = 2 x 3 (deve ser separado); 45,2 - 61,5 = 45,2-61,5 (deve ser junto). A % é unidade que deve estar junta ao número (45%). Quando no texto existirem valores numéricos seguidos, colocar a unidade somente no último valor (Ex: 20 e 40 m; 56,0, 82,5 e 90,2%). Quando for pertinente, deixar os valores numéricos com no máximo duas casas decimais;
- 12) Na definição dos parâmetros e variáveis de uma equação, deverá existir um traço separando o símbolo de sua definição. A numeração de uma equação deve estar entre parêntesis e alinhada esquerda. Uma equação deve ser citada no texto conforme os seguintes exemplos: Eq. 1; Eq. 4.;

13) Quando o artigo for submetido não será mais permitida mudança de nome dos autores, sequência de autores e quaisquer outras alterações que não sejam solicitadas pelo editor.

Procedimentos para encaminhamento dos artigos

O autor correspondente deve se cadastrar como autor e inserir o artigo no endereço <http://www.agraria.pro.br/ojs-2.4.6>.

O autor pode se comunicar com a Revista por meio do e-mail agrarias@prppg.ufrpe.br, editorgeral@agraria.pro.br ou secretaria@agraria.pro.br.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial do presente trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Leila Lourenço Furtado

Leilafurtado24@hotmail.com

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Av. Vereador João Narciso, 1380 – Cachoeira, Unaí - MG