

BEATRIZ RAYRANA DE ARAÚJO GAMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Physalis* L. E ANÁLISE MOLECULAR *in silico* DE
PUTRESCINE N-METHYLTRANSFERASE EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
SOLANACEAE**

RECIFE – PE

2022

BEATRIZ RAYRANA DE ARAÚJO GAMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Physalis* L. E ANÁLISE MOLECULAR *in silico* DE
PUTRESCINE N-METHYLTRANSFERASE EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
SOLANACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Luiza Suely Semen Martins.

Coorientadores:

Prof^a. Dr^a. Angélica Virgínia Valois Montarroyos

Dr. Rômulo Maciel de Moraes Filho.

RECIFE – PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G184d Gama, Beatriz Rayrana de Araújo
Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular in silico de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae / Beatriz Rayrana de Araújo Gama. - 2022.
107 f. : il.
- Orientadora: Luiza Suely Semen Martins.
Coorientadora: Angelica Virginia Valois Montarroyos.
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, Recife, 2023.
1. Descritores qualitativos. 2. Variabilidade genética. 3. Bioinformática. 4. Modelagem por homologia. 5. Metabolismo secundário. I. Martins, Luiza Suely Semen, orient. II. Montarroyos, Angelica Virginia Valois, coorient. III. Título

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Physalis* L. E ANÁLISE MOLECULAR *in silico* DE
PUTRESCINE N-METHYLTRANSFERASE EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
SOLANACEAE**

BEATRIZ RAYRANA DE ARAÚJO GAMA

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em: 19 de dezembro de
2022

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Luiza Suely Semen Martins

Dra. Semíramis Rabelo Ramalho Ramos

Dra. Jackeline Gadé de Araujo Rossiter

RECIFE – PE

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A minha mãe e tia, por todo o amor, apoio e dedicação, por nunca terem medido esforços para me proporcionar uma educação de qualidade. Obrigada por sempre sonharem meus sonhos junto comigo.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Luiza Suely Semen Martins, Prof^a. Dr^a. Angélica Virgínia Valois Montarroyos e Dr. Rômulo Maciel de Moraes Filho, que me conduziram na realização do trabalho com paciência e dedicação, sempre disponíveis a compartilhar todo o seu vasto conhecimento. E, principalmente, obrigada por sempre terem acreditado e confiado em mim ao longo de todos esses anos de trabalho.

A todos da equipe do Laboratório de Biotecnologia e Plantas Daninhas – LBPD que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento desta pesquisa, cujos esforços e auxílio tornaram possível a sua concretização.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de PósGraduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP), por toda a estrutura disponibilizada e corpo docente.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

“O universo é uma harmonia de contrários”

Pitágoras

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA baseado na matriz de dissimilaridade dos descritores em acessos de *Physalis*, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE.....47

CAPÍTULO III

Figura 1. (1A) Domínios funcionais observados através do servidor ProDom. (1B) Predição de efeitos funcionais das mutações em aminoácidos pelo servidor SNAP2 para domínios PDB1E385 (A) *Physalis divaricata*, PD221906 (B) *Hyoscyamus niger*, PD731350 (C) *Atropa beladonna* e PD002785 (D) *Capsicum baccatum*.....62

Figura 2. Análise de agrupamento obtida pelo método de neighbor-joining, das espécies de Solanaceae, com base nas sequências de putrescine *N*-metiltransferase (PMT). Os quatro domínios funcionais (PD002785; PDB1E385; PD221906 e PD731350) estão representados para cada espécie.....65

Figura 3. Estrutura tridimensional de putrescine *N*-metiltransferase (PMT) gerada pelo servidor Phyre2 para *Atropa beladonna* (A1 e B1); *Hyoscyamus niger* (A2 e B2); *Physalis divaricata* (A3 e B3) e *Capsicum baccatum* (A4 e B4).....66

Figura 4. Análise do gráfico de Ramachandran gerado pelo servidor MolProbity, a partir do modelo tridimensional construído pelo servidor Phyre2 para *Atropa beladonna* (A1); *Capsicum baccatum* (B1); *Hyoscyamus niger* (C1) e *Physalis divaricata* (D1). Valor de pontuação Z pelo ProSA-web para *Atropa beladonna* (A2); *Capsicum baccatum* (B2); *Hyoscyamus niger* (C2) e *Physalis divaricata* (D2). Uso do ProSA-web para putrescine *N*-metiltransferase mostrando o gráfico de dispersão de energia de resíduos da estrutura da proteína nativa para *Atropa beladonna* (A3); *Capsicum baccatum* (B3); *Hyoscyamus niger* (C3) e *Physalis divaricata* (D3).....67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Procedência dos acessos de *Physalis* conservados no Banco Ativo de Germoplasma, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Recife-PE, 2022.....44

Tabela 2. Descritores morfológicos qualitativos avaliados nos acessos de *Physalis* conservados no Banco Ativo de Germoplasma, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Recife-PE, 2022.....45

Tabela 3. Agrupamento pelo método de otimização de Tocher resultante da análise de 10 acessos de *Physalis*. Recife-PE, 2022.....48

CAPÍTULO III

Tabela 1. Sequências de putrescine *N*-metiltransferase (PMT) analisadas em espécies da família Solanaceae.....58

Tabela 2. Análise da estrutura primária das sequências de putrescine *N*-metiltransferase (PMT) de espécies da família Solanaceae.....60

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Gênero <i>Physalis</i>	18
2.2. Importância econômica	19
2.3. Recursos genéticos	21
2.4. Formação e implementação de um banco de germoplasma	22
2.5. Melhoramento genético em <i>Physalis</i>	23
2.6. Diversidade genética	25
2.7. Metabólitos secundários em Solanaceae	26
2.8. Bioinformática	27
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Physalis</i> L. EM ACESSOS CONSERVADOS EX SITU.....	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

	x
4. CONCLUSÃO	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
CAPÍTULO III: CARARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE PUTRESCINE N- METILTRANSFERASE EM ESPÉCIES DE SOLANACEAE	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4. CONCLUSÃO	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	72
ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH – GMR 19076	73
ANEXO II – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CERES	85
ANEXO III – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH	103

RESUMO

Physalis é um gênero pertencente à família Solanaceae que compreende cerca de cem espécies, sendo estas quase que em sua totalidade ocorrentes no continente Americano. Suas espécies têm sido amplamente utilizadas na alimentação humana, na produção de substâncias farmacológicas e na ornamentação. Atualmente, o cultivo para a produção de frutos de *Physalis* é o que tem apresentado maior importância comercial, sendo utilizados como fonte de vitamina A, B e C, de micronutrientes como o fósforo, além de altos teores de sólidos solúveis. Estudos têm revelado a identificação de substâncias químicas encontradas em *Physalis*, que desempenham atividades biológicas importantes, com ação imunomoduladoras, antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatória, moluscidas, dentre outras. Apesar do expressivo potencial econômico, apenas uma pequena parte da variabilidade genética das espécies foi estudada, possuindo grande número de genótipos ainda não caracterizados geneticamente. O melhoramento genético da espécie é realizado empiricamente, ao longo dos anos, pelos próprios agricultores. Diante disso, o presente estudo tem por objetivo realizar avaliação preliminar da diversidade genética entre acessos de *Physalis* L. pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG), pertencente a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por meio de caracteres morfológicos. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Plantas Daninhas e em telado da Área de Fitotecnia, do Departamento de Agronomia, da UFRPE. Os materiais avaliados foram originários de sementes obtidas comercialmente da espécie *Physalis peruviana* L., e de genótipos provenientes de seis estados do Brasil, que fazem parte do banco de germoplasma de *Physalis* da UFRPE. Foram caracterizados dez acessos por meio de 21 descritores qualitativos (Hábito de crescimento; Cor do caule; Pubescência do caule; Forma do caule; Forma da folha; Forma da margem foliar; Forma da base foliar; Forma do ápice foliar; Antocianina na venação foliar; Cor da corola; Cor das máculas da corola; Posição da flor; Cor do cálice imaturo; Cor do cálice maduro; Forma do cálice; Cor do fruto imaturo; Cor do fruto maduro; Forma do fruto; Presença de cera nos frutos; Forma da semente; Cor da semente). O uso de descritores morfológicos foi eficiente na estimativa da variabilidade genética existente entre os acessos. Estas informações servirão de base para o manejo do Banco de Germoplasma, na identificação de possíveis duplicatas, e redução de custos na manutenção, auxiliando também a avaliação e seleção de indivíduos de interesse para programas de melhoramento vegetal da cultura. Na parte

de bioinformática, o presente estudo teve como objetivo realizar análise molecular in silico da enzima putrescine N-metiltransferase (PMT) em espécies da família Solanaceae, caracterizando estruturalmente e funcionalmente as sequências de aminoácidos com metodologias de bioinformática, para desenvolver modelos tridimensionais da referida proteína, com base na metodologia de modelagem por homologia. Foram caracterizadas 48 sequências da PMT presentes em bancos de dados públicos. Os resultados obtidos indicaram um caráter hidrofílico da PMT para todas as espécies, e uma pequena variação de pI entre as espécies analisadas, indicando um caráter ácido. Foi observada a presença de quatro domínios funcionais nas sequências da PMT. A análise de agrupamento por Neighbour Joining apresentou consistência com classificações taxonômicas recentes das espécies avaliadas. Os modelos 3D gerados podem ser considerados uma representação próxima da estrutura real da proteína.

Palavras-chave: Descritores qualitativos; Variabilidade Genética; Bioinformática; Modelagem por Homologia; Proteína; Metabolismo secundário.

ABSTRACT

Physalis is a genus belonging to the Solanaceae family, which comprises about one hundred species, almost all of which occur in the Americas. Its species have been widely used in human food, in the production of pharmacological substances and for ornamentation. Currently, the *Physalis* fruit cultivation is the most commercially important, being used as a source of vitamin A, B and C, of micronutrients such as phosphorus, and high levels of soluble solids. Studies have revealed the identification of chemical substances found in *Physalis*, which have important biological activities, with immunomodulatory, antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory, and molluscicidal actions, among others. Despite the expressive economic potential, only a small part of the genetic variability of its species has been studied, with a large number of genotypes not yet genetically characterized. The genetic breeding of the species is carried out empirically, over the years, by the farmers themselves. Therefore, the present study aims to perform a preliminary evaluation of the genetic diversity among *Physalis* L. accessions belonging to the Active Germplasm Bank (BAG) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), using morphological characters. The work was conducted in the Laboratory of Plant Biotechnology and Weeds and in a greenhouse of the Phytotechnology Area, Agronomy Department, UFRPE. The evaluated materials originated from seeds commercially obtained from the species *Physalis peruviana* L., and from genotypes from six states of Brazil, which are part of the *Physalis* germplasm bank of UFRPE. Ten accessions were characterized using 21 qualitative descriptors (Growth habit; Stem color; Stem pubescence; Stem shape; Leaf shape; Leaf margin shape; Leaf base shape; Leaf apex shape; Anthocyanin in the leaf venation; Color of the corolla; Color of the maculae of the corolla; Position of the flower; Color of the immature calyx; Color of the mature calyx; Shape of the calyx; Color of the immature fruit; Color of the mature fruit; Fruit shape; Presence of wax in the fruit; Seed shape; Seed color). The use of morphological descriptors was efficient in estimating the genetic variability existing among the accessions. This information will serve as a basis for managing the germplasm bank, identifying of possible duplicates, and reducing maintenance costs, also helping in the evaluation and selection of individuals of interest for plant breeding programs for the crop. In the bioinformatics part, the present study aimed to perform in silico molecular analysis of the enzyme putrescine N-methyltransferase (PMT) in species of the Solanaceae family, characterizing structurally and functionally the amino acid sequences with bioinformatics

methodologies, to develop three-dimensional models of this protein, based on homology modeling methodology. A total of 48 PMT sequences present in public databases were characterized. The results obtained indicated a hydrophilic character of PMT for all species, and a small variation of pI among the analyzed species, indicating an acidic character. The presence of four functional domains was observed in the PMT sequences. Clustering analysis by Neighbour Joining showed consistency with recent taxonomic classifications of the evaluated species. The generated 3D models can be considered a close representation of the real structure of the protein.

Key words: Qualitative descriptors; Genetic Variability; Bioinformatics; Homology Modeling; Protein; Secondary metabolism.

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Solanaceae compreende uma das maiores famílias entre as angiospermas, contendo 150 gêneros e 3.000 espécies, sendo a América do Sul um dos principais centros de origem e diversidade (HUNZIKER, 2001; SOUZA; LORENZI, 2005). Esta possui relevante impacto econômico, em virtude do seu potencial alimentício, medicinal e ornamental (MOURA; CAIRES, 2021), com grande parte das espécies alimentares da família distribuídas entre os gêneros *Solanum* L., *Capsicum* L. e *Physalis* L. (SAMUELS, 2015).

O gênero *Physalis* L., abrange cerca de 90 espécies, com distribuição cosmopolita tropical, ocorrendo desde o sul da América do Norte até a América do Sul (HUNZIKER, 2001). Sendo facilmente reconhecido devido à morfologia peculiar, que é caracterizada pela presença de um cálice frutífero acrescente e inflado, que se expande envolvendo totalmente o fruto (MARTINEZ, 1998). No Brasil, o plantio e consumo de *Physalis* no mercado está centrado na espécie *P. peruviana*, devido ao fato desta apresentar um fruto açucarado, rico em vitamina A e C, ferro e fósforo, além de alcaloides, flavonoides, carotenoides e compostos bioativos considerados funcionais (MUNIZ et al., 2015). Outra espécie de destaque é *P. angulata*, a qual produz metabólitos secundários com elevado potencial medicinal, atividades antimicrobiana, antiinflamatória, imunoduladora, antitumoral, dentre outras (TOMASSINI, 2000; ARAUJO, 2012).

Esta frutífera apresenta grande potencial econômico, sendo classificada como fruta fina, a exemplo de mirtilo, framboesa e amora-preta (RODRIGUES, 2011). As chamadas frutas finas abrangem um grupo de espécies frutíferas ainda pouco exploradas, mas de crescente importância econômica, sendo muito procuradas nos mercados estrangeiros de alto poder aquisitivo (RODRIGUES et al., 2013). Apesar disso, algumas espécies de *Physalis* são descritas como plantas alimentícias não convencionais (PANC), devido ao seu consumo e comercialização ainda não estar amplamente difundido no país (ZIMMER, 2019).

O custo de produção de *Physalis* tem atraído a atenção de produtores rurais por ser tido como acessível, devido seu cultivo ocupar pequenas áreas e possuir um retorno econômico consideravelmente elevado, além de se tratar de uma planta rústica e de boa adaptação. Por estas razões, o gênero vem despertando interesse

comercial, por ser visto como uma excelente alternativa ao pequeno e médio produtor rural (RUFATO et al., 2008; TREVISANI, 2018).

Entretanto, apesar da relevância comercial do fruto e do seu potencial farmacológico, ainda são escassos estudos referentes a diversidade genética do gênero, evidenciando a necessidade de desenvolver pesquisas visando viabilizar a sua exploração, conservação, desenvolvimento de tecnologias de produção e disponibilidade de compostos bioativos de interesse comercial (SILVA, 2018).

A biotecnologia vem contribuindo significativamente para a geração de novos produtos como fármacos e alimentos (COSTA, 2011). Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, são altamente específicos e desempenham papel fundamental na evolução e interação com os seres vivos, além de serem economicamente utilizados. Por se tratar de um expressivo conjunto de substâncias, se fazem necessários estudos que elucidem o papel desses compostos e suas interações, visando o seu melhor aproveitamento (BORGES; AMORIM, 2020). Nesse sentido, a predição *in silico* de alvos moleculares possibilita a otimização do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (AZEVEDO et al., 2020), por meio do uso de ferramentas de bioinformática (SEIXAS et al., 2016). Esta permite a integração de diversos tipos de dados biológicos, como sequências de DNA, estrutura de peptídeos, vias metabólicas e vias de sinalização. Possibilitando o entendimento de processos biológicos como mudanças na expressão gênica, localização de proteínas e suas interações com genes e outras proteínas (VASSILEV et al., 2005). Com a difusão de plataformas de sequenciamento, a bioinformática tornou-se essencial no melhoramento vegetal, com a análise de dados ômicos possibilitando a identificação de interações gênicas, vias metabólicas e sua modelagem *in silico* atuante na busca por genes e vias de interesse para melhoramento genético (FERREIRA, 2017).

O presente estudo teve como objetivos: (1) Realizar a caracterização morfológica preliminar de acessos conservados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Physalis* L., localizado da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), utilizando diferentes métodos de agrupamento para a estimativa da variabilidade genética existente entre os acessos; (2) Caracterizar estruturalmente e funcionalmente as sequências de putrescine *N*-metiltransferase (PMT) de espécies da família Solanaceae, com metodologias de bioinformática e (3) Desenvolver modelos tridimensionais da putrescine *N*-metiltransferase de representantes da família

Solanaceae, com base na metodologia de modelagem por homologia, visando possibilitar uma melhor compreensão de suas estruturas e funções moleculares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Physalis*

Physalis é um gênero pertencente à família Solanaceae que compreende aproximadamente noventa espécies, sendo estas quase que em sua totalidade ocorrentes no continente Americano, com exceção de *Physalis alkekengi* L., que é euroasiática. O México é tido como o centro de diversidade do gênero, onde dois terços das espécies são endêmicas (HUNZIKER, 2001; RUFATO et al., 2013). No Brasil são referidas oito espécies, distribuídas por todo o país, que ocorrem em diferentes domínios fitogeográficos, abrangendo desde a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, até o Pantanal (STEHMANN et al., 2015).

O gênero é composto por erva e arbustos, perenes e rústicos, que podem atingir até dois metros de altura (LIGARRETO et al., 2005). As folhas são aveludadas e triangulares, enquanto o talo principal, herbáceo e piloso, é composto por 8 a 12 nós (LIMA et al., 2009). As flores podem ser axilares, solitárias ou pediceladas. A corola apresenta formato tubular e a sua coloração varia de amarelada, esverdeada a esbranquiçada. As pétalas podem apresentar máculas em suas bases com a coloração variando em tons de marrom, azul escuro à roxo (MARTÍNEZ, 1998). Em *Physalis* prevalece a alogamia em que as flores são facilmente polinizadas por insetos e pelo vento, entretanto apresentando também autopolinização (RUFATO et al., 2013). Segundo Chaves (2017), o estabelecimento de estratégias de conservação, desenvolvimento e planejamento das espécies de *Physalis*, e posterior seleção de métodos de melhoramento genético, são dificultados pelos poucos estudos relacionados à fenologia, biologia floral e mecanismos reprodutivos.

Os frutos de *Physalis* são caracterizados como uma baga carnosa, que quando madura a coloração varia entre verde, amarelo, laranja e roxo, contendo em média 100 a 300 sementes (MARTÍNEZ, 1998; CAMACHO, 2000). O fruto se encontra dentro de uma estrutura denominada cálice que é formado por cinco sépalas, possuindo a função de protegê-lo contra insetos, pássaros, patógenos e condições climáticas

adversas, além de servir como fonte de carboidratos durante os primeiros 20 dias de crescimento do fruto (ÁVILA et al., 2006).

2.2. Importância econômica

No continente americano, o cultivo de *Physalis* ocorre tanto nos países tropicais e subtropicais, como em países caribenhos, destacando-se, pelo aumento das suas área de cultivo, alguns países da América do Sul, como Equador, Peru, Chile e Brasil (FISCHER et al., 2014). A Colômbia figura como a maior produtora mundial de *Physalis*, possuindo elevado nível tecnológico no sistema de produção visando atender ao mercado externo (ALVARENGA, 2016). No referido país, o desenvolvimento de tecnologias ocorre alicerçado no conhecimento empíricos oriundo dos agricultores, aliado as pesquisa desenvolvidas nas Universidades e pela Corporação Colombiana de Pesquisa Agropecuária (CORPOICA) (FISCHER et al., 2014). Segundo Miranda e Fischer (2021), a produção de *Physalis* em fazendas tecnificadas pode atingir um máximo de 25-30 t ha⁻¹, sendo esta a segunda fruta mais exportada da Colômbia.

Segundo Chaves (2006) no Brasil, tanto o cultivo como também as pesquisas com *Physalis* tiveram início na década de 1999, na Estação Experimental de Santa Luzia, localizada em São Paulo, com estudos voltados para aspectos relacionados ao manejo da cultura. Posteriormente, o cultivo se expandiu para a região Sul, principalmente em cidades do Rio Grande do Sul, como Vacaria, e em Santa Catarina, nas cidades de Fraiburgo, e Lages, cultivada por pequenos e médios produtores, caracterizando-se pela agricultura familiar (FERREIRA, 2006; ANDRADE, 2008).

De acordo com dados anuais da Epagri/Cepa relacionados a safra 2017/18 de espécies frutíferas, os principais municípios produtores de *Physalis* no Estado de Santa Catarina foram Chapecó na região Oeste, Dona Emma no Alto Vale do Itajaí, São Bento do Sul no Planalto Norte, São Joaquim e Urubici no Planalto Sul, contando com uma área total de 2 ha, quantidade total produzida de 2 t e rendimento médio de 1000 kg.ha⁻¹. Contudo, os dados referentes a produção no país se revelam pouco expressivos quando comparada à demanda do mercado consumidor. Atualmente, São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais são os principais estados produtores, mas boa

parte dos frutos de *Physalis* comercializados em mercados ainda são oriundos da Colômbia (AGÊNCIA BRASÍLIA, 2019).

Dentro do gênero, as espécies mais conhecidas tanto por seu cultivo, quanto pela utilização na alimentação humana, são *Physalis peruviana* L., *P. pubescentes* L., *P. philadelphica* Lam., e *P. ixocarpa* Brot. ex Hornem., enquanto *P. minima* L. e *P. angulata* L. são também reconhecidas pelo valor medicinal. Embora possua frutos comestíveis, para *P. alkekengi* L. é atribuído valor ornamental (SILVA, 2014; TANAM, 2015).

Na cultura da *Physalis*, o fruto tem maior importância comercial, podendo ser consumido *in natura*, em saladas, e para o processamento nas agroindústrias visando a obtenção de produtos derivados. Em alguns países, o fruto é processado para a obtenção de diversos produtos, como geleias, bebidas lácteas, iogurtes, licores e doces. No Brasil esses frutos estão sendo muito usados no ramo da confeitaria, na decoração de bolos e tortas (RUFATO et al., 2013).

O cultivo de *Physalis* no Brasil pode ser tido como uma atividade agrícola recente, ainda não havendo uma produção agrícola em grande escala, apesar do seu fruto apresentar um consumo igual ou até superior às demais culturas do mercado de pequenas frutas. Para o consumo, os frutos da espécie *P. peruviana* L. se destacam, por já serem amplamente aceitos pelo mercado consumidor. Sendo também importante salientar que outras partes da planta possuem valor de mercado, podendo ser aproveitada as raízes e folhas no mercado farmacêutico, e o cálice, em trabalhos artesanais (MUNIZ et al., 2015).

Atualmente o preço de comercialização do fruto pode chegar a R\$ 180,00 por quilograma, no entanto, os produtores recebem em torno de 30 a 60% desse valor. Como apontam Muniz et al. (2015), a cultura apresenta um baixo custo de implantação, o que a torna acessível a pequenos e médios agricultores, principalmente quando se leva em consideração os valores de mercado atrativos do ponto de vista econômico. Vale ressaltar que, em algumas situações, o valor pago ao produtor pode não ser suficiente para custear gastos que incluem variáveis como a demanda por mão-de-obra, tempo investido, impostos, preços de embalagem e rotulagem, logística e transporte, além das etapas necessárias para que o produto chegue à mesa do consumidor.

O fruto tem sido utilizado como fonte de vitamina A, B e C, de micronutrientes como o fósforo, apresentando também altos teores de sólidos solúveis, principalmente açúcares, além da presença de altos níveis de frutose (RAMADAN et al., 2011). Segundo Machado et al. (2019), além da conhecida importância nutricional, o fruto de *Physalis* contém compostos não nutrientes, que podem ser denominados de compostos antioxidantes, os quais possuem efeitos fisiológicos e metabólicos no organismo. Considerando-se substâncias farmacologicamente importantes produzidas por *Physalis*, destacam-se os vitaesteróides, fisalinas, vitanolídos e vitafisalinas, entre outros (TOMASSINI, 2000).

Na literatura podem ser encontrados vários estudos que citam as atividades desempenhadas pelas substâncias químicas encontradas nas *Physalis*, sendo estas ditas como responsáveis por atividades imunomoduladoras (SOARES et al., 2003, 2006), antimicrobianas (JANUÁRIO et al., 2002; LOPES et al., 2006), anticancerígenas (RIBEIRO et al., 2002; SOARES et al., 2006; LEE et al., 2009), moluscidas (SANTOS et al., 2003), leishmanicida (GUIMARÃES et al., 2009), antiinflamatória (BASTOS et al., 2008), dentre outras.

2.3. Recursos genéticos

Nass e Paterniani (2000) conceituam o pré-melhoramento como todas as atividades que envolvem a identificação de características e/ou genes de interesse presentes em germoplasma exótico ou semi-exóticos, incluindo aqueles que não foram submetidos a qualquer tipo de seleção para melhoria, e a sua posterior incorporação em programas de melhoramento. Nesse sentido, segundo Lopes e Carvalho (2008), os recursos genéticos são considerados como a matéria-prima para o melhoramento genético, atribuídos como fonte da variabilidade necessária para que o melhoramento aconteça. Contudo, Albuquerque e Nass (2009) relatam que o uso de acessos disponíveis em bancos de germoplasma ainda é limitado em todo mundo. Sendo algumas das principais causas dessa baixa utilização, a inadequada realização da documentação e descrição das coleções, a falta de dados úteis para utilização nos programas de melhoramento genético, falta de atividades de avaliação dos acessos, e a limitada adaptação dos acessos, sendo muitas dessas causas da baixa utilização de recursos genéticos mitigadas com o desenvolvimento de atividades de pré-melhoramento (FALEIRO et al., 2011).

Os recursos genéticos do gênero *Physalis* constituem um alicerce no campo do melhoramento genético das espécies cultivadas, devido ao fato de que apenas uma pequena parte da variabilidade genética foi estudada, nos dando uma dimensão do potencial de pesquisas a serem exploradas (LIGARRETO et al., 2005). Santos (2018) aponta que o conhecimento acerca da quantidade de Bancos de Germoplasma de *Physalis* existentes ainda é incipiente, com a conservação em alguns casos sendo feita pelos agricultores, com a manutenção das suas sementes, que em muitas situações são compartilhadas com familiares ou amigos.

A maioria dos Bancos Ativos de Germoplasma de *Physalis* no mundo, estão localizados na Colômbia, sendo as coleções mais expressivas a da Universidade Nacional da Colômbia em Palmira, destacando-se também os bancos ativos de germoplasma de CORPOICA (Corporação Colombiana de Pesquisa Agrícola) e da Universidade de Nariño (CHACÓN et al., 2016). No Brasil, algumas instituições de pesquisa e ensino mantêm pequenas coleções de espécies de *Physalis*, tais como: Embrapa Hortaliças; Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC); Universidade Federal de Pelotas (UFPEl); Universidade Federal de Lavras (UFLA); Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Como exposto por Ligarreto et al. (2005), tendo em vista um melhor aproveitamento dos recursos genéticos do gênero *Physalis*, se faz necessária a existência de uma base dados que contemple informações a respeito das coleções existentes, como características morfológicas, agrônômicas e químicas, para assim ser possível realizar seleções de acessos promissores a serem usados nos programas de melhoramento genético e pelos produtores interessados na cultura.

2.4. Formação e implementação de um banco de germoplasma

O melhoramento genético vegetal contribui expressivamente para os principais ganhos alcançados na agricultura ao longo dos anos, sendo, portanto, fundamental que se compreenda a dependência da amplitude da base genética disponível, dos materiais mantidos em bancos de germoplasma, sendo esses considerados insumos essenciais para o contínuo desenvolvimento da agricultura (LOPES; MELLO, 2005). Os recursos genéticos vegetais são um reservatório natural de genes com elevado

potencial de uso, no entanto, a busca por cultivares melhores e mais produtivas tem resultado num estreitamento da base genética, e uma das ações para evitar, ou pelo menos minimizar tal processo, é a conservação da variabilidade, que depende do germoplasma das espécies disponíveis nos bancos (CARVALHO et al., 2009).

Segundo Allard (1971), o termo germoplasma pode ser definido como a soma total dos materiais hereditários de uma espécie, podendo ser na forma de pólen, anteras, plantas, sementes, tecidos e células. Uma das tarefas mais importantes dentro dos programas de melhoramento é a conservação do germoplasma, por meio de bancos e coleções, nos quais são desenvolvidas atividades de coleta, documentação, caracterização, avaliação, preservação e intercâmbio dos materiais (BESPALHOK et al., 2007).

Devido a evidente diminuição da biodiversidade nas últimas décadas a adoção de iniciativas que visam o seu uso sustentável, como a criação de bancos de germoplasma surge como alternativa eficaz na manutenção da variabilidade genética (SILVA et al., 2012). As atividades de conservação que prevalecem nos bancos podem ser divididas em duas grandes áreas, não excludentes, mas complementares, que são a conservação *in situ* (no local de origem) e a conservação *ex situ* (fora do local de origem), que utiliza diferentes meios para manter a variabilidade genética, dentre eles, o uso de coleções (LOPES; MELLO, 2005).

Para que seja efetiva a conservação e uso do germoplasma, é indispensável que dados referentes a origem, caracterização e desempenho sejam documentados. A atividade de caracterização consiste em tomar dados para descrever, identificar e diferenciar acessos de uma mesma espécie, fazendo o uso de descritores que auxiliam na descrição das características das plantas (BARBIERI, 2013). A caracterização morfológica deve permitir a discriminação relativamente fácil entre fenótipos, disponibilizar informações úteis para o manejo e fornecer as primeiras estimativas de variabilidade dentro da coleção de germoplasma (BURLE; OLIVEIRA, 2010).

2.5. Melhoramento genético em *Physalis*

Para que o agricultor obtenha um produto final de qualidade, aliada a redução nos custos de produção, é necessário que existam plantas adaptadas às condições

de cultivo nas áreas produtoras. Para que isso ocorra, é necessário criar programas de melhoramento que produzam variedades a curto e médio prazo, utilizando genótipos cultivados e outros selecionados por meio de pesquisas (BETANCOURT et al., 2011).

De acordo com Faleiro et al. (2008), o pré-melhoramento pode ser definido como “as atividades orientadas para a identificação de características, funções biológicas, genes ou conjuntos gênicos desejáveis, em materiais não adaptados, semi-adaptados ou que não sofreram nenhuma forma de seleção, e sua mobilização para materiais potencialmente úteis a diferentes usuários de variabilidade genética”. Assim sendo, o pré-melhoramento é a alternativa mais promissora que funciona como uma ponte entre os recursos genéticos e os programas de melhoramento (NASS et al., 2001). Sendo usada como uma ferramenta definidora na escolha de materiais mais atrativos aos melhoristas, permitindo assim o desenvolvimento e disponibilidade de uma maior variabilidade a ser explorada, que possa garantir uma maior capacidade de resposta a superação de riscos e desafios, possibilitando alcançar patamares de qualidade e produtividade maiores (FALEIRO et al., 2008).

No tocante as condições ambientais, as espécies de *Physalis* desenvolvem-se em diversas condições agroecológicas e estão classificadas como espécies muito tolerantes, algo que é atribuído a sua adaptabilidade a diversos climas, e diversos tipos de solos (RUFATO et al., 2013; MOUTINHO et al., 2019). Para o Brasil ainda há poucos estudos, principalmente na região Nordeste onde predomina temperaturas mais elevadas e precipitação irregular (SILVA, 2016). Em relação ao manejo, de forma geral, as espécies apresentam cultivo considerado simples, com a maior parte das ações como tutoramento, adubação, aplicação de herbicidas e irrigação, ainda sendo feitas de forma semelhante ao que é implantado em cultivos de Solanáceas, tendo como referência o que é utilizado em cultivo de tomateiro (LIMA et al., 2009; RUFATO et al., 2013).

Como exposto por Santos (2019), no Brasil ainda são escassos os trabalhos referentes ao melhoramento genético da *Physalis*. Os principais estudos realizados concentra-se em questões de cultivo (FISCHER et al., 2005; CARDENAL; MALDONADO, 2012; RODRIGUES et al., 2013; SILVA, 2014; MELO et al., 2016; MOUTINHO et al., 2019; FISCHER et al., 2021), fenologia (LIMA, 2009; TANAM, 2015), e variabilidade genética (CHACÓN et al., 2016; TREVISANI et al., 2016;

TREVISANI, 2018; SANTOS, 2019; SILVA JÚNIOR et al., 2022), estes em sua maioria com enfoque em *Physalis peruviana* L. que é a espécie amplamente cultivada. A espécie *Physalis angulata* tem sido cada vez mais abordada em trabalhos acadêmicos, devido ao seu comprovado potencial farmacológico (SANTOS et al., 2008; LIMA, 2012; BATISTA, 2015; CHAVES, 2017).

Devido ao potencial que a cultura de *Physalis* apresenta, tanto na produção para consumo interno, quanto para a exportação da fruta, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos visando à melhoria do desempenho de caracteres que estão associados aos parâmetros que compõe o rendimento e a qualidade das frutas (COLLI, 2015). Outra necessidade existente é a seleção de espécies e variedades que apresentem maior teor de fisalinas, devido ao grande potencial para utilização na indústria farmacêutica (PEREIRA, 2011).

2.6. Diversidade genética

A diversidade genética pode ser conceituada como a quantidade de indivíduos geneticamente diferentes, em virtude de fatores herdáveis e/ou ambientais, pertencentes à mesma espécie. Uma espécie apresenta baixa variabilidade quando as informações contidas nos cromossomos entre seus indivíduos são muito semelhantes, ou existem poucas variações alélicas nos diferentes genes (SALOMÃO et al., 2019).

Para a caracterização da variabilidade, os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados, e são ainda hoje, a base do melhoramento genético convencional, em que características desejáveis são selecionadas nos genitores para os cruzamentos (GOMES FILHO et al., 2010; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Muitos pesquisadores fazem o uso de marcadores moleculares associados aos caracteres morfológicos para avaliar a variabilidade genética (SANTOS, 2019).

Quando se busca quantificar a diversidade genética, a caracterização morfológica é tida como a forma mais simples e prática a ser utilizada, sendo uma atividade indispensável em programas de melhoramento vegetal. Aliada a essa prática, a caracterização agrônômica se faz necessária no intuito de complementar as informações obtidas, principalmente quando um dos objetivos finais do programa de

melhoramento é a obtenção de variedades mais produtivas, ou que possuam resistências a patógenos (FALEIRO et al., 2020).

Trevisani et al. (2018) relatam que a restrita variabilidade genética é um fator preocupante, tanto para o processo de evolução das espécies quanto para o seu cultivo, principalmente se o crescente aumento no cultivo da *Physalis* for levado em consideração, tornando-se um grande obstáculo para os processos de seleção de genótipos com constituições genéticas superiores. Diante disso, a caracterização morfológica e molecular dos genótipos se faz necessária, visando tanto a adequada utilização destes recursos, quanto a inserção de novos acessos em programas de melhoramento genético do gênero (SOUZA, 2015).

2.7. Metabólitos secundários em Solanaceae

As plantas produzem grande variedade de estruturas químicas, que são sintetizadas em diversas etapas enzimáticas especializadas. Contudo, é importante salientar que grande parte da evolução desse maquinário biosintético ainda não é elucidado (JUNKER et al., 2013).

O volume de informações disponíveis na literatura referente aos metabólitos secundários produzidos pela família Solanaceae, pode contribuir na elucidação da classificação taxonômica de seus representantes, a níveis de subespécie, espécie ou até mesmo a nível de gênero. Os alcalóides e derivados de esteroides são referidos como as principais classes de metabólitos secundários presente nas Solanaceae, com destaque para alcaloides tropânicos (TAs) e calisteginas (CAs) por apresentarem um padrão de distribuição e ocorrência em cinco das seis subfamílias, que os estabelece como marcadores quimiotaxonômicos na família (HUNZIKER, 2001; PIGATTO et al., 2015). Na literatura já é referida a presença de calisteginas e alcalóides de tropano para espécies de *Physalis*, como em *P. divaricata* (MOALLEM et al., 2017), *P. peruviana* e em *P. alkekengi* (TEUBER et al., 2007).

Diversos metabólitos secundários apresentam valor econômico e algumas aplicações, seja na produção de alimentos, cosméticos, fármacos ou até agroquímicos (CORRÊA, 2015). Paulo et al. (2019) apontam que a compreensão acerca da química envolvida nas vias de biossíntese e da biologia dos organismos produtores é

indispensável quando se visa a obtenção de modificações estruturais a partir da informação genética.

2.8. Bioinformática

Segundo Faleiro et al. (2011), a bioinformática pode ser definida como o estudo e a aplicação de técnicas computacionais e matemáticas à geração e gerenciamento de informações biológicas, em especial, da biologia molecular, que pode combinar informações de química, física, biologia, ciência da computação e matemática/estatística para processar dados biológicos. A expansão do uso da bioinformática como ferramenta no melhoramento genético vegetal pode ser atribuída aos avanços tecnológicos significativos observado ao longo dos anos, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de ferramentas capazes de suprir a enorme quantidade de dados gerados, que necessitam ser armazenados e analisados (GIACHETTO; HIGA, 2014).

Na bioinformática os dados a serem utilizados englobam sequências de DNA de genes ou genomas completos, sequências de aminoácidos de proteínas, e estruturas tridimensionais de proteínas, ácidos nucleicos e de complexos de proteínas-ácidos nucleicos (LESK, 2019). As inúmeras informações geradas por esses dados, possibilitam uma maior compreensão acerca dos processos biológicos, como mudanças no nível de expressão gênica, localização de proteínas e de suas interações com outros genes e proteínas, e como são afetados os pools de metabólitos em diversos tecidos. Essas evidências tem a bioinformática como uma das suas ferramentas, tornando-a necessária no melhoramento vegetal (VASSILEV et al., 2005). Toda a informação gerada é disponibilizada, armazenada e organizada em bancos de dados online para que outros pesquisadores tenham acesso, destacando-se os bancos de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), como um dos maiores, e o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) um dos bancos de dados biológicos mais conhecidos (FERREIRA, 2017; SILVA et al., 2020).

Dentre as suas diversas aplicabilidades, a bioinformática pode ser usada na previsão da estrutura proteica a partir da sequência de aminoácidos, também sendo possível prever as suas interações, devido ao fato de que os complexos proteína-

proteína mostrarem boa complementaridade na forma e polaridade da superfície. As previsões são realizadas por meio de programas computacionais que simulam essas interações para prever a relação espacial ideal (LESK, 2019). A determinação dessa estrutura proteica fornece uma melhor compreensão do funcionamento da proteína, permitindo criar proposições sobre como afetá-la, controlá-la ou modificá-la (SILVA et al., 2021).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A. C. S.; NASS, L. L. The state of use. *In*: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (ed.). **The state of Brazil's plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture**. Brasília: Embrapa Technological Information, 2009. p. 81-129.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 381 p.

ALVARENGA, A. M. *Physalis*: alto valor agregado e nutracêutico. **A lavoura**, Rio de Janeiro, ano 119, n. 716, p. 26-31, 2016.

ANDRADE, L. *Physalis* ou uchuva – Fruta da Colômbia chega ao Brasil. **Revista Rural**, São Paulo, v. 38, p. 11-12, 2008.

ARAUJO, L. F. **Estudo genético e citogenético de duas espécies do gênero *Physalis* (Solanaceae)**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

ÁVILA, A. J.; MORENO, P.; FISCHER, G.; MIRANDA, D. Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18°C. **Acta Agronómica Colombiana**, Palmira, v. 55, n. 4, p. 29-38, 2006.

AZEVEDO, B. S.; POSSAMAI, L. M.; TIMMERS, L. F. S. M.; CACERES, R. A. Biología estructural. *In*: AVILA E SILVA S.; NOTARI D. L.; DALL'ALBA G. **Bioinformática: contexto computacional e aplicações**. Caxias do Sul: EducS, 2020. p. 209-221.

BARBIERI, R. L. Caracterização de germoplasma - critérios para estabelecimento de descritores. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 25, p. 17-21, 2013.

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

BASTOS, G. N.; SILVEIRA, A. J.; SALGADO, C. G.; PIKANÇO-DINIZ, D. L.; NASCIMENTO, J. L. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, County Clare, v. 118, n. 2, p. 246-251, 2008.

BATISTA, G. B. **Structural and functional in silico analysis of a *Physalis angulata* osmotin-like pr-5 with potential pharmacological activity**. 2015. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015.

BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. (org.). **Melhoramento de Plantas**. Curitiba: UFPR, 2007. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%203.pdf>. Acesso em: 22 set. 2022.

BETANCOURT, E. S.; ARIAS, F. L. G.; PEÑARANDA, L. S.; MARROQUIN, M. G.; ZARANTES, V. M. N. **Producción de Plantas Genéticamente Puras de Uchuva**. Bogotá: Kimpres, 2011. 44 p.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. S. P. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Caracterização morfológica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 15 p.

CAMACHO, G. O. Procesamiento. In: FLÓREZ, V. J.; FISCHER, G.; SORA, A. D. (ed.). **Producción, Poscosecha y Exportación de La Uchuva**. Bogotá: Universidad Nacional de Colômbia, 2000. p. 129-145.

CARDENAL, L. Y. R.; MALDONADO, J. C. P. Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. **Ciencia en Desarrollo**, Boyacá, v. 4, n. 1, p. 71-86, 2012.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 19 p.

CHACÓN, M.; SÁNCHEZ, Y.; BARRERO, L. Genetic structure of a Colombian Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) collection by means of microsatellite markers. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 34, n. 1, p. 5-16, 2016.

CHAVES, A. C. **Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* na região de pelotas, RS**. 2006. 65 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

CHAVES, M. C. **Mecanismos reprodutivos em *Physalis angulata* L.** 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.

COLLI, M. P. **Componentes de rendimento e características físico-químicas de fruto em genótipos de fisális submetidos a diferentes espaçamentos**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2015.

CORRÊA, J. A. M. **Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos**. 2015. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

COSTA, A. M. Prospecção gênica e bioinformática. *In*: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. E. M.; REIS JUNIOR, F. B. (ed.). **Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 121-141.

Emater-DF testa cultivo de fruta usada em doces finos e que custa até R\$ 70 o quilo.

Agência Brasília, Brasília, 2019. Disponível em:

[https://www.agenciabrasilia.df.gov.br/2019/07/12/emater-df-testa-cultivo-de-fruta-usada-em-doces-finos-e-que-custa-ate-r-70-o-](https://www.agenciabrasilia.df.gov.br/2019/07/12/emater-df-testa-cultivo-de-fruta-usada-em-doces-finos-e-que-custa-ate-r-70-o-quilo/#:~:text=No%20Brasil%2C%20S%C3%A3o%20Paulo%2C%20Santa,da%20Col%C3%B4mbia%2C%20maior%20produtor%20mundial.&text=A%20physalis%20pode%20ser%20plantada%20a%20campo%20ou%20sob%20cultivo%20protegido)

[quilo/#:~:text=No%20Brasil%2C%20S%C3%A3o%20Paulo%2C%20Santa,da%20Col%C3%B4mbia%2C%20maior%20produtor%20mundial.&text=A%20physalis%20pode%20ser%20plantada%20a%20campo%20ou%20sob%20cultivo%20protegido](https://www.agenciabrasilia.df.gov.br/2019/07/12/emater-df-testa-cultivo-de-fruta-usada-em-doces-finos-e-que-custa-ate-r-70-o-quilo/#:~:text=No%20Brasil%2C%20S%C3%A3o%20Paulo%2C%20Santa,da%20Col%C3%B4mbia%2C%20maior%20produtor%20mundial.&text=A%20physalis%20pode%20ser%20plantada%20a%20campo%20ou%20sob%20cultivo%20protegido).

Acesso em: 26 jan. 2023.

FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 183 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso. *In*: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. E. M.; REIS JÚNIOR, F. B. (ed.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 513-551.

FALEIRO, F. G.; OLIVEIRA, J. S.; WALTER, B. M. T.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Banco de germoplasma de *Passiflora* L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização**. Brasília: ProImpress, 2020. 140 p.

FERREIRA, M. Fruta nativa para fugir da seca. **Jornal Zero Hora**, Porto Alegre, n. 1. 2006.

FERREIRA, M. A. M. **Bioinformática como ferramenta no melhoramento genético de plantas**. 2017. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

FISCHER, G.; MIRANDA, D.; PIEDRAHÍTA, W.; ROMERO, J. **Avances en cultivo, poscosecha y exportacion de la uchuva (*Physalis peruviana* L.)**. Bogotá: Universidade Nacional da Colombia, 2005. 222 p.

FISCHER, G.; ALMANZA-MERCHÁN, P. J.; MIRANDA, D. Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 01-15, 2014.

FISCHER, G.; MIRANDA, D.; MAGNITSKIY, S.; BALAGUERA-LÓPEZ, H. E.; MOLANO, Z. **Avances en el cultivo de las berries en el trópico**. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2021. 112 p.

GIACHETTO, P. F.; HIGA, R. H. Bioinformática aplicada à agricultura. *In*: MASSRUHÁ, S. M. F. S.; LEITE, M. A. A.; LUCHIARI JUNIOR, A.; ROMANI, L. A. S. (ed.). **Tecnologias da informação e comunicação e suas relações com a agricultura**. Brasília: Embrapa, 2014. p. 67-83.

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

GOMES FILHO, A.; OLIVEIRA, J. G.; VIANA, A. P.; SIQUEIRA, A. P. O.; OLIVEIRA, M. G.; PEREIRA, M. G. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 627-633, 2010.

GOULART JUNIOR, R.; REITER, J. M. W.; MONDARDO, M.; SÁ, M. A.; FELICIANO, A. M. **Relatório de projeto LF 2017/18 – Fruticultura catarinense: indicadores regionais**. Florianópolis: Epagri, 2020. 64 p.

GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, L. A.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. B. C.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 84-87, 2009.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system**. Germany: A.R.G. Gantner, Ruggell, 2001. 500 p.

JANUÁRIO, A. H.; RODRIGUES FILHO, E.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 445-448, 2002.

JUNKER, A.; FISCHER, J.; SICHHART, Y.; BRANDT, W.; DRÄGER, B. Evolution of the key alkaloid enzyme putrescine N-methyltransferase from spermidine synthase. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 4, n. 260, p. 1-12, 2013.

LEE, H. Z.; LIU, W. Z.; HSIEH, W. T.; TANG, F. Y.; CHUNG, J. G.; LEUNG, H. W. C. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata* - induced apoptosis in human oral cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 561-570, 2009.

LESK, A. M. **Bioinformatics**. Encyclopaedia Britanica, 2019. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/bioinformatics>. Acesso em: 10 fev. 2021.

LIGARRETO, G.; LOBO M.; CORREA, A. Recursos genéticos del género *Physalis* en Colombia. In: FISCHER, G.; MIRANDA, D.; PIEDRAHÍTA, W.; ROMERO, J. (eds.). **Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia**. Bogotá: Universidade Nacional da Colombia, 2005. p. 9-27.

LIMA, C. S. M. **Fenologia, sistemas de tutoramento e produção de *Physalis peruviana* na região de Pelotas, RS.** 2009. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

LIMA, C. S. M.; SEVERO, J.; MANICA-BERTO, R.; SILVA, J. Á.; RUFATO, L.; RUFATO, A. R. Características físico-químicas de *Physalis* em diferentes colorações do cálice e sistemas de condução. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p.1060-1068, 2009.

LIMA, M. S. **Caracterização farmacológica da atividade antinociceptiva das fisalinas.** 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

LOPES, M. A.; MELLO, S. C. M. **Estratégias para melhoria, manutenção e dinamização do uso dos bancos de germoplasma relevantes para a agricultura brasileira.** Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2005. 45 p.

LOPES, D. C. D. X. P.; FREITAS, Z. M. F.; SANTOS, E. P.; TOMASSINI, T. C. B. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Seropédica, v. 16, n. 2, p. 206-210, 2006.

LOPES, J. F.; CARVALHO, S. I. C. A variabilidade genética e o pré-melhoramento. *In*: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. p. 65-74.

MACHADO, T. F.; MONTEIRO, E. R.; TIECHER, T. Chemical, physicochemical and antioxidant stability of freezing pasteurized and unpasteurized pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 22, e2017149, 2019.

MARTÍNEZ, M. Revision of *Physalis* section *Epeteiorhiza* (Solanaceae). **Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México**, v. 69, n. 2, p. 71–177, 1998.

MELO, R. A. C.; BOTREL, N.; MADEIRA, N. R.; AMARO, G. B.; AZEVEDO, U. S. **Avaliação de acessos de fisális sob duas formas de condução de plantas em sistema agroecológico**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2016. 30 p.

MIRANDA, D.; FISCHER, G. Avances tecnológicos en el cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia. *In*: FISCHER, G.; MIRANDA, D.; MAGNITSKIY, S.; BALAGUERA-LÓPEZ, H. E.; MOLANO, Z. (ed.). **Avances en el cultivo de las berries en el trópico**. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2021. p. 14-36.

MOALLEM, E.; GHASEMIPIRBALOUTI, A.; NEJADSATTARI, T.; IRANBAKHSH, A.; MEHREGAN, I. Evaluation of expression analysis of putrescine n-methyltransferase gene during different stages of growth in the medicinal plant *Physalis divaricata* (Solanaceae). **Biodiversitas**, Belo Horizonte, v. 18, n. 4, p. 1430-1437, 2017.

MOURA, J. N.; CAIRES, C. S. A família Solanaceae Juss. no município de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. **Paubrasilia**, Porto Seguro, v. 4, e0049, 2021.

MOUTINHO, D.; FILIPE, J.; CABRAL, R. **A cultura da *Physalis***. Portugal: CNA – Confederação Nacional da Agricultura, 2019. 15 p.

MUNIZ, J.; MOLINA, A. R.; MUNIZ, J. *Physalis*: Panorama produtivo e econômico no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 1-1, 2015.

NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57 n. 3, p. 581-587, 2000.

NASS, L. L.; MIRANDA FILHO, J. B.; SANTOS, M. X. Uso de germoplasma exótico no melhoramento. *In*: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 101-122.

PAULO, B. S.; SIGRISTA, R.; OLIVEIRA, L. G. Avanços recentes em biossíntese combinatória de policetídeos: perspectivas e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 71-83, 2019.

PEREIRA, D. M. S. **Cultivo in vitro e análise qualitativa da fisalina d em *Physalis angulata* L.** 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

PIGATTO, A. G. S.; BLANCO, C. C.; MENTZ, L. A.; SOARES, G. L. G. Tropane alkaloids and calystegines as chemotaxonomic markers in the Solanaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 2139-2149, 2015.

RAMADAN, M. F. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. **Food Research International**, Ottawa, v. 44, n. 7, p. 1830-1836, 2011.

RIBEIRO, I. M.; SILVA, M. T. G.; SOARES, R. D. A.; STUTZ, C. M.; BOZZA, M.; TOMASSINI, T. C. B. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation from it's stems and fruit capsules. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Seropédica, v. 12, supl., p. 21-23, 2002.

RODRIGUES, F. A. **Caracterização físico-química e anatômica de *Physalis peruviana* L.** 2011. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

RODRIGUES, F. A.; PENONI, E. S.; SOARES, J. D. R.; SILVA, R. A. L.; PASQUAL, M. Caracterização fenológica e produtividade de *Physalis peruviana* cultivada em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 6, p. 1771-1777, 2013.

RUFATO, A. R.; RUFATO, L.; LIMA, C. S. M.; MUNIZ, J. A cultura da *Physalis*. In: KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L.; PELIZZA, T. R. (org.). **Pequenas frutas**. Florianópolis: UDESC, 2013. p. 172-238.

SALOMAO, N. A.; SANTOS, I. R. I.; JOSÉ, S. C. B. R.; WALTER, B. M. T.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; GIMENES, M. A.; TEIXEIRA, F. F.; CASTRO, C. S. P.; MAZZOCATO, A. C.; GOEDERT, C. O. Princípios e conceitos sobre recursos genéticos. In: PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; SALOMÃO, N. A.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. A. (eds.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. p. 19-38.

SAMUELS, J. Biodiversity of food species of the Solanaceae family: a preliminary taxonomic inventory of subfamily Solanoideae. **Resources**, Basel, v. 4, n. 2, p. 277-322, 2015.

SANTOS, J. A. A.; TOMASSINI, T. C. B.; XAVIER, D. C. D.; RIBEIRO, I. M.; SILVA, M. T. G.; MORAIS-FILHO, Z. B. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 425-428, 2003.

SANTOS, R. A.; CABRAL, T. R.; CABRAL, I. R.; ANTUNES, L. M.; ANDRADE, C. P.; CARDOSO, P. C. S.; BAHIA, M. O.; PESSOA, C.; NASCIMENTO, J. L. M.; BURBANO, R. R.; TAKAHASHI, C. S. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell**, Mendoza, v. 32, n. 2, p. 195-200, 2008.

SANTOS, K. S. **Estudo genético e aspectos reprodutivos em espécies do gênero *Physalis***. 2018. 93 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

SANTOS, M. **Sensibilidade de *Physalis peruviana* a mutagênicos químicos e físicos**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2019.

SEIXAS, F. A. V.; PIMENTEL, A. L.; BUENO, S. A. **Ferramentas de bioinformática na caracterização de alvos de medicamentos**. *In*: VI Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular. Universidade Estadual de Maringá, 2016. 67 p.

SILVA, A. R.; SOUZA, A. L. P.; SANTOS, E. A. A.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SOUZA, P. C.; CASTELO, T. S. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, Ceará, v. 22, n. 1, p. 219-234, 2012.

SILVA, D. F. **Utilização de malhas de sombreamento coloridas na produção de malhas e frutos de espécies do gênero *Physalis* L.** 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Botânica aplicada) – Universidade de Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SILVA, N. S. **Crescimento e desenvolvimento de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hormen em diferentes condições de luminosidade**. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.

SILVA, H. K. **Seleção de descritores e divergência genética entre acessos de fisális (*Physalis angulata* L.)**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

SILVA, A. S.; NOTARI, D. L.; DALL'ALBA, G. **Bioinformática: contexto computacional e aplicações**. Caxias do Sul: EDUCS, 2020. 299 p.

SILVA, L. X.; BASTOS, L. L.; SANTOS, L. H. Modelagem computacional de proteínas. **BIOINFO – Revista Brasileira de Bioinformática**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1-38, 2021.

SILVA JÚNIOR, A. D.; ZEIST, A. R.; LEAL, M. H. S.; OLIVEIRA, J. N. M.; OLIVEIRA, G. J. A.; TOROCO, B. R.; SILVA, D. F.; NOGUEIRA, A. F. Divergência genética em espécies e híbridos interespecíficos de *Physalis* baseada em caracteres morfoagronômicos. **Research, Society and Development**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 1-17, 2022.

SOARES, M. B. P.; BELLINTANI, M. C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. C. B.; SANTOS, R. R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 459, n. 1, p. 107-112, 2003.

SOARES, M. B. P.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L. A.; BELLINTANI, M. C.; PAIVA, F. P.; RIBEIRO, Y. M.; TOMASSINI, T. C. B.; SANTOS, R. R. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 408-414, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. 291 p.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Maringá, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

STEHMANN, J. R.; MENTZ, L. A.; AGRA, M. F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L.; RODRIGUES, I. M. C. **Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim

Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14696>. Acesso em: 20 mar. 2021.

TANAN, T. T. **Fenologia e caracterização dos frutos de espécies de *Physalis* cultivadas no semiárido baiano**. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

TEUBER, M.; AZEMI, M. E.; NAMJOYAN, F.; MEIER, A. C.; WODAK, A.; BRANDT, W.; DRÄGER, B. Putrescine N-methyltransferases a structure function analysis. **Plant molecular biology**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 787-801, 2007.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.

TREVISANI, N.; SCHMIT, R.; BECK, M.; GUIDOLIN, A. F.; COIMBRA, J. L. M. Selection of fisális populations for hybridizations, based on fruit traits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 38, n. 2, e-568, 2016.

TREVISANI, N. **Citogenética, endogamia e heterose em fisális (*Physalis peruviana* L.) cultivado**. 2018. 93 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

TREVISANI, N.; MELO, R. C.; BERNARDY, J. P. F.; PIERRE, P. M. O.; COIMBRA, J. L. M.; GUIDOLIN, A. F. Mutation induction as a strategy to overcome the restricted genetic base in *Physalis*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 40, n. 3, e-029, 2018.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

VASSILEV, D.; LEUNISSEN, J.; ATANASSOV, A.; NENOV, A.; DIMOV, G. Application of bioinformatics in plant breeding. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, [s. l.], v. 19, supl., p. 139-152, 2005.

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

ZIMMER, T. B. R. ***Physalis pubescens* L: Avaliação físico química, bioativa, antioxidante, antimicrobiana e antitumoral de frutos oriundos da região Sul do Rio Grande do Sul.** 2019. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

CAPITULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Physalis* L. EM ACESSOS CONSERVADOS EX SITU

Artigo a ser enviado para publicação na Revista Ceres

Qualis B1 – Ciências Agrárias I

Caracterização morfológica e diversidade genética de *Physalis* L. em acessos conservados ex situ

B.R.A. Gama^{1,3}, A.V.V. Montarroyos^{1,3} e L.S.S. Martins^{2,3}

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Autor correspondente: B.R.A. Gama

E-mail: beatrizrayrana@gmail.com

RESUMO

Physalis L. é um gênero pertencente à família Solanaceae, que compreende aproximadamente 100 espécies. No Brasil são referidas oito espécies, distribuídas por todos os biomas. O gênero engloba um grupo economicamente importante, com uso na alimentação humana, na produção de substâncias farmacológicas e na ornamentação. No entanto, no Brasil, estudos referentes ao melhoramento genético de *Physalis* ainda são escassos, o que dificulta a sua expansão de cultivo. A avaliação da diversidade genética presente em bancos de germoplasma fornece informações sobre potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento. O estudo tem como objetivo realizar a caracterização morfológica preliminar de acessos conservados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Physalis* L., localizado da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), utilizando diferentes métodos de agrupamento para a estimativa da variabilidade genética existente. Foram utilizadas sementes de *Physalis peruviana* L., obtida comercialmente, e de acessos provenientes de seis estados do Brasil. Foram utilizados 21 descritores qualitativos. Por meio dos métodos de Tocher e hierárquico via UPGMA, constatou-se a existência de variabilidade genética entre os acessos. Os descritores morfológicos utilizados foram capazes de diferenciar os acessos, bem como separar de forma clara os acessos mais próximos, podendo ainda inferir a existência de duplicadas. Os dados obtidos no presente estudo podem auxiliar no manejo, avaliação e seleção de genótipos de interesse para futuros programas de melhoramento de *Physalis*.

Palavras-chave: banco de germoplasma; descritor morfológico; fisális; variabilidade genética.

ABSTRACT

Physalis L. is a genus belonging to the Solanaceae family, which comprises approximately 100 species. In Brazil, eight species are identified, distributed throughout all biomes. The genus include an economically important group, with use in human food, production of pharmacological substances, and ornamentation. However, in Brasil, studies concerning the breeding of *Physalis* in Brazil are still scarce, which hinders its cultivation expansion. The evaluation of genetic diversity present in genebanks provides information about potential parentes to be used in breeding programs. The study aims to perform a preliminary morphological characterization of accessions conserved in the Active Germplasm Bank (BAG) of *Physalis* L., located at the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), using different grouping methods to estimate the existing genetic variability. Seeds of *Physalis peruviana* L., obtained commercially, and genotypes from six states of Brazil were used. Twenty-one qualitative descriptors were used. Through the methods of Tocher and hierarchical via UPGMA, the existence of genetic variability among the acessions was verified. The morphological descriptors used were able to differentiate the accessions, as well as clearly separate the closest accessions, and also infer the existence of duplicates. The data obtained in this study can help in the management, evaluation and selection of genotypes of interest for future *Physalis* breeding programs.

Key words: genebank; morphological descriptor; fisális; genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Physalis* L., pertencente à família Solanaceae, é formado por aproximadamente 90 espécies. Com exceção de *Physalis alkekengi* L., que é euroasiática, todos os demais representantes ocorrem na América, com o México sendo o centro de diversidade deste gênero (Hunziker, 2001). No Brasil são referidas oito espécies, distribuídas por todas as regiões do país, ocorrendo em diferentes biomas, indo desde a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, até o Pampa (Stehmann *et al.*, 2015).

Os representantes do gênero podem ser facilmente reconhecidos pela presença de um cálice de frutificação que envolve e protege o fruto contra insetos, pássaros, patógenos e condições climáticas adversas, servindo ainda como fonte de carboidratos (Martínez, 1998; Ávila *et al.*, 2006). O gênero engloba um grupo com grande importância econômica, podendo ser utilizado na alimentação humana, na produção de substâncias farmacológicas e na

ornamentação (Muniz *et al.*, 2015). Os frutos possuem um sabor açucarado, rico em vitamina A e C, fósforo e ferro, além de flavonóides, alcalóides e fitoesteróides (Tanan, 2015).

As espécies de *Physalis* não são facilmente distinguíveis, podendo ser taxonomicamente confuso até mesmo para especialistas, por esta razão, várias espécies têm sido identificadas erroneamente (Kindscher *et al.*, 2012). Aliado a isso, sabe-se que os estudos de melhoramento genético de *Physalis* no Brasil, ainda são escassos, sendo a falta de cultivares melhoradas e registradas no país, um entrave para a expansão e o aumento da produção (Santos, 2019).

A existência da variabilidade genética é o principal ponto de partida para o início do melhoramento genético de qualquer espécie (Faleiro *et al.*, 2008). Portanto, a avaliação da diversidade genética entre os acessos de um banco de germoplasma fornece informações sobre potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento (Costa *et al.*, 2011). Bonett *et al.* (2006) apontam que a identificação de genitores superiores pode ser realizada por meio da avaliação de caracteres morfológicos e agrônômicos, que permitam caracterizar e estimar a divergência genética existente dentro e entre as espécies vegetais.

Diante do que foi exposto, o presente estudo tem como objetivo realizar a caracterização morfológica preliminar de acessos conservados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Physalis* L., localizado da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), utilizando diferentes métodos de agrupamento para a estimativa da variabilidade genética existente entre os acessos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo e germoplasma avaliado

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Plantas Daninhas e em telado da Área de Fitotecnia, do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, sediada na cidade do Recife, nas coordenadas 8° 04' 03'' S, 34° 55' 00'' W, com uma altitude de 4 m. Segundo classificação de Köppen, o clima é considerado tropical (Ams) com precipitação abundante no outono-inverno e uma estação seca entre outubro e dezembro. As avaliações do germoplasma selecionado ocorreram no período de Novembro de 2021 a Janeiro de 2022.

Os genótipos avaliados foram provenientes da germinação de sementes de *Physalis peruviana* L., obtida comercialmente, e de acessos provenientes de seis estados do Brasil

(Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Paraná, Rio Grande do Sul e Rondônia) (Tabela 1), que fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma de *Physalis*, localizado na UFRPE. Todos os materiais foram plantados e mantidos em telado para a realização da caracterização morfológica.

Tabela 1. Procedência dos acessos de *Physalis* conservados no Banco Ativo de Germoplasma, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Recife-PE, 2022

Registro na UFRPE	Procedência
BGP02	Colômbia (Bogotá)
BGP03	Brasil (Paulista – PE)
BGP11	Brasil (São José dos Pinhais – PR)
BGP12	Brasil (Ouro Preto do Oeste – RO)
BGP16	Brasil (Recife – PE)
BGP18	Brasil (Correntina – BA)
BGP20	Brasil (Caxias do Sul – RS)
BGP23	Brasil (Limoeiro – PE)
BGP24	Brasil (Passos – MG)
BGP25	Brasil (Carpina – PE)

Condução das plantas em telado

As sementes dos acessos (Tabela 1) foram semeadas em bandejas de polipropileno de 128 células, contendo substrato comercial Basaplant®. Quando as mudas atingiram cerca de 4,0 cm de altura foram transplantadas para vasos plásticos de 0,5 L. Posteriormente, ao atingirem 25 cm, as plantas foram transplantadas para vasos de 5,0 L, contendo mistura de solo, composto (esterco) e substrato comercial (Basaplant®), na proporção de 1:1:1. Os vasos foram irrigados diariamente, exceto em dias chuvosos. Semanalmente, foi realizado o controle de plantas daninhas e de pragas, além da retirada das folhas e plantas com sintomas de doenças.

Para a obtenção dos dados morfológicos, adotou-se como padrão de análise o intervalo de 28–29 dias após o início da floração. Os frutos, foram colhidos manualmente, de forma aleatória e em diversas posições e orientações na planta, em dois estádios de maturação determinados pela coloração do cálice: verde e marrom. Posteriormente, no laboratório e sob

água corrente as sementes foram removidas da polpa e colocadas sobre papel toalha em temperatura ambiente para a realização das demais avaliações.

Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica das espécies foram utilizados 21 descritores qualitativos (Tabela 2) propostos por González *et al.* (2008), para *P. peruviana*, com ajustes, considerando-se três plantas por acesso, com 10 frutos cada.

Tabela 2. Descritores morfológicos qualitativos avaliados nos acessos de *Physalis* L conservados no Banco Ativo de Germoplasma, localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Recife-PE, 2022

Descritores Qualitativos	Estado do Descritor
Hábito de crescimento (HC)	(1) Ereto; (2) Semi-ereto; (3) Prostrado
Cor do caule (CC)	(1) Verde; (2) Púrpura
Pubescência do caule (PC)	(1) Ausente; (2) Pouco; (3) Média; (4) Abundante
Forma do Caule (FC)	(1) Anguloso; (2) Arredondado
Forma da folha (FF)	(1) Cordada; (2) Assimétrica; (3) Lanceolada; (4) Oval
Forma da base foliar (FB)	(1) Cuneada; (2) Oblíqua; (3) Cordada; (4) Sub-cordada
Forma da margem foliar (FMF)	(1) Denticulada; (2) Sinuada; (3) Seriada; (4) Ondulada
Forma do ápice foliar (FA)	(1) Agudo; (2) Apiculado; (3) Acuminado
Antocianina na venação foliar (AVF)	(1) Ausente; (2) Presente
Cor da corola (Ccor)	(1) Branca; (2) Amarela
Cor das máculas da corola (CMC)	(1) Marrom-claro; (2) Marrom-escuro (3) Púrpura; (4) Ausente
Posição da Flor (Pfl)	(1) Ereta; (2) Pêndula

Cor do cálice imaturo (CCI)	(1) Verde sem antocianina; (2) Verde com antocianina leve; (3) Verde com antocianina forte
Cor do cálice maduro (CCM)	(1) Amarelo-alaranjado; (2) Amarelo-amarronzado
Forma do cálice (FCAL)	(1) Globoso; (2) Alongado; (3) Achatado
Cor do fruto imaturo (CFI)	(1) Verde; (2) Verde-amarelado; (3) Verde-arroxeadado
Cor do fruto maduro (CFM)	(1) Verde; (2) Amarelo; (3) Amarelo-alaranjado; (4) Alaranjado; (5) Verde-arroxeadado; (6) Arroxeadado
Forma do fruto (Ffr)	(1) Globoso; (2) Oval; (3) Achatado
Presença de cera nos frutos (PCF)	(1) Ausente; (2) Presente
Forma da semente (FS)	(1) Elipsoide; (2) Globosa; (3) Oblonga; (4) Triangular
Cor da Semente (CS)	(1) Amarela clara; (2) Alaranjada; (3) Marrom escura; (4) Castanho Ferrugíneo

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de divergência genética pelo procedimento para dados multicategóricos. Essa metodologia consiste na obtenção da matriz de dissimilaridade com base nas concordâncias e/ou discordâncias observadas entre os acessos, utilizando-se a moda, como medida descritiva de cada variável, desconsiderando as repetições e contabilizando todas as plantas representativas de cada genótipo (Monteiro *et al.*, 2010).

Posteriormente, foram realizadas as análises pelos métodos de agrupamento de otimização de Tocher, e hierárquico via UPGMA, para formação do dendrograma. Para a estimativa do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal & Rohlf (1962). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa Genes (Cruz, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se a existência de variabilidade genética entre os acessos avaliados por meio da análise multicategórica. Utilizando o método da ligação média entre grupos (UPGMA) identificou-se a formação de quatro grupos, considerando a distância genética a 47.1% estabelecida no ponto de corte, seguindo o critério mencionado por Cruz & Carneiro (2003), no qual os pontos de alta mudança de nível são considerados delimitadores do número de genótipos para a formação de determinado grupo. O dendrograma obtido a partir dos dados qualitativos referentes aos dez acessos em estudo pode ser visualizado na Figura 1.

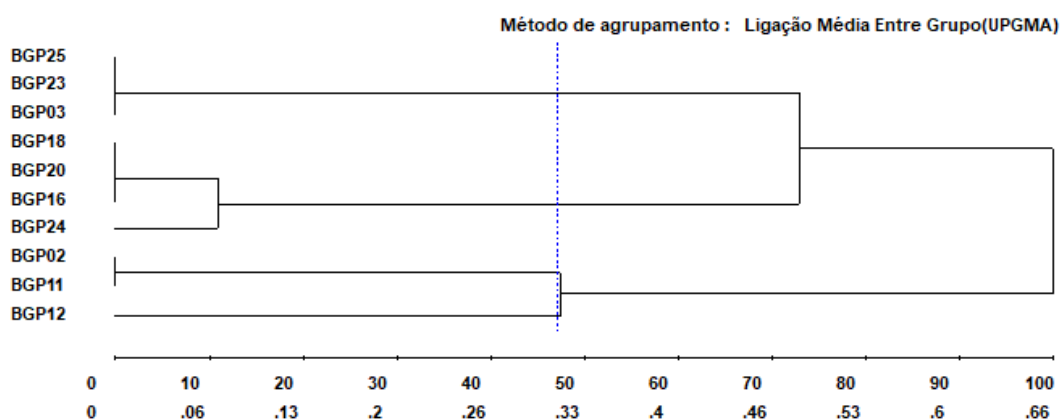


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA baseado na matriz de dissimilaridade dos descritores em acessos de *Physalis*, pertencentes ao banco de germoplasma da UFRPE.

O grupo (I) é formado pelos acessos BGP03, BGP23 e BGP25, todos oriundos de Pernambuco. Os genótipos pertencentes a este grupo compartilham características relacionadas a ausência de máculas na corola, e cor do fruto maduro que os diferenciam dos demais acessos avaliados.

O grupo II compreende 40% dos acessos, sendo este o maior grupo formado e composto pelos acessos BGP16, BGP18, BGP20 e BGP24, que compartilham todas as características avaliadas, exceto a forma da folha que no acesso BGP24 é oval. Quanto a origem, esse grupo é composto por acessos de Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Sul e Minas Gerais.

O grupo (III) é composto pelos genótipos BGP02, oriundo da Colômbia, e BGP11, oriundo do Paraná, que apresentam alta similaridade entre si, o que é corroborado pelo fato de compartilharem todos os descritores analisados. Já o grupo (IV) é formado por apenas um acesso, sendo este o BGP12, oriundo de Rondônia, caracterizado pela cor da semente e hábito de crescimento diferenciados.

Com o intuito de avaliar o grau de ajuste entre as matrizes de dissimilaridade e as matrizes resultantes dos agrupamentos, para construção do dendrograma, foi obtida a estimativa do coeficiente de correlação cofenética (CCC), tendo em vista que quanto maior o valor do coeficiente, menor é a distorção provocada ao se agrupar os genótipos (Bussab *et al.*, 1990). O método UPGMA indicou uma boa representação das distâncias no dendrograma (CCC = 0,98).

Diferentemente do método hierárquico UPGMA, o método de otimização de Tocher originou três agrupamentos, com diferenças na distribuição dos acessos, como mostra a Tabela 3. Apesar de ambos os métodos (Tocher e UPGMA) terem sido parcialmente concordantes no que diz respeito à divergência genética da maioria dos acessos, um novo grupo é formado pelos acessos BGP02, BGP11 e BGP12, o que pode ser justificado devido ao fato de compartilharem a maioria dos descritores avaliados. No entanto, o acesso BGP12 apresenta algumas características singulares que o diferencia dos demais, como hábito de crescimento e cor da semente, com isso, pode ser atribuído ao método UPGMA um caráter mais discriminativo na diferenciação dos acessos em estudo.

Tabela 3. Agrupamento pelo método de otimização de Tocher resultante da análise de 10 acessos de *Physalis*. Recife-PE, 2022

Grupo	Acessos
I	BGP02; BGP11; BGP12
II	BGP03; BGP23; BGP25
III	BGP16; BGP18; BGP20; BGP24

O uso de dois métodos de agrupamento, fornece um suporte mais eficiente na discriminação dos acessos. Destaca-se o fato de que ambos os métodos se mostraram eficientes no que diz respeito à identificação dos acessos mais dissimilares. Como abordado por Bertan *et al.* (2006), o agrupamento de Tocher prioriza sempre as maiores distâncias entre grupos em relação à distância dentro dos grupos, enquanto o UPGMA utiliza a média das distâncias entre todos os genótipos para formação de cada grupo, podendo assim o uso em conjunto, tornar mais eficiente a utilização desses recursos em programas de melhoramento.

Agrupamentos similares entre o método de Tocher e o UPGMA, também foram obtidos por Farias (2020), utilizando híbridos de *Physalis angulata*. Campos *et al.* (2010), avaliando acessos de mandioca, citam que ambos os métodos em questão apresentaram resultados

semelhantes, destacando que o método de UPGMA apresentou um resultado mais detalhado, podendo este ser tido como um complemento para o Tocher. Sudré *et al.* (2005), utilizando técnicas multivariadas na determinação da divergência genética em acessos de pimentas e pimentões, constataram pequenas diferenças na formação dos agrupamentos de acordo com o método utilizado, destacando que as diferenças podem ser explicadas pela maneira que cada método tem de fazer o cálculo de variabilidade genética.

Os descritores hábito de crescimento, pubescência do caule, forma da margem foliar, cor das máculas da corola, cor do cálice imaturo e a cor do fruto maduro foram o que mais contribuíram para a divergência genética entre os acessos. Referente as concordâncias, sete descritores foram considerados monomórficos, sendo estes a cor e forma do caule, a forma do ápice foliar, cor da corola, posição da flor, a presença de cera nos frutos, e a forma da semente.

Com base nos resultados deste trabalho, observa-se que os descritores morfológicos utilizados foram capazes de diferenciar os acessos, bem como separar de forma clara os acessos mais próximos. Inclusive, podendo permitir, quando se avaliar mais genótipos, inferir a existência de duplicadas, mesmo quando oriundos de diferentes localidades.

A realização de estudos acerca da diversidade encontrada nos acessos conservados em Banco de Germoplasma, refere-se ao conhecimento da variabilidade genética do gênero existente no país, servindo como ferramenta na escolha de características que possam agregar valor econômico à cultura. No âmbito ornamental, pode-se citar a coloração das máculas da corola, juntamente com a cor e forma dos cálices, enquanto que para a comercialização *in natura*, contribuições referentes a cor e forma dos frutos maduros são determinantes na qualidade e aceitabilidade do consumidor. Todas as características citadas são capazes de influenciar na escolha de genótipos com potencial de mercado, bem como subsidiar futuros programas de melhoramento com o gênero.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

A utilização de descritores morfológicos mostrou-se eficiente na identificação de variabilidade genética entre os acessos conservados no Banco Ativo de Germoplasma de *Physalis* da UFRPE.

Houve diferenciação dos acessos, entretanto os descritores cor e forma do caule, forma do ápice foliar, cor da corola, posição da flor, presença de cera nos frutos e a forma da semente não conseguiram discriminar os acessos avaliados, sendo considerados descritores fracos.

As informações geradas servirão para nortear estratégias de manejo, avaliação e seleção de genótipos de interesse para futuros programas de melhoramento de *Physalis*.

5. REFERÊNCIAS

Ávila AJ, Moreno P, Fischer G & Miranda D (2006) Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18°C. Acta Agronómica Colombiana, 55: 29-38.

Bertan I, Carvalho FIF, Oliveira AC, Vieira EA, Hartwig I, Silva JAG, Shimidt DAM, Valério IP, Busato CC & Ribeiro G (2006) Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. Revista Brasileira de Agrociência, 12: 279-286.

Bonett LP, Gonçalves-Vidigal MC, Schuelter AR, Vidigal Filho PS, Gonela A & Lacanallo GF (2006) Divergência genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no Estado do Paraná, Brasil. Semina: Ciências Agrárias, 27: 547-560.

Bussab WO, Miazaki ES & Andrade DF (1990) Introdução à análise de agrupamentos. São Paulo, Associação Brasileira de Estatística. 105p.

Campos AL, Zacarias AJL, Costa DL, Neves LG, Barelli MAA, Sobrinho SP & Luz PB (2010) Avaliação de acessos de mandioca do banco de germoplasma da UEMAT Cáceres – Mato Grosso. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas, 4: 44-54.

Costa TS, Silva AVC, Lédo AS, Santos ARF & Silva Júnior JF (2011) Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46: 499-508.

Cruz CD & Carneiro PCS (2003) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas. Viçosa, Editora UFV. 585p.

Cruz CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum, 35: 271-276.

Faleiro FG, Farias Neto AL & Ribeiro Junior WQ (2008) Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios. Planaltina, Embrapa Cerrados. 183p.

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

Farias JWS (2020) Análise dialélica para descritores morfoagronômicos de híbridos de *Physalis angulata* L. Master Dissertation. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 54p.

González OT, Torres JMC, Cano CIM, Arias ML & Arboleda AAN (2008) Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en antioquia (Colômbia). Revista Brasileira de Fruticultura, 30: 708-715.

Hunziker AT (2001) Genera Solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. Ruggell, A.R.G. Gantner. 500p.

Kindscher K, Long Q, Corbett S, Bosnak K, Loring H, Cohen M & Timmermann BN (2012) The Ethnobotany and Ethnopharmacology of Wild Tomatillos, *Physalis longifolia* Nutt., and Related *Physalis* Species: A Review. Economic Botany, 66: 298-310.

Martínez M (1998) Revision of *Physalis* section Epeteiorhiza (Solanaceae). Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, 69: 71-177.

Monteiro ER, Bastos EM, Lopes ACA, Gomes RLF & Nunes JAR (2010) Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. Ciência Rural, 40: 288-283.

Muniz J, Molina AR & Muniz J (2015) *Physalis*: Panorama produtivo e econômico no Brasil. Horticultura Brasileira, 33: 429-435.

Santos M (2019) Sensibilidade de *Physalis peruviana* a mutagênicos químicos e físicos. Master Dissertation. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 66p.

Sokal RR & Rohlf FJ (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. Taxon, 11: 30-40.

Stehmann JR, Mentz LA, Agra MF, Vignoli-Silva M, Giacomini L & Rodrigues IMC (2015) Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14696>. Accessed on: September 20th, 2021.

Sudré CP, Rodrigues R, Riva EM, Karasawa M & Amaral Júnior AT (2005) Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. Horticultura Brasileira, 23: 2-27.

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

Tanan TT (2015) Fenologia e caracterização dos frutos de espécies de *Physalis* cultivadas no semiárido baiano. Master Dissertation. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 58p.

CAPITULO III

Caracterização *in silico* de putrescine *N*-metiltransferase em espécies de Solanaceae

Artigo já publicado na revista Genetics and Molecular Research (GMR)

Qualis B2 – Ciências Agrárias I

Caracterização *in silico* de putrescine *N*-metiltransferase em espécies de Solanaceae

B.R.A. Gama^{1,3}; R.M. Moraes Filho¹; A.V.V. Montarroyos¹; L.S.S. Martins^{2,3}

¹Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Autor correspondente: B.R.A. Gama

E-mail: beatrizrayrana@gmail.com

Genet. Mol. Res. 21 (4): gmr19076

Recebido em 07 de Julho, 2022

Aceito em 27 de Setembro, 2022

Publicado em 30 de Outubro, 2022

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr19076>

RESUMO

A família Solanaceae compreende cerca de 100 gêneros e 2.500 espécies, possuindo distribuição cosmopolita, e de maior diversidade na região Neotropical. No Brasil, são identificados 36 gêneros e 506 espécies, sendo 236 destas endêmicas. A família apresenta alta diversidade de espécies de importância econômica como fonte de alimentos, propriedades medicinais e uso ornamental. Suas espécies são fontes de metabolitos secundários bioativos de diversas aplicações. Fizemos uma caracterização estrutural, funcional e o desenvolvimento de modelos tridimensionais das sequências de putrescine *N*-metiltransferase (PMT), enzima chave do metabolismo secundário, no início da biossíntese específica da nicotina, de alcaloides tropano e de calisteginas. Examinamos 48 sequências da PMT de espécies da família

Solanaceae presentes em bancos de dados públicos. Um caráter hidrofílico da PMT foi encontrado para todas as espécies, e com o ponto isoelétrico indicando um caráter ácido (5.4 - 6.6). Identificamos quatro domínios funcionais nas sequências da PMT. A análise agrupamento por Neighbour Joining apresentou consistência com classificações taxonômicas recentes das espécies avaliadas.

Palavras-chave: Bioinformática; Análise computacional; Modelagem por homologia; Metabolitos secundários; Solanaceae

ABSTRACT

The Solanaceae family comprises about 100 genera and 2,500 species, with a cosmopolitan distribution and greatest diversity in the Neotropical region. In Brazil, 36 genera and 506 species have been identified, including 236 endemic species. The family has a high diversity of species of economic importance as a source of food, medicinal extracts, and for ornamental use. The species are sources of bioactive secondary metabolites, with diverse applications. We made structural and functional characterization and developed three-dimensional models of putrescine N-methyltransferase (PMT) proteins, a key enzyme of secondary metabolism, involved in biosynthesis of nicotine, tropane alkaloids, and calistegines. We examined 48 PMT sequences from Solanaceae species available in public databases. A hydrophilic characteristic of PMT was found for all species, and the isoelectric point demonstrated a somewhat acidic character (5.4 - 6.6). We identified four functional domains in the PMT sequences. Cluster analysis by Neighbor-Joining was consistent with recent taxonomic classifications of the species.

Key words: Bioinformatics; Computational analysis; Homology modeling; Secondary metabolites; Solanaceae

1. INTRODUÇÃO

A família Solanaceae possui distribuição cosmopolita, compreendendo cerca de 100 gêneros e 2.500 espécies, sendo a região Neotropical o seu maior centro de diversidade (Olmstead, 2013). Segundo D'Arcy (1991), a América do Sul é considerada um dos principais centros de diversidade taxonômica e endemismo da família, onde também se encontra a maior riqueza de espécies. No Brasil, para a família foram identificados 36 gêneros e 506 espécies,

sendo 236 destas endêmicas do país (Stehmann et al., 2015). Aproximadamente metade das espécies da família pertencem a apenas cinco gêneros, *Capsicum* L., *Cestrum* L., *Lycianthes* (Dunal) Hassl., *Physalis* L. e *Solanum* L., sendo o último, o maior e mais diversificado morfológicamente (Knapp, 2008; Sampaio et al., 2019).

Tendo em vista a grande diversidade de espécies pertencentes a Solanaceae que estão presentes na flora brasileira, sabe-se que a muitas destas possuem importância econômica como fonte de alimentos, produção de substâncias farmacológicas e ornamentação. Adicionalmente, as plantas pertencentes a esta família são fontes de metabolitos secundários bioativos de diversas classes químicas, como alcaloides esteroidais, alcaloides do tipo tropano, alcaloides piridínicos, vitanolídeos, glicoalcalóides, flavonoides, entre outros, que apresentam as mais diversas aplicações (Corrêa, 2015).

Putrescine *N*-metiltransferase (PMT) é uma enzima chave do metabolismo secundário da planta no início da biossíntese específica da nicotina, de alcaloides tropano e de calisteginas, que são inibidores da glicosidase com estrutura de nortropano. Estudos afirmam que as proteínas PMT provavelmente evoluíram das espermidina sintases (SPDSs), que são enzimas ubíquas do metabolismo da poliamina. (Teuber et al., 2007; Junker et al., 2013; Moallem, 2017).

Segundo Leite et al. (2012), as poliaminas são moléculas fundamentais para o crescimento e funcionamento das células normais. No qual interagem, no meio biológico, com muitas macromoléculas, tanto eletrostaticamente quanto covalentemente. Tais moléculas desempenham um papel relevante no crescimento e proliferação celular e na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, estando também envolvidas na reparação da matriz extracelular, na adesão celular e em processos de sinalização.

As metiltransferases possuem funções biológicas essenciais na metilação de ácido nucleico e na metilação de proteínas, que alteram a atividade de DNA, RNA ou proteína, sendo a metilação de pequenas moléculas, como hormônios de mamíferos e vegetais ou metabolitos secundários das plantas, de fundamental importância para o organismo (Teuber et al., 2007). Segundo Stenzel et al. (2006), a transferência de *N*-metil das primeiras etapas específicas para a biossíntese de tropano e nicotina alcalóides é catalisado por putrescina *N*-metiltransferase. A enzima usa *S*-adenosil-*l*-metionina como metil doador do grupo e putrescina como substrato, com apenas uma ou poucas outras diaminas sendo metiladas de forma menos eficiente.

Geng et al. (2018), afirmam que embora o papel da PMT na biossíntese da nicotina seja claro, o conhecimento da PMT na biossíntese dos alcalóides do tropano e na regulação das poliaminas permanece limitado. Biastoff et al. (2009), afirmam que a história biológica da putrescine N-metiltransferase (PMT) ainda não está clara, tendo em vista o surgimento de um conceito para a evolução desta enzima no ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário. Segundo Junker et al. (2013), ainda é necessário ser elucidado se putrescine N-metiltransferases (PMTs) ocorrem em mais famílias não relacionadas de plantas superiores e se as PMTs até agora não detectadas são semelhantes às sequências de PMT atuais, ou se formam novos grupos.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos: (1) Caracterizar estruturalmente e funcionalmente as sequências de putrescine N-metiltransferase (PMT) de espécies da família Solanaceae, com metodologias de bioinformática. (2) Desenvolver modelos tridimensionais da putrescine N-metiltransferase de representantes da família Solanaceae, com base na metodologia de modelagem por homologia, visando possibilitar uma melhor compreensão de suas estruturas e funções moleculares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As sequências da putrescine N-metiltransferase foram obtidas na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information), através do algoritmo de busca BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) realizando o download em formato FASTA. Sequências de proteínas em espécies de Solanaceae foram recuperadas pela ferramenta BLASTp para procurar os homólogos, onde um total de 48 sequências foram encontradas.

Os Parâmetros físico-químicos de putrescine N-metiltransferase presentes em espécies da família Solanaceae foram analisados pelo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) (Gasteiger et al., 2005). As localizações subcelulares foram previstas pelo servidor CELLO2GO (Yu et al., 2014). A identificação dos domínios funcionais da proteína, sua classificação e ontologia foram realizadas com o uso do servidor Prodom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/>) (Servant et al., 2002), uma base de dados de família de domínios de proteínas de segmentos homólogos. A estimativa dos efeitos funcionais ocasionados por mutações de sequências de aminoácidos foram obtidas por meio do servidor SNAP2 (<https://roslab.org/services/snap2web/>) (Hecht et al., 2015).

As sequências da enzima PMT foram alinhadas utilizando-se o algoritmo ClustalW e as análises de agrupamento foram realizadas no software MEGA 7.0.21 (Kumar et al., 2016) usando o método de neighbor-joining com um teste de bootstrap com 1000 réplicas.

A predição da estrutura terciária dos modelos 3-D das PMTs foi realizada pelo servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley et al., 2015) no modo multi-template. Este servidor utiliza-se de métodos avançados de detecção de homologia para construir um modelo 3D. A estrutura 3D da proteína foi visualizada pelo pacote UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). A qualidade do modelo foi avaliada usando o servidor Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu/>) (Chen et al., 2010) pela análise de Ramachandran. O Z-score foi calculado utilizando o servidor interativo ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) para reconhecer erros em estruturas tridimensionais (Wiederstein et al., 2007). A minimização de energia e correção de pequenos erros no modelo tridimensional foi realizada pelo servidor Yasara force Field (KRIEGER et al., 2009) e pelo software KiNG (Chen et al., 2009).

3. RESULTADOS

As quarenta e oito sequências de Putrescine *N*-metiltransferase em espécies de Solanaceae analisadas a partir de sequências da proteína presentes no banco de dados do NCBI, recuperadas em formato FASTA, encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de putrescine *N*-metiltransferase (PMT) analisadas em espécies da família Solanaceae

Espécie	Nº do acesso no GenBank	Definição no GenBank	Família
<i>Anisodus acutangulus</i>	ACF21005.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Anisodus acutangulus</i>	ACF21006.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Anisodus luridus</i>	AGL76988.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Anisodus tanguticus</i>	AAT99576.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Atropa belladonna</i>	BAA82261.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Atropa belladonna</i>	BAA82262.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	XP_016557670.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	XP_016553600.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2- like	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	KAF3624529.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	PHT78552.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum baccatum</i>	PHT30221.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine *N*-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

<i>Capsicum baccatum</i>	PHT45224.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum chinense</i>	PHU08967.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum chinense</i>	PHU14344.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Datura innoxia</i>	CAJ46253.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Datura innoxia</i>	CAJ46254.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Datura metel</i>	AAQ94738.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Datura stramonium</i>	CAE47481.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Hyoscyamus niger</i>	BAA82263.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	AAK49870.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	OIT40667.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	XP_019258257.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	XP_019258255.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Nicotiana benthamiana</i>	ABY25273.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	BAA74544.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009771961.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009771962.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009786665.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 4 isoform X1	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009786666.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 4 isoform X2	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016446557.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	NP_001312037.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016478024.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016478023.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016445029.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 4	Solanaceae
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XP_018627768.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 1 isoform X2	Solanaceae
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XP_009606202.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase isoform X1	Solanaceae
<i>Physalis divaricata</i>	CAJ46255.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Solanum dulcamara</i>	CAQ19733.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Solanum lycopersicum</i>	NP_001233790.2	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Solanum lycopersicum</i>	CAJ46251.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Solanum lycopersicum</i>	XP_004244762.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Solanum pennellii</i>	XP_015084559.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 2	Solanaceae
<i>Solanum pennellii</i>	XP_015078654.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3-like	Solanaceae
<i>Solanum tuberosum</i>	CAE53633.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006350699.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase 3-like	Solanaceae
<i>Solanum chilense</i> *	TMX00678.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae
<i>Solanum commersonii</i> *	KAG5589663.1	putrescine <i>N</i> -metiltransferase	Solanaceae

<i>Solanum commersonii</i> *	KAG5600829.1	putrescine N-metiltransferase	Solanaceae
------------------------------	--------------	-------------------------------	------------

*: Hypothetical sequence

Através do programa ProtParam, foi possível observar parâmetros como, peso molecular, ponto isoelétrico teórico (pI) e a média de hidropaticidade (GRAVY) das sequências da proteína avaliada (Tabela 2). O ponto isoelétrico das sequências variou entre 5,36 (*Datura metel*) e 6,6 (*Solanum pennellii*), indicando seu caráter ácido. Esses resultados indicam que os pIs avaliados foram hidrofílicos. Tendo em vista que o ponto isoelétrico (pI) é o pH em que uma determinada molécula não carrega nenhuma carga elétrica líquida, o pI tem amplo uso em técnicas proteômicas e bioquímicas atualmente utilizadas, como durante a eletroforese, em que a direção da migração de proteínas no gel depende da carga, sendo assim possível separar proteínas em um gel com base em seu pI (Kozlowski, 2017).

Tabela 2. Análise da estrutura primária das sequências de putrescine N-metiltransferase (PMT) de espécies da família Solanaceae

Espécie	Número de aminoácidos	PM (kDa)	pI	GRAVY
<i>Anisodus acutangulus</i>	347	38.10	6,51	-0,001
<i>Anisodus acutangulus</i>	338	37.19	5,86	-0,034
<i>Anisodus luridus</i>	338	37.17	5,73	-0,02
<i>Anisodus tanguticus</i>	338	37.17	5,73	-0,009
<i>Atropa belladonna</i>	340	37.46	6,18	-0,032
<i>Atropa belladonna</i>	336	36.97	5,86	-0,032
<i>Capsicum annuum</i>	341	37.33	6,06	-0,023
<i>Capsicum annuum</i>	355	39.04	5,81	-0,134
<i>Capsicum annuum</i>	355	39.07	5,81	-0,141
<i>Capsicum annuum</i>	354	38.97	5,81	-0,139
<i>Capsicum baccatum</i>	341	37.37	6,14	-0,036
<i>Capsicum baccatum</i>	355	39.03	6,12	-0,148
<i>Capsicum chinense</i>	341	37.30	5,68	-0,018
<i>Capsicum chinense</i>	353	38.88	5,93	-0,111
<i>Datura inoxia</i>	340	37.37	5,88	-0,075
<i>Datura inoxia</i>	341	37.47	5,76	-0,071
<i>Datura metel</i>	343	37.46	5,36	-0,043
<i>Datura stramonium</i>	344	37.72	6	-0,066
<i>Hyoscyamus niger</i>	388	37.20	5,78	-0,051
<i>Nicotiana attenuata</i>	388	42.56	5,95	-0,288
<i>Nicotiana attenuata</i>	371	40.69	5,84	-0,223
<i>Nicotiana attenuata</i>	388	42.62	5,95	-0,279

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

<i>Nicotiana attenuata</i>	405	44.57	5,73	-0,119
<i>Nicotiana benthamiana</i>	388	42.82	6,34	-0,322
<i>Nicotiana glauca</i>	353	38.76	5,62	-0,104
<i>Nicotiana glauca</i>	430	47.17	6,2	-0,466
<i>Nicotiana glauca</i>	381	41.79	5,95	-0,244
<i>Nicotiana glauca</i>	419	45.98	6,22	-0,416
<i>Nicotiana glauca</i>	386	42.34	6,1	-0,256
<i>Nicotiana glauca</i>	353	38.74	5,74	-0,083
<i>Nicotiana glauca</i>	375	41.14	5,74	-0,219
<i>Nicotiana glauca</i>	375	41.11	5,74	-0,226
<i>Nicotiana glauca</i>	403	44.20	6,21	-0,364
<i>Nicotiana glauca</i>	386	42.28	6,1	-0,266
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	364	39.87	5,69	-0,16
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	375	41.15	5,84	-0,218
<i>Physalis peruviana</i>	344	37.58	5,81	-0,066
<i>Solanum dulcamara</i>	340	37.33	6,05	-0,032
<i>Solanum lycopersicum</i>	340	37.56	6,06	-0,079
<i>Solanum lycopersicum</i>	340	37.47	6,15	-0,069
<i>Solanum lycopersicum</i>	340	37.51	6,15	-0,074
<i>Solanum pennellii</i>	340	37.48	6,6	-0,066
<i>Solanum pennellii</i>	342	37.71	6,15	-0,082
<i>Solanum tuberosum</i>	340	37.35	5,99	-0,019
<i>Solanum tuberosum</i>	339	37.43	6,15	-0,097
<i>Solanum chilense</i> *	340	37.48	6,37	-0,063
<i>Solanum commersonii</i> *	340	37.43	5,88	-0,094
<i>Solanum commersonii</i> *	333	36.76	5,93	-0,062

*: Hypothetical sequence. PM (kDa): peso molecular. pI: ponto isoelétrico. GRAVY: média de hidropaticidade

Considerando-se que o valor de GRAVY para um peptídeo ou proteína é calculado como a soma dos valores de hidropatia de todos os aminoácidos divididos pelo número total de resíduos na sequência (Bezerra et al., 2018), constatou-se que as sequências apresentam índice de hidropaticidade média (GRAVY) negativo. Os valores variaram de -0,001 (*Anisodus acutangulus*) a -0,466 (*Nicotiana glauca*), o que sugere um caráter hidrofílico desta proteína para todas as espécies, pois como definido por Kyte e Doolittle (1982), o índice de hidropatia revela o potencial dos resíduos para interagir com os constituintes de regiões membranares ou para estabilização da proteína por meio de interações entre seus domínios.

As seqüências de PMTs variaram em tamanho de 336 (*Atropa belladonna*) a 430 (*Nicotiana sylvestris*) aminoácidos e o peso molecular (PM) variou de 36.97 kDa (*Atropa belladonna*) a 47.17 kDa (*Nicotiana sylvestris*) (Tabela 2). A análise da localização subcelular utilizando o servidor CELLO2GO previu que as PMTs avaliadas são proteínas intracelulares, sendo classificadas como citoplasmáticas.

Com base nos resultados obtidos, quatro domínios conservados foram identificados (Figura 1). Apenas o domínio PD002785 ocorre em todas as sequencias analisadas, e está associado a atividade da termospermina sintase e da espermidina sintase. Isto se justifica devido ao fato dos PMTs mostrarem maior similaridade de seqüência de aminoácidos com espermidina sintases (SPDSs) do que para outras metiltransferases vegetais (Junker et al., 2013). Junto a isso, é sabido que espermidina sintase (SPDS) aceita a mesmo substrato que PMT, a putrescina, mas com um co-substrato ligeiramente diferente, a S-adenosil metionina descarboxilada (dcSAM), que forma a espermidina, que é uma poliamina essencial em todos os organismos eucarióticos (Teuber et al., 2007).

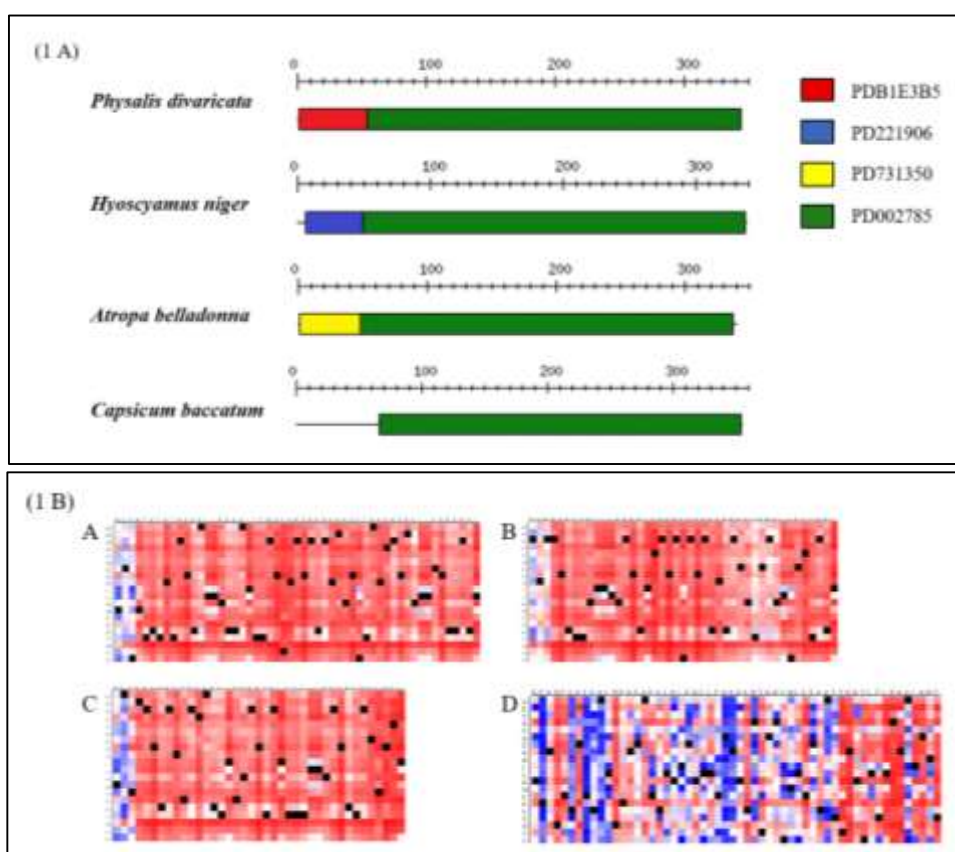


Figura 1. (1A) Domínios funcionais observados através do servidor ProDom. (1B) Predição de efeitos funcionais das mutações em aminoácidos pelo servidor SNAP2 para domínios

PDB1E385 (A) *Physalis divaricata*, PD221906 (B) *Hyoscyamus niger*, PD731350 (C) *Atropa belladonna* e PD002785 (D) *Capsicum baccatum*.

O domínio PDB1E3B5 está presente em 28 das 49 sequências analisadas, estando envolvido na transferência de um grupo metil para a diamina putrescina, a partir de S-adenosil-l-metionina (SAM) como coenzima. Já o domínio PD221906 é encontrado em 6 sequências, enquanto que o domínio PD731350 está presente apenas em *Atropa belladonna*, na sequência BAA82262.1, e ambos ainda não possuem função caracterizada.

Através do servidor SNAP2 constatou-se que os domínios funcionais PDB1E385, PD221906 e PD731350 são as regiões da proteína mais sensíveis a mutações. Este servidor forneceu um mapa com a presença de diferentes tonalidades com possível substituição em cada posição dessas proteínas. A cor vermelha indica fortes sinais de mutação, já a cor branca indica sinais fracos e a cor azul indica neutralidade. A ocorrência de uma menor quantidade de locais sensíveis à mutação no domínio PD002785 explica sua conservação e ocorrência em todas as sequências analisadas (Figura 1).

Visando uma melhor caracterização das sequências de putrescine N-metiltransferase, e um maior entendimento da relação filogenética entre as diferentes espécies pertencentes a família Solanaceae em estudo, montou-se uma árvore fenética por meio do servidor MEGA 7. Levando-se em conta que todas as espécies possuem o domínio PD002785, é possível observar que o primeiro grupo foi formado por sequências com o domínio PDB1E385 presente nos gêneros *Capsium*, *Datura*, *Nicotiana*, *Physalis* e *Soalnum*, tal domínio está envolvido na transferência de um grupo metil para a diamina putrescina, a partir de S-adenosil-l-metionina (SAM) como coenzima. O segundo grupo formado incluiu proteínas com domínios ainda sem função caracterizada.

Observou-se a formação de um grupo com suporte de 100%, que agrupa as espécies de *Nicotiana*, sendo estas pertencentes a subfamília Nicotianoideae. Os demais gêneros em estudo, compreende a Subfamília Solanoideae. Tais resultados se assemelham aos resultados obtidos por Olmstead et al. (2008), que propuseram uma filogenia de Solanaceae com base nas regiões do DNA do cloroplasto ndhF e trnLF, compreendendo 89 gêneros e 190 espécies. Tendo a formação do clado “x = 12” com todas as espécies unidas por um cromossomo de base número 12, com o referido clado sendo um dos ramos mais fortemente suportados na árvore (99% BS), composto por dois grupos irmãos fortemente apoiados, que seriam Nicotianoideae (*Nicotiana*

mais Anthocercideae; 99%) e Solanoideae (95%). Posteriormente, Särkinen et al. (2013), por meio de dados moleculares e fósseis, analisaram 40% do total de espécies de Solanaceae, sendo 34% da amostragem referente as espécies dentro do gênero *Solanum*, os autores corroboram com trabalhos anteriores e reafirmaram que o clado “x = 12” é estabelecido com forte suporte, sendo Nicotianoideae resolvida como irmã do clado formado por Solanoideae.

No que se refere a subfamília Solanoideae, Olmstead et al. (2008), definiram quatro clados, todos com suporte de bootstrap $\geq 78\%$, sendo eles (1) Atropina (*Hyoscyameae*, *Lycieae*, *Jaborosa*, *Latua*, *Nolana* e *Sclerophylax*), (2) Juanulloeae, (3) Solaneae, Capsiceae, Physaleae e Datureae, e (4) Salpichroina (*Salpichroa* e *Nectouxia*), sendo esses dados posteriormente corroborados por Särkinen et al. (2013). Tais colocações se assemelham aos resultados obtidos no presente estudo, em que se pode observar a formação de um agrupamento entre *Hyoscyamus*, *Atropa* e *Anisodus*, que compreendem o clado Atropina. Outros grupos são formando pelo gênero *Solanum*, *Capsicum*, *Datura*, e *Physalis*, que compreendem o clado anteriormente citado, composto por Solaneae, Capsiceae, Datureae e Physaleae.

Na Figura 2 é ilustrado o agrupamento de Solanaceae com a inclusão de espécies da subfamília Nicotianoideae, com representantes da tribo Nicotianeae, e da subfamília Solanoideae, com representantes das tribos Hyoscyameae, Solaneae, Capsiceae, Datureae e Physaleae.

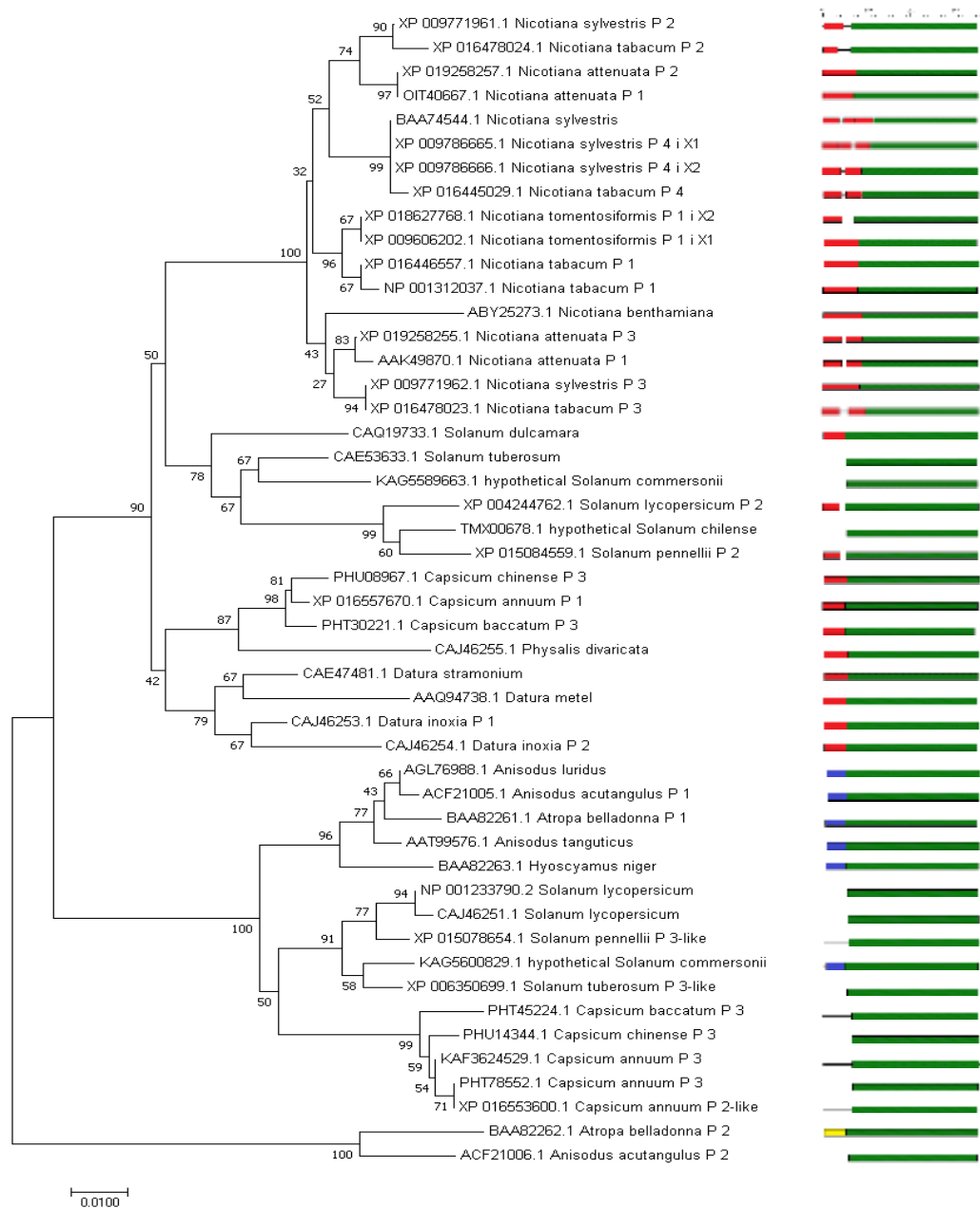


Figura 2. Análise de agrupamento obtida pelo método de neighbor-joining, das espécies de Solanaceae, com base nas sequências de putrescine *N*-metiltransferase (PMT). Os quatro domínios funcionais (PD002785; PDB1E385; PD221906 e PD731350) estão representados para cada espécie.

A modelagem da estrutura terciária de proteínas pode ser feita a partir de diferentes metodologias, sendo uma delas a modelagem por homologia que utiliza softwares como ferramentas que permitem a obtenção dos modelos, através de informações de similaridade entre a sequência da proteína de interesse e estruturas depositadas em bancos de dados que foram determinadas experimentalmente para, posteriormente, extrair informações de

ancestralidade comum entre elas (Rego, 2012). A validação do modelo ocorre por meio de ferramentas como o gráfico de Ramachandran e Z-score (Santos, 2021).

Para a previsão da estrutura terciária das proteínas pelo servidor Phyre2, foram selecionadas as sequências de putrescine N-metiltransferase de *Atropa beladonna*, *Capsicum baccatum*, *Hyoscyamus niger* e *Physalis divaricata* (Figura 3). Após refinamento das estruturas 3D pelo software KiNG e Yasara Force Field, os modelos foram avaliados pelo servidor MOLPROBITY para reconhecimento de erro nas estruturas terciárias. Os domínios PD221906 e PD731350, são formados por uma alfa hélice enquanto que o domínio PDB1E3B5 é formado por duas alfa hélices. O domínio PD002785 apresenta conformação conservada, o que se explica devido ao fato de ocorrer em todas as espécies analisadas.

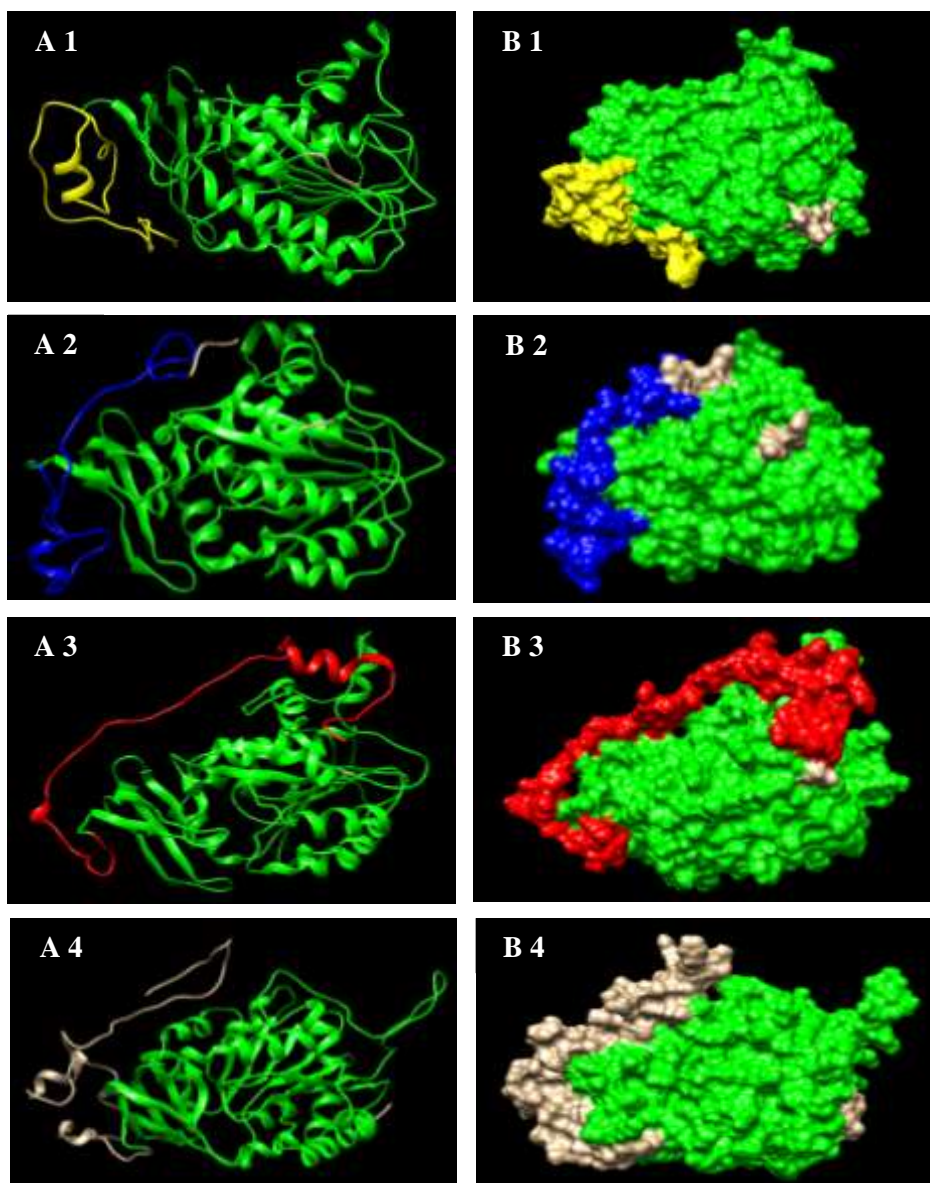


Figura 3. Estrutura tridimensional de putrescine *N*-metiltransferase (PMT) gerada pelo servidor Phyre2 para *Atropa beladonna* (A1 e B1); *Hyoscyamus niger* (A2 e B2); *Physalis divaricata* (A3 e B3) e *Capsicum baccatum* (A4 e B4).

A partir dos dados obtidos no servidor Prosa, a qualidade dos modelos revelou-se satisfatória, por apresentar resultados de Z-score de -8,12 para *Atropa beladonna*; -7,34 para *Capsicum baccatum*; -8,41 para *Hyoscyamus niger*; -8,05 para *Physalis divaricata*, respectivamente (Figura 4). Segundo Abreu (2015), os valores de Z-score podem ser considerados importantes do ponto de vista termodinâmico e de qualidade estrutural, por poderem apresentar valores muito próximos ou até maiores em relação a proteínas elucidadas experimentalmente, mostrando assim a confiabilidade dos modelos.

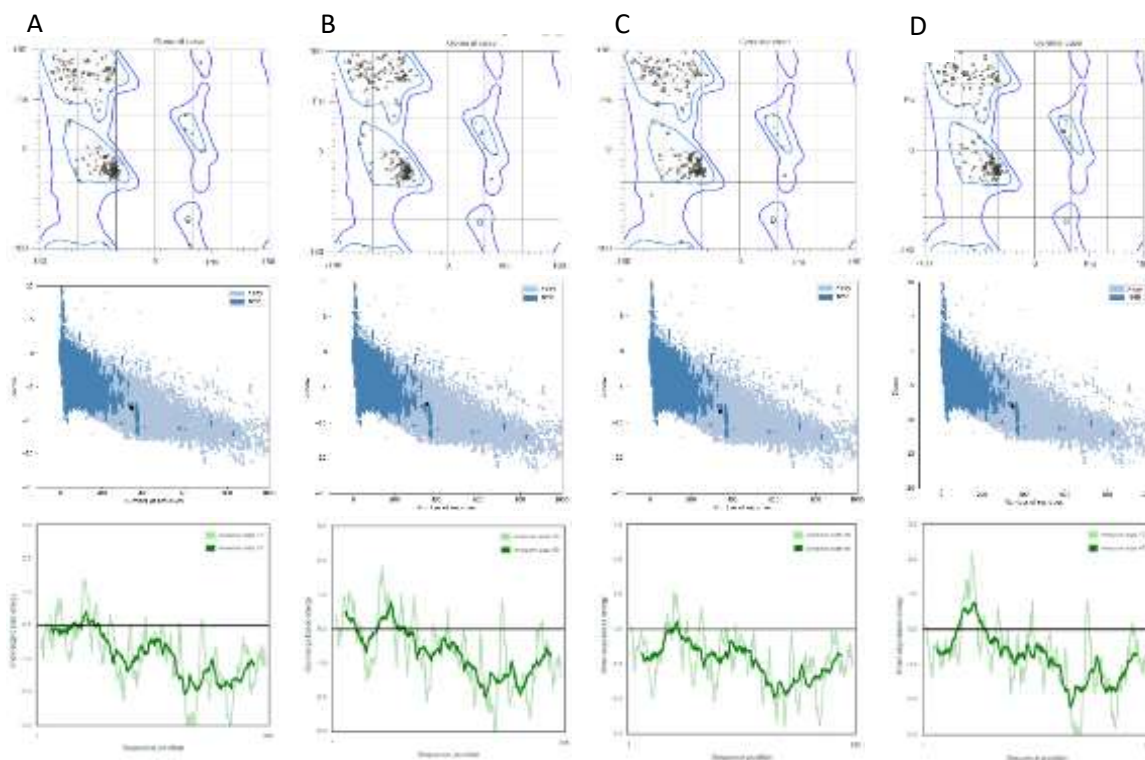


Figura 4. Análise do gráfico de Ramachandran gerado pelo servidor MolProbit, a partir do modelo tridimensional construído pelo servidor Phyre2 para *Atropa beladonna* (A1); *Capsicum baccatum* (B1); *Hyoscyamus niger* (C1) e *Physalis divaricata* (D1). Valor de pontuação Z pelo ProSA-web para *Atropa beladonna* (A2); *Capsicum baccatum* (B2); *Hyoscyamus niger* (C2) e *Physalis divaricata* (D2). Uso do ProSA-web para putrescine *N*-metiltransferase mostrando o gráfico de dispersão de energia de resíduos da estrutura da proteína nativa para *Atropa beladonna* (A3); *Capsicum baccatum* (B3); *Hyoscyamus niger* (C3) e *Physalis divaricata* (D3).

Os dados gerados a partir dos modelos refinados apresentaram 98,5%, 98,9%, 99,1% e 98,5% dos resíduos em regiões de conformação favorável pela análise do gráfico de Ramachandran para as espécies *Atropa beladonna*, *Capsicum baccatum*, *Hyoscyamus niger* e *Physalis divaricata*, respectivamente (Figura 4).

As sequências codificantes geram estruturas tridimensionais, e com isso efeitos biológicos podem ser estudados e avaliados de forma mais precisa. A predição de estruturas tridimensionais de proteínas se caracteriza por possuir aplicações práticas de grande impacto terapêutico e biotecnológico (Capriles et al., 2014; Abreu, 2015). Os métodos computacionais vêm se tornando cada vez mais utilizados para predição de proteínas, o que traz um maior embasamento para que a parte experimental seja realizada de forma mais adequada, visando um resultado previamente determinado. Sendo a modelagem por homologia ou comparativa a mais utilizada por ser um método eficaz, que gera bons resultados, além da qualidade dos modelos preditos, que possuem uma razoável relação evolucionária, e por apresentar uma precisão maior do que aquelas produzidas com técnicas diferentes (Abreu, 2015).

4. CONCLUSÃO

O estudo desenvolvido permitiu um maior entendimento das funções da putrescine *N*-metiltransferase na regulação da síntese de alcaloides. Aliado a isso, o agrupamento obtido através das sequências da PMT corrobora a filogenia de espécies aceitas atualmente para a família Solanaceae.

O uso da metodologia *in silico* permitiu a geração de modelos 3D dentro dos padrões, podendo ser considerados uma representação muito próxima da estrutura real da proteína.

5. REFERÊNCIAS

- Abreu RA (2015). Caracterização funcional e estrutural comparativa *in silico* de uma proteína pr-5 do tipo taumatina de *Poncirus trifoliata*. Monography, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé.
- Bezerra LCC, Queiroz EWA and Freire JEC (2018). Predição físico-química, modelagem e análise do mecanismo de interação da quitinase Mo-chi1 (*Moringa oleifera*, Lam.), com poli- β -(1-4)-*N*-acetil-d-glucosamine: uma abordagem *in silico*. *Desafios* 5(1): 111–120.
- Biastoff S, Brandt W and Dräger B (2009). Putrescine *N*-metiltransferase – The start for alkaloids. *Phytochemistry* 70: 1708–1718.

Capriles PVSZ, Trevizani R, Rocha GK, Dardenne LE, et al. (2014). Modelos Tridimensionais. In: Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular (Verli H). Organization of Hugo Verli, Porto Alegre.

Chen VB, Arendall WB, Headd JJ and Keedy DA (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66: 12–21.

Chen VB, Davis IW and Richardson DC (2009). KING (Kinemage, Next Generation): a versatile interactive molecular and scientific visualization program. *Protein Sci.* 18: 2403–2409.

Corrêa JAM (2015). Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos. Doctoral thesis, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

D'arcy WG (1991). The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution (Hawkes JG, Lester RN, Nee M and Estrada N). London: Royal Botanic Gardens, KEW.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A and Duvaud S (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: The proteomics protocols handbook. Springer Protocols Handbooks (Walker JM). Humana Press, New York, 571–607.

Geng C, Zhao T, Yang C, Zhang Q, et al. (2018). Metabolic characterization of *Hyoscyamus niger* root-specific putrescine *N*-methyltransferase. *Plant Physiol. Biochem.* 127: 47–54.

Hecht M, Bromberg Y and Rost B (2015). Better prediction of functional effects for sequence variant. *BMC Genomics* 16: S1.

Junker A, Fischer J, Sichhart Y, Brandt W, et al. (2013). Evolution of the key alkaloid enzyme putrescine *N*-methyltransferase from spermidine synthase. *Front. Plant Sci.* 4: 260.

Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, et al. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10: 845–858.

Knapp S (2008). A revision of the *Solanum havanense* species group and new taxonomic additions to the Geminata Clade (*Solanum*, Solanaceae). In: Annals of the Missouri Botanical Garden, 95: 405–458.

Kozłowski LP (2017). Proteome-pI: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res.* 45(D1): D1112-D1116.

GAMA, B.R.A. Diversidade genética de *Physalis* L. e análise molecular *in silico* de putrescine n-methyltransferase em espécies da família Solanaceae

Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, et al. (2009). Improving physical realism, stereochemistry and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* 77: 114–122.

Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.

Kyte J and Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1):105–32.

Leite GA, Carvalho CAC, Freitas WES, Dantas JIA, et al. (2012). A ação das poliaminas na maturação e senescência de frutos. *ACSA* 8(4): 08–21.

Moallem E, Ghasemiiprbalouti A, Nejdassattari T, Iranbakhsh A, et al. (2017). Evaluation of expression analysis of putrescine *N*-metiltransferase gene during different stages of growth in the medicinal plant *Physalis divaricata* (Solanaceae). *Biodiversitas* 18(4): 1430–1437.

Olmstead RG (2013). Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. *Bot. J. Linn. Soc.* 171: 80–102.

Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, et al. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57(4): 1159–1181.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, et al. (2004). UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605–1612.

Rego FOR (2012). Análise *in silico* de proteínas: modelo baseado na apolipoproteínae relacionada à doença de Alzheimer. Monography, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Sampaio VS, Vieira IMF, Júnior EAL and Loiola MIB (2019). Flora do Ceará, Brasil: *Solanum* (Solanaceae). *Rodriguésia* 70: e02512017.

Santos DS (2021). Mapeamento e análise *in silico* das proteínas referentes ao estresse salino em espécies do gênero do algodoeiro (*Gossypium* spp.). Monography, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé.

Särkinen T, Lynn Bohs L, Olmstead RG and Knapp S (2013). A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evol. Biol.* 13: 1–15.

Servant F, Bru C, Carrère S, Courcelle E, et al. (2002). ProDom: Automated clustering of homologous domains. *Brief. Bioinform.* 3: 246–251.

Stehmann JR (2015). Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14696>]. Accessed April 03, 2021.

Stenzel O, Teuber M and Dräger B (2006). Putrescine N -metiltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta* 223: 200–212.

Teuber M, Azemi ME, Namjoyan F, Meier AC, et al. (2007). Putrescine N-metiltransferases— a structure–function analysis. *Plant mol. Biol.* 63: 787–801.

Wiederstein M and Sippl MJ (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 35: 407–410.

Yu CS, Cheng CW, Su WC, Chang KC, et al. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subcellular localization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One* 9: e99368.

ANEXOS



The Original by FUNPEC-RP

In silico characterization of putrescine N-methyltransferase in Solanaceae species

B.R.A. Gama^{1,3}, R.M. Moraes Filho¹, A.V.V. Montarroyos¹ and L.S.S. Martins^{2,3}

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

² Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Corresponding author: B.R.A. Gama
E-mail: beatrizrayana@gmail.com

Genet. Mol. Res. 21 (4): gmr19076
Received July 07, 2022
Accepted September 27, 2022
Published October 30, 2022
DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr19076>

ABSTRACT. The Solanaceae family comprises about 100 genera and 2,500 species, with a cosmopolitan distribution and greatest diversity in the Neotropical region. In Brazil, 36 genera and 506 species have been identified, including 236 endemic species. The family has a high diversity of species of economic importance as a source of food, medicinal extracts, and for ornamental use. The species are sources of bioactive secondary metabolites, with diverse applications. We made a structural and functional characterization and developed three-dimensional models of putrescine N-methyltransferase (PMT) proteins, a key enzyme of secondary metabolism, involved in biosynthesis of nicotine, tropane alkaloids, and calistegines. We examined 48 PMT sequences from Solanaceae species available in public databases. A hydrophilic characteristic of PMT was found for all species, and the isoelectric point demonstrated a somewhat acidic character (5.4 - 6.6). We identified four functional domains in the PMT sequences. Cluster analysis by Neighbor-Joining was consistent with recent taxonomic classifications of the species.

Key words: Bioinformatics; Computational analysis; Homology modeling; Secondary metabolites; Solanaceae

INTRODUCTION

The Solanaceae family has a cosmopolitan distribution, comprising about 100 genera and 2,500 species, with the neotropical region being its most important center of diversity (Olmstead, 2013). According to D'Arcy (1991), South America is considered one of the family's leading centers of taxonomic diversity and endemism, where the widest species variety is found. In Brazil, there are 36 genera and 506 species of the family, 236 of which are endemic to the country (Stehmann et al., 2015). Approximately half of the species in the family belong to only five genera, *Capsicum*, *Cestrum*, *Lycianthes*, *Physalis*, and *Solanum*, the last being the largest and most morphologically diverse (Knapp, 2008; Sampaio et al., 2019).

In view of the great diversity of species belonging to Solanaceae that are present in the Brazilian flora, it is known that many of these have economic importance used as food, pharmacological substances production, and ornamentation. Additionally, plants belonging to this family are also sources of bioactive secondary metabolites of different chemical classes, such as steroidal alkaloids, tropane alkaloids, pyridine alkaloids, vitanolides, glycoalkaloids, flavonoids, among others, which have the most diverse applications (Corrêa, 2015).

Putrescine N-methyltransferase (PMT) is a crucial enzyme of secondary plant metabolism in initiating the specific biosynthesis of nicotine, tropane alkaloids, and calistegines, which are glucosidase inhibitors with nortropane structure. Studies claim that PMT proteins likely evolved from spermidine synthases (SPDSs), ubiquitous polyamine metabolism enzymes (Teuber et al., 2007; Junker et al., 2013; Moallem, 2017).

According to Leite et al. (2012), polyamines are fundamental molecules for the growth and functioning of cells. They interact with many macromolecules in the biological environment, both electrostatically and covalently. Such molecules play an essential role in cell growth and proliferation and the synthesis of proteins and nucleic acids, being also involved in extracellular matrix repair, cell adhesion, and signaling processes.

Methyltransferases have essential biological functions in nucleic acid methylation and protein methylation, which alter the activity of DNA, RNA, or protein, and the methylation of small molecules, such as mammalian and plant hormones or plant secondary metabolites, is of fundamental importance for the organism (Teuber et al., 2007). According to Stenzel et al. (2006), the transfer of N-methyl from the first specific steps catalyzes putrescine N-methyltransferase for the biosynthesis of tropane and nicotine alkaloids. The enzyme uses S-adenosyl-1-methionine as the methyl group donor and putrescine as the substrate, with only one or a few other diamines methylated less efficiently.

Geng et al. (2018) state that although the role of PMT in nicotine biosynthesis is clear, knowledge of PMT in the biosynthesis of tropane alkaloids and the regulation of polyamines remains limited. Biastoff et al. (2009) state that the biological history of PMT is still unclear, given the emergence of a concept for the evolution of this enzyme at the branch point between primary and secondary metabolism. According to Junker et al. (2013), it remains unclear whether putrescine N-methyltransferases (PMTs) occur in more unrelated families of higher plants and whether the hitherto undetected PMTs are similar to current PMT sequences, or whether new groups form.

According to the above, the present study aimed to: (1) structurally and functionally characterize the putrescine N-methyltransferase sequences of species of the Solanaceae

family by bioinformatics methodologies; (2) develop three-dimensional models of the putrescine N-methyltransferase of representatives of the Solanaceae family, based on the homology modeling methodology, in order to enable a better understanding of their molecular structures and functions.

MATERIAL AND METHODS

Sequences retrieval

The putrescine N-methyltransferase sequences were obtained from the NCBI (National Center for Biotechnology Information) platform, using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search algorithm, downloading them in FASTA format. BLASTp tool recovered protein sequences in Solanaceae species to search for homologs, where a total of 48 sequences were found.

Sequence Analysis

The ProtParam analyzed physicochemical parameters of PMT present in species of the Solanaceae family (<http://web.expasy.org/protparam>) (Gasteiger et al., 2005). CELLO2GO server predicted subcellular locations (Yu et al., 2014). The identification of the functional domains of the protein using the Prodom server to its classification and ontology, a family database of protein domains of homologous segments (<http://prodom.prabi.fr/prodom/>) (Servant et al., 2002). The estimation of the functional effects caused by mutations of amino acid sequences through the SNAP2 server (<https://roslab.org/services/snap2web/>) (Hecht et al., 2015).

Alignment and Phenetic Analysis

The PMT enzyme sequences were aligned using the ClustalW algorithm. Then, MEGA 7.0.21 software performed the cluster analyses (Kumar et al., 2016) using the neighbor-joining method with a bootstrap test with 1000 replicas.

Tertiary structure prediction, evaluation, and validation of the model

The tertiary structure prediction to find 3-D models of PMTs used the Phyre2 server in multi-template mode (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley et al., 2015). This server uses advanced homology detection methods to build a 3D model. The 3D structure visualization of the protein used the UCSF Chimera package (Pettersen et al., 2004). Model quality assessment using the Molprobit server (<http://molprobit.biochem.duke.edu/>) by Ramachandran analysis (Chen et al., 2010). The ProSA-web interactive server calculated the Z-score (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) to recognize errors in three-dimensional structures (Wiederstein et al., 2007). The energy minimization and correction of minor errors in the three-dimensional model were performed by the Yasara force Field server (Krieger et al., 2009) and the KiNG software (Chen et al., 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

The forty-eight Putrescine N-methyltransferase sequences of Solanaceae species analyzed from protein sequences available in the NCBI database, retrieved in FASTA format, are listed in Table 1.

Table 1. Putrescine N-methyltransferase sequence analysis in species of the Solanaceae family.

Species	GB-ID	GenBank definition	Family
<i>Anisodus acutangulus</i>	ACF21005.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Anisodus acutangulus</i>	ACF21006.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Anisodus luridus</i>	AGL76988.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Anisodus tanguticus</i>	AAT99576.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Atropa belladonna</i>	BAA82261.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Atropa belladonna</i>	BAA82262.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	XP_016557670.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	XP_016553600.1	putrescine N-methyltransferase 2- like	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	KAF3624529.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	PHT78552.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum baccatum</i>	PHT30221.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum baccatum</i>	PHT45224.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum chinense</i>	PHU08967.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Capsicum chinense</i>	PHU14344.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Datura innoxia</i>	CAJ46253.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Datura innoxia</i>	CAJ46254.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Datura metel</i>	AAQ94738.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Datura stramonium</i>	CAE47481.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Hyoscyamus niger</i>	BAA82263.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	AAK49870.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	OIT40667.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	XP_019258257.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Nicotiana attenuata</i>	XP_019258255.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Nicotiana benthamiana</i>	ABY25273.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	BAA74544.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009771961.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009771962.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009786665.1	putrescine N-methyltransferase 4 isoform X1	Solanaceae
<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009786666.1	putrescine N-methyltransferase 4 isoform X2	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016446557.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	NP_001312037.1	putrescine N-methyltransferase 1	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016478024.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016478023.1	putrescine N-methyltransferase 3	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016445029.1	putrescine N-methyltransferase 4	Solanaceae
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XP_018627768.1	putrescine N-methyltransferase 1 isoform X2	Solanaceae
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XP_009606202.1	putrescine N-methyltransferase isoform X1	Solanaceae
<i>Physalis divaricata</i>	CAJ46255.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Solanum dulcamara</i>	CAQ19733.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Solanum lycopersicum</i>	NP_001233790.2	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Solanum lycopersicum</i>	CAJ46251.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Solanum lycopersicum</i>	XP_004244762.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Solanum pennellii</i>	XP_015084559.1	putrescine N-methyltransferase 2	Solanaceae
<i>Solanum pennellii</i>	XP_015078654.1	putrescine N-methyltransferase 3-like	Solanaceae
<i>Solanum tuberosum</i>	CAE53633.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006350699.1	putrescine N-methyltransferase 3-like	Solanaceae
<i>Solanum chilense</i> *	TMX00678.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Solanum commersonii</i> *	KAG5589663.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae
<i>Solanum commersonii</i> *	KAG5600829.1	putrescine N-methyltransferase	Solanaceae

GB-ID: Genbank Identification. *: Hypothetical sequence.

Observing parameters such as molecular weight, theoretical isoelectric point (pI), and the average hydrophobicity (GRAVY) of the evaluated protein sequences was possible through the ProtParam program (Table 2). The isoelectric point of the sequences varied between 5.36

(*Datura metel*) and 6.6 (*Solanum pennellii*), indicating their acidic character. These results indicate that the pIs evaluated were hydrophilic. Since the isoelectric point (pI) is the pH at which a given molecule carries no net electrical charge, pI has wide use in currently used proteomic and biochemical techniques, such as during electrophoresis, where the direction of migration of proteins in the gel depends on the charge, so it is possible to separate proteins in a gel-based on their Ip (Kozłowski, 2017).

Table 2. Analysis of the primary structure of putrescine N-methyltransferase sequences from species of the Solanaceae family.

Species	Number of amino acids	MW (kDa)	pI	GRAVY
<i>Anisodus acutangulus</i>	347	38.10	6.51	-0.001
<i>Anisodus acutangulus</i>	338	37.19	5.86	-0.034
<i>Anisodus luridus</i>	338	37.17	5.73	-0.02
<i>Anisodus tanguticus</i>	338	37.17	5.73	-0.009
<i>Atropa belladonna</i>	340	37.46	6.18	-0.032
<i>Atropa belladonna</i>	336	36.97	5.86	-0.032
<i>Capsicum annuum</i>	341	37.33	6.06	-0.023
<i>Capsicum annuum</i>	355	39.04	5.81	-0.134
<i>Capsicum annuum</i>	355	39.07	5.81	-0.141
<i>Capsicum annuum</i>	354	38.97	5.81	-0.139
<i>Capsicum baccatum</i>	341	37.37	6.14	-0.036
<i>Capsicum baccatum</i>	355	39.03	6.12	-0.148
<i>Capsicum chinense</i>	341	37.30	5.68	-0.018
<i>Capsicum chinense</i>	353	38.88	5.93	-0.111
<i>Datura innoxia</i>	340	37.37	5.88	-0.075
<i>Datura innoxia</i>	341	37.47	5.76	-0.071
<i>Datura metel</i>	343	37.46	5.36	-0.043
<i>Datura stramonium</i>	344	37.72	6.00	-0.066
<i>Hyoscyamus niger</i>	388	37.20	5.78	-0.051
<i>Nicotiana attenuata</i>	388	42.56	5.95	-0.288
<i>Nicotiana attenuata</i>	371	40.69	5.84	-0.223
<i>Nicotiana attenuata</i>	388	42.62	5.95	-0.279
<i>Nicotiana attenuata</i>	405	44.57	5.73	-0.119
<i>Nicotiana benthamiana</i>	388	42.82	6.34	-0.322
<i>Nicotiana sylvestris</i>	353	38.76	5.62	-0.104
<i>Nicotiana sylvestris</i>	430	47.17	6.20	-0.466
<i>Nicotiana sylvestris</i>	381	41.79	5.95	-0.244
<i>Nicotiana sylvestris</i>	419	45.98	6.22	-0.416
<i>Nicotiana sylvestris</i>	386	42.34	6.1	-0.256
<i>Nicotiana tabacum</i>	353	38.74	5.74	-0.083
<i>Nicotiana tabacum</i>	375	41.14	5.74	-0.219
<i>Nicotiana tabacum</i>	375	41.11	5.74	-0.226
<i>Nicotiana tabacum</i>	403	44.20	6.21	-0.364
<i>Nicotiana tabacum</i>	386	42.28	6.10	-0.266
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	364	39.87	5.69	-0.16
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	375	41.15	5.84	-0.218
<i>Physalis divaricata</i>	344	37.58	5.81	-0.066
<i>Solanum dulcamara</i>	340	37.33	6.05	-0.032
<i>Solanum lycopersicum</i>	340	37.56	6.06	-0.079
<i>Solanum lycopersicum</i>	340	37.47	6.15	-0.069
<i>Solanum lycopersicum</i>	340	37.51	6.15	-0.074
<i>Solanum pennellii</i>	340	37.48	6.60	-0.066
<i>Solanum pennellii</i>	342	37.71	6.15	-0.082
<i>Solanum tuberosum</i>	340	37.35	5.99	-0.019
<i>Solanum tuberosum</i>	339	37.43	6.15	-0.097
<i>Solanum chilense</i> *	340	37.48	6.37	-0.063
<i>Solanum commersonii</i> *	340	37.43	5.88	-0.094
<i>Solanum commersonii</i> *	333	36.76	5.93	-0.062

MW: Molecular Weight. pI: Isoelectric point. GRAVY: Grand Average of Hydrophobicity. *: Hypothetical sequence.

The GRAVY value calculation for a peptide or protein used the sum of the hydrophobicity values of all amino acids divided by the total number of residues in the sequence (Bezerra et al., 2018) which presents a negative average for the hydrophobicity index (GRAVY). The values ranged from -0.001 (*Anisodus acutangulus*) to -0.466 (*Nicotiana sylvestris*), which suggests a hydrophilic character of this protein for all species because, as defined by Kyte and Doolittle (1982), the hydrophobicity index reveals the potential of residues to interact with constituents of membrane regions or for protein stabilization through interactions between its domains.

The PMT sequences ranged in length from 336 (*Atropa belladonna*) to 430 (*Nicotiana sylvestris*) amino acids. The molecular weight (MW) ranged from 36.97 kDa (*Atropa belladonna*) to 47.17 kDa (*Nicotiana sylvestris*) (Table 2). The analysis of the subcellular localization using the CELLO2GO server predicted that the evaluated PMTs are intracellular proteins classified as cytoplasmic.

Four conserved domains were identified based on the results obtained (Figure 1). Only the PD002785 domain occurs in all analyzed sequences and associates with thermospermine synthases and spermidine synthase activity. PMTs show similarities between amino acid sequence and spermidine synthases (SPDSs), which are different from other plant methyltransferases (Junker et al., 2013). Furthermore, spermidine synthase (SPDS) is known to accept the same substrate as PMT, putrescine, despite a slightly different co-substrate, decarboxylated S-adenosyl methionine (dcSAM), which forms spermidine, which is an essential polyamine in all eukaryotic organisms (Teuber et al., 2007).

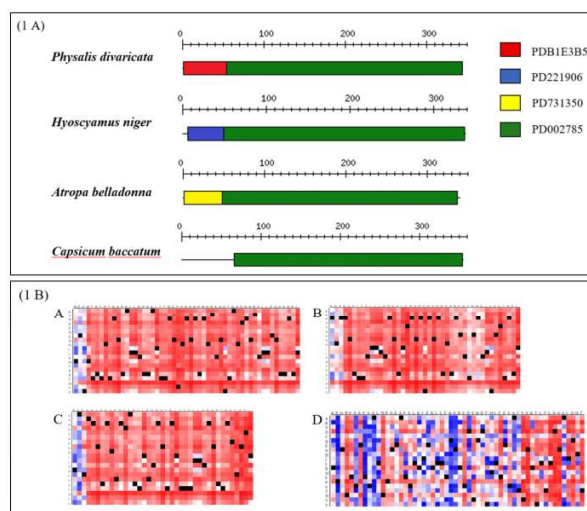


Figure 1. (1A) Functional domains observation through the ProDom server. (1B) Prediction of functional effects of amino acid mutations by SNAP2 server for domains PDB1E385 (A) *Physalis divaricata*, PD221906 (B) *Hyoscyamus niger*, PD731350 (C) *Atropa belladonna*, and PD002785 (D) *Capsicum baccatum*.

The PDB1E385 domain is present in 28 of the 49 sequences analyzed, transferring a methyl group to diamine putrescine from S-adenosyl-1-methionine (SAM) as a coenzyme. The PD221906 domain was found in six sequences, while the PD731350 domain is present

only in *Atropa belladonna*, in the sequence BAA82262.1, and both do not yet have a characterized function.

The SNAP2 server analyzed that the functional domains PDB1E385, PD221906, and PD731350 are the protein regions most sensitive to mutations. This server provided a map with the presence of different shades with possible substitution at each position of these proteins. The red color indicates strong mutation signals, the white color indicates weak signals, and the blue indicates neutrality. A smaller number of mutation-sensitive sites in the PD002785 domain explains its conservation and occurrence in all analyzed sequences (Figure 1).

The creation of the phenetic tree aimed to characterize the PMT sequences more efficiently and better understand the phylogenetic relationship between the different species belonging to the Solanaceae family under study through the MEGA 7 server. The species have the PD002785 domain, allowing the first group formation observation by sequences with the PDB1E385 domain present in the genera *Capsium*, *Datura*, *Nicotiana*, *Physalis*, and *Solanum*. This domain is involved in transferring a methyl group to the diamine putrescine from S-adenosyl-1-methionine (SAM) as a coenzyme. However, the second group formed included proteins with domains that remain uncharacterized by function.

The formation of a group with 100% support was observed, which groups the species of *Nicotiana*, belonging to the subfamily Nicotianoideae. The other genera under study comprise the subfamily Solanoideae. Such results are similar to the results obtained by Olmstead et al. (2008), who proposed a phylogeny of Solanaceae based on the *ndhF* and *trnLF* chloroplast DNA regions, comprising 89 genera and 190 species. Having the formation of the clade “x = 12” with all species joined by a base chromosome number 12, with the referred clade being one of the most strongly supported branches in the tree (99% BS), composed of two strongly supported sister groups, which would be Nicotianoideae (*Nicotiana* plus Anthocercideae 99%) and Solanoideae (95%). Subsequently, Särkinen et al. (2013), through molecular and fossil data, analyzed 40% of the total species of Solanaceae, with 34% of the sampling referring to species within the genus *Solanum*, “x = 12” is established with solid support, with Nicotianoideae resolved as sister to the clade formed by Solanoideae.

Regarding the Solanoideae subfamily, Olmstead et al. (2008) defined four clades, all with bootstrap support $\geq 78\%$, namely (1) Atropina (*Hyoscyameae*, *Lycieae*, *Jaborosa*, *Latua*, *Nolana*, and *Sclerophylax*), (2) Juanulloeae, (3) Solaneae, Capsiceae, Physaleae and Datureae, and (4) Salpichroina (*Salpichroa* and *Nectouxia*), these data later corroborated by Särkinen et al. (2013). Such placements are similar to the results obtained in the present study. One can observe the formation of a cluster between *Hyoscyamus*, *Atropa*, and *Anisodus*, which comprise the Atropina clade. Other groups formed by the genus *Solanum*, *Capsicum*, *Datura*, and *Physalis* comprise the clade, as mentioned earlier, composed of Solaneae, Capsiceae, Datureae, and Physaleae.

Figure 2 illustrates the cluster analysis of Solanaceae with the inclusion of species of the subfamily Nicotianoideae, with representatives of the tribe Nicotianeae, and of the subfamily Solanoideae, with representatives of the tribes Hyoscyameae, Solaneae, Capsiceae, Datureae, and Physaleae.

The modeling of the tertiary structure of proteins uses different methodologies, one of them being homology modeling, which uses software as tools that allow the obtaining of models through information on similarity between the sequence of the protein of interest

and deposited structures. In databases experimentally determined to extract later information on common ancestry between them (Rego, 2012). Model validation occurs through tools such as the Ramachandran chart and Z-score (Santos, 2021).

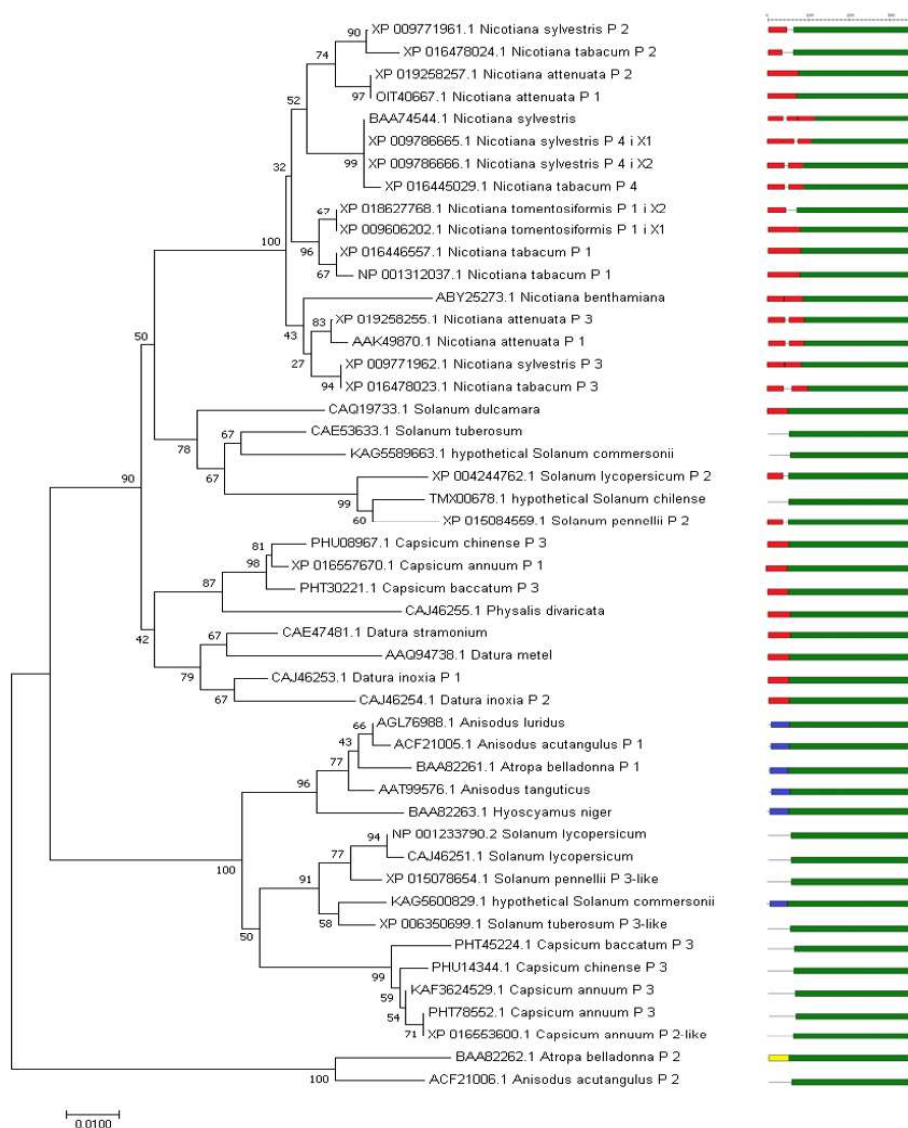


Figure 2. Cluster analysis obtained by the Neighbor-Joining method of Solanaceae species, based on putrescine N-methyltransferase sequences. The four functional domains (PD002785; PDB1E385; PD221906 and PD731350) are represented for each species.

Putrescine N-methyltransferase sequences from *Atropa belladonna*, *Capsicum baccatum*, *Hyoscyamus niger*, and *Physalis divaricata* used the Phyre2 server to predict the tertiary protein structures (Figure 3). After refinement of the 3D structures by KiNG and

Yasara Force Field software, the evaluation of models by the MOLPROBITY server for error recognition in tertiary structures. The PD221906 and PD731350 domains have one alpha-helix formation, while the PDB1E3B5 domain formed two alpha-helices. The PD002785 domain has a conserved conformation explained by the fact that it occurs in all species analyzed.

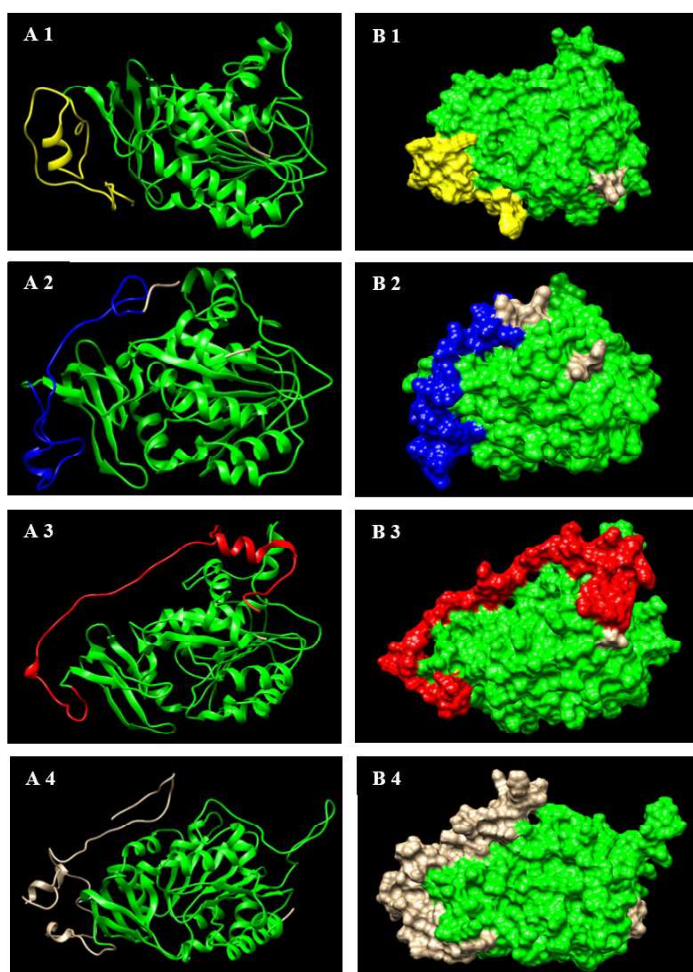


Figure 3. Three-dimensional structure of putrescine N-methyltransferase generated by Phyre2 server for *Atropa belladonna* (A1 and B1); *Hyoscyamus niger* (A2 and B2); *Physalis divaricata* (A3 and B3) and *Capsicum baccatum* (A4 and B4).

Based on the data obtained from the Prosa server, the quality of the models proved to be satisfactory, as they presented Z-score results of -8.12 for *Atropa belladonna*; -7.34 for *Capsicum baccatum*; -8.41 for *Hyoscyamus niger*; -8.05 for *Physalis divaricata*, respectively (Figure 4). According to Abreu (2015), Z-score values can be considered important from a thermodynamic and structural quality point of view. Furthermore, they can

present values very close or even higher concerning experimentally elucidated proteins, thus showing the reliability of the models.

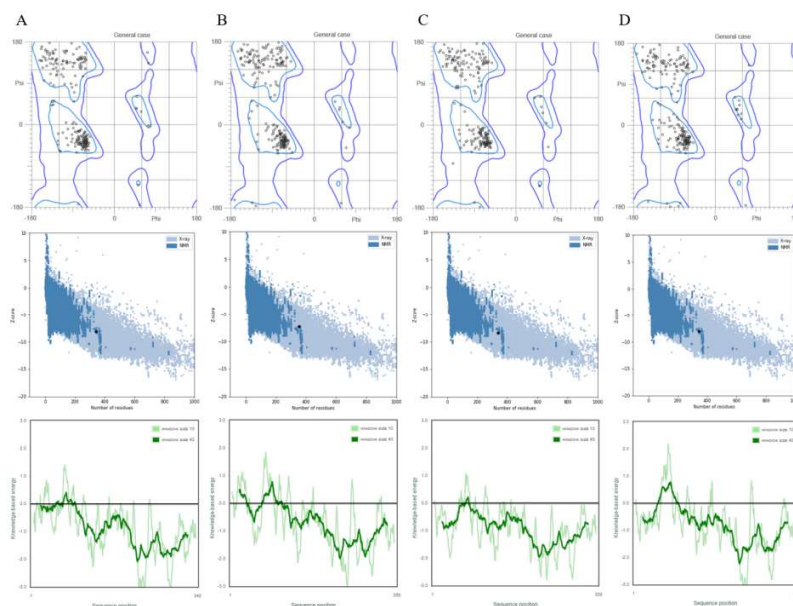


Figure 4. Analysis of the Ramachandran graph generated by the MolProbity server from the three-dimensional model built by the Phyre2 server for *Atropa belladonna* (A1); *Capsicum baccatum* (B1); *Hyoscyamus niger* (C1), and *Physalis divaricata* (D1). Z-score value by ProSA-web for *Atropa belladonna* (A2); *Capsicum baccatum* (B2); *Hyoscyamus niger* (C2) and *Physalis divaricata* (D2). Use of ProSA-web for putrescine N-methyltransferase showing residue energy scatter plot of native protein structure for *Atropa belladonna* (A3); *Capsicum baccatum* (B3); *Hyoscyamus niger* (C3) and *Physalis divaricata* (D3).

The data generated from the refined models showed 98.5, 98.9, 99.1, and 98.5% of residues in regions of propitious shape by the analysis of the Ramachandran graph for the species *Atropa belladonna*, *Capsicum baccatum*, *Hyoscyamus niger*, and *Physalis divaricata*, respectively (Figure 4).

Coding sequences generate three-dimensional structures; therefore, biological effects can be studied and evaluated more precisely. Predicting three-dimensional structures of proteins usually results in practical applications of significant therapeutic and biotechnological impact (Capriles et al., 2014; Abreu, 2015). Computational methods have become increasingly used for protein prediction, bringing a more significant basis for the experimental part, aiming at a previously determined result. Homology or comparative modeling is the most used because it effectively generates good results and the quality of the predicted models, which have a reasonable evolutionary relationship and present a greater precision than those produced with different techniques (Abreu, 2015).

CONCLUSIONS

The developed study allowed a better understanding of the functions of putrescine N-methyltransferase in the regulation of alkaloid synthesis. Allied to this, the grouping

obtained through the PMT sequences corroborates the phylogeny of species currently accepted for the Solanaceae family.

The *in silico* methodology proved to be valid and reliable in the generation of 3D models, building models within the standards, which can be considered a very close representation of the protein's actual structure.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has financial support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) including master's scholarship and institutional support from UFRPE.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Abreu RA (2015). Caracterização funcional e estrutural comparativa *in silico* de uma proteína pr-5 do tipo taumatina de *Poncirus trifoliata*. Monography, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé.
- Bezerra LCC, Queiroz EWA and Freire JEC (2018). Predição físico-química, modelagem e análise do mecanismo de interação da quitinase Mo-chil (*Moringa oleifera*, Lam.), com poli-β-(1-4)-N-acetil-d-glucosamine: uma abordagem *in silico*. *Desafios*. 5(1): 111-120.
- Biastoff S, Brandt W and Dräger B (2009). Putrescine N-metiltransferase – The start for alkaloids. *Phytochemistry* 70: 1708–1718.
- Capriles PVSZ, Trevizani R, Rocha GK, Dardenne LE, et al. (2014). Modelos Tridimensionais. In: Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular (Verli H). Organization of Hugo Verli, Porto Alegre.
- Chen VB, Arendall WB, Headd JJ and Keedy DA (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66: 12-21.
- Chen VB, Davis IW and Richardson DC (2009). KING (Kinemage, Next Generation): a versatile interactive molecular and scientific visualization program. *Protein Sci.* 18: 2403-2409.
- Corrêa JAM (2015). Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos. Doctoral thesis, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- D'arcy WG (1991). The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution (Hawkes JG, Lester RN, Nee M and Estrada N). London: Royal Botanic Gardens, KEW.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A and Duvaud S (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: The proteomics protocols handbook. Springer Protocols Handbooks (Walker JM). Humana Press, New York, 571-607.
- Geng C, Zhao T, Yang C, Zhang Q, et al. (2018). Metabolic characterization of *Hyoscyamus niger* root-specific putrescine N-metiltransferase. *Plant Physiol. Biochem.* 127: 47-54.
- Hecht M, Bromberg Y and Rost B (2015). Better prediction of functional effects for sequence variant. *BMC Genomics*. 16: S1.
- Junker A, Fischer J, Sichhart Y, Brandt W, et al. (2013). Evolution of the key alkaloid enzyme putrescine N-metiltransferase from spermidine synthase. *Front. Plant Sci.* 4: 260.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, et al. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10: 845-858.
- Knapp S (2008). A revision of the *Solanum havanense* species group and new taxonomic additions to the Geminata Clade (*Solanum*, Solanaceae). In: Annals of the Missouri Botanical Garden, 95: 405-458.
- Kozłowski LP (2017). Proteome-pI: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res.* 45(D1): D1112-D1116.
- Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, et al. (2009). Improving physical realism, stereochemistry and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* 77: 114–122.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Kyte J and Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1): 105-32.

- Leite GA, Carvalho CAC, Freitas WES, Dantas JIA, et al. (2012). A ação das poliaminas na maturação e senescência de frutos. *ACSA*. 8(4): 08-21.
- Moallem E, Ghasemiiprbalouti A, Nejadstari T, Iranbakhsh A, et al. (2017). Evaluation of expression analysis of putrescine *N*-metiltransferase gene during different stages of growth in the medicinal plant *Physalis divaricata* (Solanaceae). *Biodiversitas*. 18(4): 1430-1437.
- Olmstead RG (2013). Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. *Bot. J. Linn. Soc.* 171: 80-102.
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, et al. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*. 57(4): 1159-1181.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, et al. (2004). UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605-1612.
- Rego FOR (2012). Análise *in silico* de proteínas: modelo baseado na apolipoproteína-e relacionada à doença de Alzheimer. Monography, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- Sampaio VS, Vieira IMF, Júnior EAL and Loiola MIB (2019). Flora do Ceará, Brasil: *Solanum* (Solanaceae). *Rodriguésia*. 70: e02512017.
- Santos DS (2021). Mapeamento e análise *in silico* das proteínas referentes ao estresse salino em espécies do gênero do algodoeiro (*Gossypium* spp.). Monography, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé.
- Särkinen T, Lynn Bohs L, Olmstead RG and Knapp S (2013). A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evol. Biol.* 13: 1-15.
- Servant F, Bru C, Carrère S, Courcelle E, et al. (2002). ProDom: Automated clustering of homologous domains. *Brief. Bioinform.* 3: 246-251.
- Stehmann JR (2015). Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14696>]. Accessed April 03, 2021.
- Stenzel O, Teuber M and Dräger B (2006). Putrescine *N*-metiltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta*. 223: 200-212.
- Teuber M, Azemi ME, Namjoyan F, Meier AC, et al. (2007). Putrescine *N*-metiltransferases—a structure–function analysis. *Plant mol. Biol.* 63: 787-801.
- Wiederstein M and Sippl MJ (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 35: 407-410.
- Yu CS, Cheng CW, Su WC, Chang KC, et al. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subcellular localization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*. 9: e99368.

ANEXO II – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CERES



 Open Access

Revista Ceres

Publicação de: **Universidade Federal de Viçosa**

Área: Ciências Agrárias, Ciências Biológicas

Versão impressa ISSN: 0034-737X Versão on-line ISSN: 2177-3491

Título anterior: Ceres (Viçosa)

(Atualizado: 06/02/2023)

Sobre o periódico

Contato

Endereço postal

Universidade Federal de Viçosa - UFV

Av. Peter Henry Rolfs, s/n. CEP: 36570-000, Viçosa/MG, Brasil.

Telefone: (55) (31) 3612-2078

E-mail: ceresonline@ufv.br

ISSN: 2177-3491

Foco e escopo

A Revista Ceres é um periódico bimensal editado pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Destina-se à publicação de trabalhos científicos originais, com relevância técnico-científica, resultantes de pesquisas relacionadas às inovações e soluções dos problemas da agropecuária, com ênfase nas

pesquisas relacionadas às regiões tropicais. As áreas de abrangência são:

- Produção vegetal
- Solos e nutrição de plantas
- Melhoramento vegetal aplicado à agricultura
- Fitossanidade
- Fisiologia e morfologia aplicadas à agricultura
- Propagação vegetativa e seminífera
- Engenharia Agrícola (compreende: Irrigação e Drenagem; Física do Solo; Agrometeorologia; Agricultura de Precisão; Tecnologia e Aplicação de Defensivos)
- Produção e sanidade animal aplicadas à agropecuária

Histórico do periódico

O periódico bimestral Revista Ceres é editado desde 1939 pela Universidade Federal de Viçosa e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas originais de pesquisa nas áreas de produção e biotecnologia vegetal, medicina veterinária, zootecnia, ciência e tecnologia de alimentos, economia e extensão rural, engenharia agrícola e engenharia florestal.

Em agosto de 1939, a Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Estado de Minas Gerais (ESAV), hoje Universidade Federal de Viçosa, publicou o primeiro número de "Ceres", nome ampliado para "Revista Ceres", a partir de setembro/outubro de 1944. Seus primeiros diretores foram os professores Nello de Moura Rangel, Geraldo Gonçalves Carneiro, Octavio Drummond, Edgard de Vasconcellos Barros e Arlindo de Paula Gonçalves. Seus mais de 70 anos de existência colocam-na entre as revistas agrícolas mais antigas do país.

Inicialmente, publicava tanto artigos científicos originais como textos de divulgação técnica. Pouco a pouco, foi tornando-se cada vez mais científica e os últimos artigos de divulgação foram publicados em 1959. Atualmente, para aumentar sua visibilidade, os artigos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês.

A partir de 2008 iniciou-se a disponibilização dos artigos publicados no site www.ceres.ufv.br, em sistema de acesso aberto e irrestrito, não sendo mais necessária a assinatura anual da revista para se ter acesso ao seu conteúdo.

Fontes de indexação

- Agris - International Information System for the Agricultural Sciences and Technology
- CAB Abstracts - CABI

- DOAJ - Directory of Open Access Journal
- e-journals
- EBSCO
- Latindex - Sistema regional de información en línea pararevistas científicas de América Latina, el Caribe, España yPortugal
- Redalyc
- SciELO - Scientific Eletronic Library Online
- Scopus
- Zoological Record

Propriedade intelectual

- Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons do tipo atribuição BY.

Periodicidade

A Revista Ceres é um periódico bimestral publicado pela Universidade Federal de Viçosa desde 1947.

Política de acesso livre

A Revista Ceres oferece livre acesso ao seu conteúdo, de maneira rápida e segura, via digital. Em consonância com nossos valores, acreditamos que disponibilizar gratuitamente o conhecimento científico à toda comunidade (nacional e internacional) proporciona maior difusão e democratização do conhecimento, resultando em avanços tecnológicos mais rápidos e consistentes.

Política anti-plágio

A Revista Ceres é um dos periódicos mais antigos e tradicionais do Brasil. Por isso, privamos pela qualidade, idoneidade e originalidade das publicações. Neste sentido, os trabalhos enviados à Revista Ceres devem ser inéditos. Textos, tabelas e figuras não podem ter sido publicados anteriormente em outros veículos de divulgação científica. Sendo assim, os autores deverão assumir a responsabilidade de que os artigos submetidos são originais e que não contém partes de textos, dados, tabelas ou figuras, publicados anteriormente.

A falsificação de dados é uma falta grave.

A fim de assegurar a originalidade dos trabalhos publicados, a Revista Ceres utiliza avançadas ferramentas de detecção de plágio. A CERES adota o programa *CrossRef Similarity Check*

paraverificação de duplicidade com textos já publicados.

Patrocinadores

- Editora UFV
- Universidade Federal de Viçosa

Agências de Fomento

A Revista Ceres é financiada pela Universidade Federal de Viçosa e conta com o pagamento das publicações pelos autores. Além disso, a Revista Ceres é patrocinada pelo CNPq, Capes e Fapemig.

Corpo editorial

Editor-chefe

- Teógenes Senna de Oliveira - Universidade Federal de Viçosa(UFV), Viçosa, MG, Brasil, teo@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0002-9904-6708>

Co-editores

- Danielle Fabíola Pereira da Silva – Universidade Federal de Jataí (UFJ), Jataí, GO, Brasil, daniellefpsilva@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7366-5650>
- Maríhus Altoé Baldotto – Universidade Federal de Viçosa(UFV), Florestal, MG, Brasil, marihus@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0002-3239-9082>
- Ricardo Henrique Silva Santos – Universidade federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, rsantos@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0001-8549-8861>

Editores associados

Biotecnologia vegetal, biologia molecular e genômica

- Marcos Aparecido Gimenes - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil, marcos.gimenes@embrapa.br, <https://orcid.org/0000-0002-8190-6212>
- Marcos Vinicius Bohrer Monteiro Siqueira - Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Frutal, MG, Brasil, mvbsiqueira@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6541-0903>
- Marcus Alvarenga Soares – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina,

MG, Brasil,marcus.alvarenga@ufvjm.edu.br,
<https://orcid.org/0000-0002-8725-3697>

- Ricardo Antônio Ayub - Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brasil, rayub@uepg.br, <https://orcid.org/0000-0003-3240-8417>

Engenharia Agrícola

- Domingos Sárvio Magalhães Valente - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, valente@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0001-7248-8613>
- Fernando França da Cunha - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, fernando.cunha@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0002-1671-1021>
- Lucas de Paula Corrêdo – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (UFV), MG, Brasil, lucas.corredo@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0001-8175-5461>

Fisiologia e morfologia aplicadas à agricultura

- Junia Maria Clemente - Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Santa Maria de Jetibá, ES, Brasil, junia.clemente@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2198-9861>
- Ricardo Antônio Marengo - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil, rmarengo@inpa.gov.br, <https://orcid.org/0000-0002-9490-2624>
- Sylvana Naomi Matsumoto - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Vitória da Conquista, BA, Brasil, sylvananaomi@yahoo.com.br, <https://orcid.org/0000-0002-7182-6745>
- Wagner Luiz Araújo - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, wlaraujo@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0002-4796-2616>

Fitossanidade

- Andréa Bittencourt Moura – Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil, abmoura@ufpel.edu.br, <https://orcid.org/0000-0002-6781-4231>
- José Wagner da Silva Melo – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil, wagnermelo@ufc.br, <https://orcid.org/0000-0003-1056-8129>
- Renato de Almeida Sarmiento – Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi, TO,

Brasil, rsarmento@mail.uft.edu.br, <https://orcid.org/0000-0002-5379-9595>

- Tiago Kaspary - Instituto Nacional de Investigacion Agropecuaria (INIA), Montevideo, La Estanzuela, Uruguay, tkaspary@inia.org.uy, <https://orcid.org/0000-0003-3084-1938>

Melhoramento vegetal aplicado à agricultura

- Elizanilda Ramalho do Rego - Universidade Federal de Pernambuco (UFPB), Campina Grande, PB, Brasil, elizanilda@cca.ufpb.br, <https://orcid.org/0000-0001-7376-7569>
- Maicon Nardino - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, nardino@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0002-4177-4921>

Propagação vegetativa e seminífera

- Americo Wagner Júnior - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Dois Vizinhos, PR, Brasil, americowagner@utfpr.edu.br, <https://orcid.org/0000-0001-5081-5281>
- Diego Ismael Rocha – Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, diego.rocha@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0001-6683-0961>

Produção Vegetal

- Adriene Woods Pedrosa, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, adriene.pedrosa@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0002-1309-3088>
- Alejandro Hurtado Salazar - Universidade de Caldas, Manizales, Caldas, Colômbia, alhuza@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1251-125X>
- Fábio Luiz de Oliveira - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil, fabio.oliveira.2@ufes.br, <https://orcid.org/0000-0002-1711-6988>
- José Luis da Silva Nunes - Badesul, Porto Alegre, RS, Brasil, silva.nunes@ufrgs.br, <https://orcid.org/0000-0003-2601-7153>
- Mateus Pereira Gonzatto - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil, mateus.gonzatto@ufv.br, <https://orcid.org/0000-0001-6394-2802>
- Rogério Faria Vieira - Empresa de Pesquisa Agropecuária

de Minas Gerais (Epamig), Viçosa, MG, Brasil,
fariavieira@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5286-8392>

- Thiago de Oliveira Vargas - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Pato Branco, PR, Brasil, vargasthiago@yahoo.com.br, <https://orcid.org/0000-0003-3665-5917>

Solos e nutrição de plantas

- Angélica Araújo Queiroz – Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM), Uberlândia, MG, Brasil, angelica@iftm.edu.br, <https://orcid.org/0000-0001-7113-539X>
- Cândido Alves da Costa – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil, candido-costa@ufmg.br, <https://orcid.org/0000-0002-1859-1422>
- Davi José Silva - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Petrolina, Pernambuco, Brasil, davi.jose@embrapa.br, <http://orcid.org/0000-0003-0447-2999>
- Fábio Ribeiro Pires - Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), São Mateus, ES, Brasil, pires.fr@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6534-3475>
- Francisco Alisson da Silva Xavier - Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brasil, alisson.xavier@embrapa.br, <https://orcid.org/0000-0002-8141-2343>
- Henrique Antunes de Souza - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Teresina, Piauí, henrique.souza@embrapa.br; <https://orcid.org/0000-0002-2209-4285>
- Maribela Pestana - Universidade do Algarve (UALg), Faro, Algarve, Portugal, fpestana@ualg.pt, <https://orcid.org/0000-0002-4319-1682>
- Yuri Jacques Agra Bezerra da Silva – Universidade Federal do Piauí (UFPI), Bom Jesus, PI, Brasil, yuriufrpe@yahoo.com.br, <https://orcid.org/0000-0001-6865-7146>

Produção editorial

Revisão linguística

- Isabel Rademaker Valença e Evelyn Jardim de Oliveira.

Composição e Diagramação

Instruções aos autores

1. Submissões

Os trabalhos devem ser submetidos exclusivamente *online* acessando-se o site www.ceres.ufv.br.

2. Tipos de trabalhos

A Revista Ceres publica Artigos, Comunicações, Revisões (a convite) e Cartas ao Editor.

Artigo: Deve relatar um trabalho original completo, em que a reprodutibilidade dos resultados está claramente estabelecida.

Comunicação: Deve relatar resultados conclusivos e não dados preliminares. É um formato alternativo para descrever, de forma mais concisa, resultados parciais de um trabalho mais amplo, ou derelatar resultados conclusivos baseados em um menor volume de dados.

Revisão: Deve reportar, em profundidade, o estado da arte de determinado tema, após convite da Comissão Editorial, sem limite de páginas.

Carta ao editor: Deve retratar, de forma informal, algum tema técnico-científico de interesse da comunidade de ciências agrárias ou biológicas. Sua publicação fica a critério da Comissão Editorial.

3. Estrutura do artigo e comunicações

O manuscrito deve ter o seguinte formato:

a. Title

Deverá ter no **máximo 20 palavras**, centralizadas e em negrito. Apenas a primeira palavra com a letra inicial em maiúscula e as demais em minúscula, exceto em casos pertinentes (p. ex., nomes científicos; *Phaseolus vulgaris*). Se necessário, introduzir nota de rodapé, ao seu final, usando algarismo arábico sobrescrito. (veja o item rodapé).

b. Abstract

A palavra "ABSTRACT" deve ser escrita em letra maiúscula, alinhada à esquerda e ter aplicação de negrito. Essa seção deve conter no **máximo 200 palavras** e ter apenas um parágrafo. O texto deve conter, em linhas gerais, a hipótese, os objetivos,

material e métodos utilizados, resultados expressivos alcançados e a conclusão. O texto deve ser iniciado na linha subsequente ao título dessa seção.

c. Keywords

As Keywords devem ter um número **mínimo de três e máximo de seis palavras** e devem ser citadas em parágrafo subsequente ao resumo. Devem ser grafadas com inicial minúscula (exceto os nomes científicos) e separadas por **ponto e vírgula**, sem repetir palavras contidas no título do trabalho.

d. Introduction

O título dessa seção, "INTRODUCTION", deve ser escrito em letra maiúscula, alinhado à esquerda. A introdução deve ater-se ao problema do trabalho em pauta, situando o leitor quanto à sua importância, hipótese da pesquisa e os objetivos, estando estes últimos claramente expressos ao final da introdução.

e. Material and methods

O título dessa seção, "MATERIAL AND METHODS", deve ser escrito em letra maiúscula, alinhado à esquerda. A seção deve ser redigida com detalhe suficiente para que o trabalho possa ser repetido. A Revista Ceres requer que estejam especificados no artigo os procedimentos estatísticos, incluindo: o delineamento utilizado, o número de repetições e a técnica estatística empregada. Quando não houver delineamento, o artigo deve descrever claramente como foi feita a condução da pesquisa, e qual a técnica estatística utilizada para a análise dos dados. Quando os tratamentos se constituírem de fatores quantitativos com três ou mais níveis, as variáveis de resposta devem ser submetidas à análise de regressão. Se for de interesse comparar os níveis com o padrão ou testemunha, o teste adotado deve ser o Dunnett. Casos excepcionais serão avaliados pela Comissão Editorial.

f. Results and discussion

O título da seção, "RESULTS AND DISCUSSION", deve ser escrito em letra maiúscula, alinhado à esquerda. O texto deve ser claro e conciso, apoiado na literatura pertinente. **Results and Discussion são seções que podem vir juntas ou separadas.**

Obs: As seções **Material and Methods** e **Results and Discussion** poderão conter subseções, indicadas por subtítulos escritos em **itálico e negrito**, iniciados por letra maiúscula e centralizados.

g. Conclusions

O título da seção "CONCLUSIONS" deve ser escrito em letra maiúscula, alinhado à esquerda. As conclusões devem ser concisas e derivadas dos dados apresentados e discutidos. Cada conclusão deve constituir parágrafo novo.

h. Acknowledgements, financial support and full disclosure

O título da seção "ACKNOWLEDGEMENTS, FINANCIAL SUPPORT AND FULL DISCLOSURE" deve ser grafado em letra maiúscula e alinhado à esquerda. Os autores devem informar se receberam financiamento ou apoio de instituições de incentivo à pesquisa.

Os autores devem declarar nesta seção se há, ou não, algum conflito de interesse na condução e publicação do trabalho.

i. References

O título da seção "REFERENCES" deve ser escrito em letra maiúscula, alinhado à esquerda. As referências devem ser listadas por ordem alfabética. As normas para a elaboração das referências encontram-se, ainda nesta página, em **NORMAS PARAREFERÊNCIAS**.

4. Formatação do texto

O texto deve ser digitado em Microsoft Word, justificado, em espaçoduplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. O formato da página deverá ser A4, com margens de 3 cm. As linhas do texto devem apresentar numeração contínua.

a. Tamanho do artigo

Os artigos devem ter, **no máximo, 25 páginas**, incluindo-se as referências, figuras e tabelas. As comunicações devem ter, **no máximo, 15 páginas**, incluindo-se as referências, figuras e tabelas.

b. Autoria

Artigos e comunicações devem ter, no máximo, seis autores. Todos os autores deverão ter o registro ORCID - Connecting Research and Researchers, pois este será exigido na submissão do artigo.

c. Idioma

A Revista Ceres aceita a submissão de artigos somente na língua inglesa. O domínio do idioma inglês padrão também é critério fundamental para a avaliação do artigo. Portanto, sugerimos aos autores que não tem proficiência em Língua Inglesa que enviem o manuscrito a um revisor competente para fazer a revisão do artigo. Os autores que quiserem sugestão de revisores/tradutores devem enviar um e-mail para ceresonline2@gmail.com.

5. Encaminhamento de arquivos

No ato da submissão os autores deverão enviar os seguintes

arquivos:

a. O artigo (contendo o texto sem identificação de autoria)

b. Folha de rosto (Title page)

A **title page** deve conter o título do artigo, os autores, logo abaixo do título, em sequência e centralizado, e as notas de rodapé referentes a cada autor.

O RODAPÉ deve conter as seguintes informações:

A primeira nota deve fornecer informações sobre o trabalho (se foi extraído de tese, dissertação, etc., e fonte financiadora) e as demais, informações sobre a afiliação de cada um dos autores, obedecendo à seguinte ordem: Instituição, departamento (quando houver), cidade, estado, país e e-mail. Não utilizar abreviações para nenhuma informação do rodapé. Para autores vinculados à mesma instituição e departamento, deve-se utilizar a mesma nota de rodapé.

Na última linha do rodapé inserir um asterisco e indicar o e-mail do autor correspondente. Ex: *Corresponding author: maria@ufv.br

c. Author contribution (deve-se especificar qual foi a contribuição de cada autor no desenvolvimento da pesquisa).

O arquivo com o artigo deve ser enviado como "**main document**" e os demais como "**supplemental file not for review**".

6. Normas para referências

O título da seção "REFERENCES" deve ser escrito em letra maiúscula, alinhado à esquerda. As referências devem ser listadas por ordem alfabética. Seguem os exemplos:

a) Artigos de periódicos:

Pinto JD (2006) A review of the new world genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, 15:38–163.

Possenti JC & Villela FA (2010) Efeito do molibdênio aplicado via foliar e via sementes sobre o potencial fisiológico e produtividade de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, 32:143–150.

Martinez HEP, Poltronieri Y & Cecon PR (2015) Supplying zinc salt tablets increased zinc concentration and yield of coffee trees. *Journal of Plant Nutrition*, 38:136-140.

Stefanello Júnior GJ, Grützmacher AD, Spagnol D, Pasini RA,

Bonez C & Moreira DC (2012) Persistência de agrotóxicos utilizados na cultura do milho ao parasitoide *Trichogramma pretiosu* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ciência Rural*, 42:17-23.

b) Livros:

Mengel K & Kirkby EA (2001) *Principles of plant nutrition*. 5ª ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 849p.

c) Capítulos de livros:

Martinez HEP, Neves JCL, & Alvarez VH (2017) Mineral Nutrition and Fertilization. In: Adriana Farah (Ed.) *Coffee: Chemistry, Quality and Health*. London, Royal Society of Chemistry. p.99-999.

d) Trabalhos em anais de congresso:

Junqueira Netto A, Sedyama T, Sedyama CS & Rezende PM (1982) Análise de adaptabilidade e estabilidade de dezesseis cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em seis municípios dos sul de Minas Gerais. In: 1ª Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, Goiânia. Proceedings, EMBRAPA/CNPAP. p.47-48.

e) Teses e dissertações:

Fritsche-Neto R (2011) Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho. Doctoral Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 39p.

Hanauer JG (2011) Crescimento, desenvolvimento e produtividade em cultivo de cana-planta e cana-soca de um ano em Santa Maria, RS. Master Dissertation. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 81p.

f) CD-ROM:

França MHC & Omar JHDH (2004) Estimativa da função de produção do arroz no estado do Rio Grande do Sul: 1969 a 1999. In: 2º Encontro de Economia Gaúcha, Porto Alegre. Proceedings, FEE. CD-ROM.

g) Internet:

Darolt MR & Skora Neto F (2002) Sistema de plantio direto em agricultura orgânica. Available at: <https://ciorganicos.com.br/wp-content/uploads/2012/07/Plantio-1.pdf>. Accessed on: April 24th, 2013.

h) Boletim técnico:

Bastos DC, Scarpere Filho JA, Fatinansi JC, Pio R & Spósito MB (2004) A cultura da lichia. Piracicaba, DIBD/ESALQ. 23p. (Technical Bulletin, 26).

Cruz I (1995) A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e

Sorgo. 45 p. (Circular, 21).

i) Programas estatísticos:

R development core team (2010) R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://research.cbs.dk/en/publications/r-development-core-team-2010-r-a-language-and-environment-for-sta>.

Accessed on: January15th, 2012.

SAS Institute Inc. (2002) Statistical Analysis System user's guide. Version 9.0. Cary, Statistical Analysis System Institute. 513p.

Universidade Federal de Viçosa (2007) SAEG: Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas. Versão 9.1. Viçosa, Fundação Arthur Bernardes. CD-ROM.

j) Legislação:

Brasil (2000) Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. DOU, 10/01/2000, Seção 1, p.259.

Brasil (2001) Resolução RDC n. 12, de 02 janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. DOU, 01/25/2001, Section 1, p.174.

7. Normas de citação de referências no texto

Citação no Texto

No texto, citar as referências nos formatos: (Autor, Ano), (Autor & Autor, Ano), (Autor *et al.*, Ano) ou (Silva, 1999; Arariki & Borges, 2003; Santos *et al.*, 2007), sempre em ordem cronológica ascendente. A referência deve ser citada ao final de um período que expresse uma ideia completa. Quando os nomes dos autores forem parte integrante do texto, menciona-se a data da publicação citada entre parênteses, logo após o nome do autor, conforme exemplos: Fontes (2008), Borges & Loreno (2014), Batista *et al.* (2016).

Citação de citação

Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Entretanto, nem sempre é possível. Nesse caso, pode-se reproduzir informação já citada por outros autores. Pode-se adotar o seguinte procedimento: no texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão "cited by" e o sobrenome do autor do documento consultado com o ano de publicação; na listagem das referências deve-se incluir a referência completa da fonte consultada.

Comunicação pessoal

Não faz parte da lista de referências, sendo colocada apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão "personal communication", a data da comunicação, nome, estado e país da Instituição ao qual o autor é vinculado.

8. Normas para figuras e tabelas

As figuras e tabelas devem ser posicionadas **após sua chamada no texto**. Elas devem ser numeradas com algarismos arábicos, ficando a legenda posicionada abaixo nas figuras e acima nas tabelas.

Figuras e tabelas não devem repetir os mesmos dados. Figuras submetidas em formato eletrônico devem apresentar **resolução mínima de 300 dpi, em formato JPG**. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) de onde foi extraída.

A referência bibliográfica completa relativa à fonte da ilustração deve figurar na seção "References".

a. Tabelas

O termo refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Deve ser construída apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Table, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico, separado do enunciado da tabela **por dois pontos** e é referida no texto como Table. Colunas compostas por números fracionários, esses devem ser alinhados pela vírgula.

b. Figuras

O termo refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. Os desenhos, gráficos, etc. devem ser bem nítidos. As legendas recebem inicialmente a palavra Figure, seguida do número de ordem em algarismo arábico separado do enunciado da figura **por dois pontos** e é referida no texto como "Figure".

9. Custos

A publicação do trabalho implicará o pagamento de uma taxa de R\$500,00. O pagamento deverá ser efetuado quando o autor correspondente receber a prova tipográfica e será feito exclusivamente na forma de Boleto Eletrônico. De posse do boleto impresso, basta quitá-lo em uma agência bancária ou caixa automática e enviar cópia para o e-mail que enviou a prova tipográfica. Solicita-se informar, via e-mail, a data e o

número do boleto, quando forem feitos depósitos em que os autores não são identificados (recursos de convênios, departamentos, coordenações, etc.).

10. Política de privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

11. Áreas e subáreas de publicação

01 - Biotecnologia vegetal, biologia molecular e genômica

01.01 - Biossegurança

01.02 - Biotecnologia vegetal

01.03 - Cultura de tecidos

01.04 - Genômica

01.05 - Interação planta patógeno

01.06 - Interação molecular planta-praga

01.07 - Marcadores moleculares

01.08 - Morfoanatomia

01.09 - Propagação de Plantas

02 - Engenharia Agrícola

02.01 - Agricultura de precisão

02.02 - Agrometeorologia

02.03 - Irrigação e drenagem

02.04 - Impacto ambiental de tecnologias

02.05 - Mecanização agrícola

02.06 - Tecnologia de aplicação de agrotóxicos

03 - Fisiologia e morfologia vegetal aplicadas à agricultura

03.01 - Botânica

03.01.01 - Biologia da Reprodução de plantas cultivadas

03.01.02 - Botânica Estrutural (morfologia e anatomia de plantas cultivadas)

03.01.03 - Florística de plantas cultivadas

03.02 - Fisiologia de plantas cultivadas

03.03 - Metabolismo e reguladores de crescimento

04 - Fitossanidade

04.01 - Entomologia Agrícola

04.01.01 - Acarologia agrícola

04.01.02 - Comportamento de Insetos

04.01.03 - Controle biológico de insetos-praga

- 04.01.04 - *Entomologia florestal*
- 04.01.05 - *Interação molecular inseto-planta*
- 04.01.06 - *Manejo integrado de pragas*
- 04.01.07 - *Semioquímicos*
- 04.01.08 - *Resistência de plantas à insetos*
- 04.01.09 - *Biologia molecular*
- 04.02 - *Fitopatologia*
 - 04.02.01 - *Controle biológico de patógenos*
 - 04.02.02 - *Controle químico de patógenos*
 - 04.02.03 - *Fungos do solo*
 - 04.02.04 - *Manejo e controle integrado de patógenos*
 - 04.02.05 - *Resistência genética de plantas a patógenos*
 - 04.02.06 - *Nematologia*
 - 04.02.07 - *Virologia*
- 04.03 - *Matologia*
 - 04.03.01 - *Biologia e manejo de plantas daninhas*
 - 04.03.02 - *Dinâmica dos herbicidas no ambiente*
 - 04.03.03 - *Fitossociologia de plantas daninhas*
 - 04.03.04 - *Resistência de plantas daninhas à herbicidas*
 - 04.03.05 - *Seletividade de herbicidas às culturas*
- 05 - Melhoria vegetal aplicado à agricultura**
 - 05.01. *Conservação e uso de germoplasma*
 - 05.02. *Evolução de Plantas Tropicais*
 - 05.03. *Genética Vegetal*
 - 05.03.01 - *Genética Molecular quantitativa*
 - 05.03.02 - *Genética Molecular Vegetal*
 - 05.03.03 - *Genética Quantitativa*
 - 05.04. *Melhoramento de Plantas*
 - 05.05 - *Recursos genéticos vegetais*
 - 05.05.01 - *Recursos genéticos de espécies florestais nativas*
 - 05.05.02 - *Recursos genéticos de plantas forrageiras*
 - 05.06 - *Resistência de plantas às doenças*
 - 05.07 - *Varição somaclonal*
- 06 - Propagação vegetativa e seminífera**
 - 06.01 - *Propagação vegetativa*
 - 06.02. *Propagação Seminífera*
 - 06.02.01 - *Controle de qualidades de sementes*
 - 06.02.02 - *Fisiologia de sementes*
 - 06.02.03 - *Dormência de sementes*
 - 06.02.04 - *Patologia de sementes*
 - 06.02.05 - *Produção de sementes*
 - 06.02.06 - *Tecnologia de pós-colheita de sementes*
 - 06.02.06.01 - *Secagem*

06.02.06.02 - *Beneficiamento*

06.02.06.03 - *Armazenamento*

06.03. *Produção de mudas*

07 - Produção Vegetal

07.01 - *Agricultura Orgânica e Agroecologia*

07.01.01 - *Adbos verdes e adubos orgânicos*

07.01.02. - *Manejo de cultivos orgânicos*

07.02 - *Bioenergia*

07.03 - *Cereais*

07.03.01 - *Arroz*

07.03.02 - *Milho*

07.03.03 - *Trigo*

07.04 *Fruticultura*

07.04.01 - *Fruticultura de clima temperado*

07.04.02 - *Fruticultura de clima tropical*

07.04.03 - *Fruticultura de clima subtropical*

07.05 - *Grandes Culturas*

07.05.01 - *Algodão*

07.05.02 - *Café*

07.05.03 - *Cana*

07.06 - *Leguminosas*

07.06.01 - *Feijoeiro*

07.06.02 - *Soja*

07.07 - *Olericultura*

07.07.01 - *Cultivo Protegido e cultivo sem*

*solo*07.07.01.01 - *Cultivo protegido*

07.07.01.02 - *Cultivo hidropônico*

07.07.02. - *Produção de hortaliças*

07.08 - *Plantas medicinais*

07.08.01 - *Química de produtos naturais*

07.08.02 - *Óleos essenciais*

07.09 - *Plantas ornamentais*

07.09.01 - *Produção de plantas ornamentais*

07.09.02 - *Paisagismo*

07.10 - *Pós Colheita*

07.10.01 - *Pós Colheita de olerícolas*

07.10.02 - *Pós Colheita de frutas*

07.11 - *Produção de Mudas*

08 - Solos e nutrição de plantas

08.01 - *Adubos e adubação*

08.02 - *Fertilidade do Solo*

08.03 - *Física do Solo*

08.04 - *Geoprocessamento*

- 08.04.01 - *Sensoriamento remoto*
- 08.04.02. *Sistema de informações geográficas*
- 08.05 - *Manejo e Conservação do Solo e Água*
 - 08.05.01 - *Erosão e conservação do solo*
 - 08.05.02 - *Sistemas de cultivo convencional e mínimo (plantio direto)*
 - 08.05.03 - *Poluição do solo*
 - 08.05.04 - *Recuperação de áreas degradadas*
- 08.06. - *Matéria orgânica*
- 08.07 - *Microbiologia e Bioquímica do Solo*
- 08.08 - *Mineralogia, gênese, morfologia e classificação*
- 08.09 - *Nutrição Mineral de Plantas*
- 08.10 - *Planejamento do uso da terra*
- 08.11 - *Pedologia e classificação de solos*
 - 08.11.01- *Pedometria*
- 08.12 - *Química do Solo*

Universidade Federal de Viçosa

Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000 Viçosa, Minas Gerais Brasil, Tel./Fax: (55 31) 3612-2078 - Viçosa - MG
- Brazil

E-mail: ceresonline@ufv.br

SciELO - Scientific Electronic Library Online

Rua Dr. Diogo de Faria, 1087 – 9º andar – Vila Clementino 04037-003 São Paulo/SP -
Brasil E-mail: scielo@scielo.org



ANEXO III – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH



LAR NAVEGAR PUBLICAR SOBRE INDEXADORES CONTATO



Início » [Publicar](#)

DIRETRIZES DE SUBMISSÃO

RESUMO DE ESTILO E FORMATO

Formato de arquivo	Os arquivos de manuscritos podem estar nos seguintes formatos: DOC ou DOCX. Os documentos do Microsoft Word não devem ser bloqueados ou protegidos.
Comprimento	Os manuscritos podem ter qualquer tamanho. Não há restrições quanto à contagem de palavras, número de figuras ou quantidade de informações de suporte. Nós encorajamos você a apresentar e discutir suas descobertas de forma concisa.
Fonte	Use fonte Times New Roman e tamanho 12.
Títulos	Limite as seções e subseções do manuscrito a 3 níveis de título. Certifique-se de que os níveis dos títulos estejam claramente indicados no texto do manuscrito.
Disposição	O texto do manuscrito deve estar em espaço duplo. Não formate o texto em várias colunas.
Números de página e linha	Inclua números de página e números de linha no arquivo do manuscrito.
notas de rodapé	Notas de rodapé não são permitidas. Se o seu manuscrito contiver notas de rodapé, mova as informações para o texto principal ou para a lista de referências, dependendo do conteúdo.
Linguagem	Os manuscritos devem ser submetidos em inglês.
Abreviaturas	Defina abreviaturas na primeira aparição no texto. Não use abreviações não padronizadas. Os arquivos de informações não compatíveis são carregados separadamente, a menos que apareçam pelo menos três vezes no texto. Reduza ao mínimo as abreviações.
equações	Recomendamos o uso de MathType para exibição e equações em linha, pois fornecerá o resultado mais confiável. Se isso não for possível, o Equation Editor é aceitável. Evite usar o MathType ou o Equation Editor para inserir variáveis simples (por exemplo, "a ² + b ² = c ² "), símbolos gregos ou outros (por exemplo, β, Δ ou ' [prime]) ou operadores matemáticos (por exemplo, x, ≥, ou ±) em texto corrido. Sempre que possível, insira símbolos únicos como texto normal com os valores Unicode (hex) corretos. Não use MathType ou Equation Editor apenas para uma parte de uma equação. Em vez disso, certifique-se de que toda a equação seja incluída. Evite equações "híbridas" em linha ou de exibição, nas quais parte é texto e parte é MathType, ou parte é MathType e parte é Editor de Equações.

Nomenclatura	Use nomenclatura correta e estabelecida sempre que possível.	
	<i>Unidades de medida</i>	Use unidades do SI. Se você não os usar exclusivamente, forneça o valor SI entre parênteses após cada valor.
	<i>Drogas</i>	Forneça o nome internacional não proprietário recomendado (rINN).
	<i>Nomes de espécies</i>	Escreva em itálico (por exemplo, <i>Homo sapiens</i>). Escreva por extenso o gênero e a espécie, tanto no título do manuscrito quanto na primeira menção de um organismo em um artigo. Após a primeira menção, pode ser usada a primeira letra do nome do gênero seguida do nome completo da espécie (por exemplo, <i>H. sapiens</i>).
	<i>Genes, mutações, genótipos e alelos</i>	Escreva em itálico. Use o nome recomendado consultando o banco de dados de nomenclatura genética apropriado (por exemplo, HUGO para genes humanos). Prefixos de genes, como aqueles usados para oncogenes ou localização celular, devem ser mostrados em caracteres romanos (por exemplo, v-fes, c-MYC).

ORGANIZAÇÃO DO MANUSCRITO

A maioria dos manuscritos deve ser organizada da seguinte forma. As instruções para cada elemento aparecem abaixo.

Título
 Autores
 Afiliações
 Abstrato
 Introdução
 Material e métodos
 Resultados
 Discussão
 Agradecimentos
 Referências
 Material suplementar

A uniformidade no formato facilita a experiência dos leitores e usuários da revista.

Observe também que os Resultados e a Discussão podem ser combinados em uma seção de Resultados/Discussão e que uma seção de Conclusão também pode ser incluída.

OUTROS ELEMENTOS

As legendas das figuras são inseridas imediatamente após o primeiro parágrafo em que a figura é citada. Os arquivos de figuras são carregados separadamente.

As tabelas são inseridas imediatamente após o primeiro parágrafo em que são citadas. Os arquivos de informações de suporte são carregados separadamente.

PARTES DE UMA SUBMISSÃO

TÍTULO

Inclua um título completo e um título curto para o manuscrito.

TÍTULO	COMPRIMENTO	DIRETRIZES	EXEMPLOS
--------	-------------	------------	----------

Título completo	150 caracteres	Específico, descritivo, conciso e compreensível para leitores fora do campo. Não deve	Haplótipos de <i>qGL3</i> e seus papéis na regulação do tamanho de grão com alelos <i>GS3</i> em arroz
TÍTULO	COMPRIMENTO	DIRETRIZES	EXEMPLOS
		inferir informações de resultado.	Associação de polimorfismos da IL-18 com artrite reumatóide: uma meta-análise
título atual	60 caracteres	Informe o tema do estudo	Haplótipos de <i>qGL3</i> e seus papéis reguladores com polimorfismos <i>GS3</i> IL-18 e artrite reumatoide

Os títulos devem ser escritos com letras maiúsculas apenas na primeira palavra e nos nomes das espécies/genes. Evite abreviaturas especializadas, se possível. Para ensaios clínicos, revisões sistemáticas ou metanálises, o subtítulo deve incluir o desenho do estudo.

LISTA DE AUTORES

Quem pertence à lista de autores

Todos os autores devem atender aos critérios de autoria descritos na política de autoria.

Aqueles que contribuíram com o trabalho, mas não atendem aos critérios de autoria, podem ser mencionados nos Agradecimentos.

Nomes dos autores e afiliações

Digite os nomes dos autores na página de título do manuscrito e no sistema de submissão online. Na página de título, escreva os nomes dos autores na seguinte ordem:

Iniciais dos nomes próprios e do meio

Sobrenome (sobrenome, sobrenome)

Virgula entre cada autor, exceto para os dois últimos, onde "e" é usado. Não há espaço entre as iniciais.

Cada autor na lista deve ter uma afiliação. A afiliação inclui departamento, universidade ou afiliação organizacional e sua localização, incluindo cidade, estado/província (se aplicável) e país (sem períodos finais).

Se um autor tiver várias afiliações, insira todas as afiliações apenas na página de título.

Os nomes dos autores serão publicados exatamente como aparecem no arquivo do manuscrito. Por favor

verifique as informações cuidadosamente para se certificar de que estão corretas.

autor correspondente

Um autor correspondente deve ser designado no sistema de submissão, bem como na página de título.

Um autor correspondente deve ser designado no sistema de submissão. Entretanto, o GMR permite a inclusão de mais um autor correspondente que poderá constar no artigo em caso de publicação. Quem for designado como autor correspondente na página de título do arquivo do manuscrito será listado como tal após a publicação.

Inclua um endereço de e-mail para cada autor correspondente listado na página de título do manuscrito.

FOLHA DE ROSTO

O título, autores e afiliações devem ser incluídos em uma página de título como a primeira página do arquivo do manuscrito.

ABSTRATO

O Resumo vem após a página de título no arquivo do manuscrito e deve ser escrito em um único parágrafo. O texto do resumo também é inserido em um campo separado no sistema de submissão.

O Resumo do trabalho deve ser sucinto; não deve exceder 300 palavras. Os autores devem mencionar as técnicas utilizadas sem entrar em detalhes metodológicos e devem resumir os resultados mais importantes.

Embora o Resumo esteja conceitualmente dividido em três seções (Antecedentes, Metodologia/Principais Descobertas e Conclusões/Significado), não aplique esses títulos distintos ao Resumo dentro do arquivo do artigo.

Não inclua nenhuma citação. Evite abreviaturas especializadas.

Palavras-chave ou termos de indexação (até seis) devem ser incluídos. Cada palavra-chave usa o primeiro

letra maiúscula e separados por ponto e vírgula.

TEXTO

Formatar

Os títulos devem ser em negrito e as primeiras letras maiúsculas e alinhadas à esquerda. Todo o texto deve ser configurado em fonte Times New Roman, 12 pontos, alinhamento à esquerda, espaçamento simples. Não justifique a margem direita. Deixe apenas um (1) espaço após os

pontos. Os parágrafos não devem ser recuados; não deve haver nenhuma linha em branco entre eles. Use retornos de linha apenas no final dos parágrafos. Não use tabulações ou espaços para criar recuos. Use a fonte Symbol para símbolos e caracteres especiais. As equações devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos entre parênteses no lado direito da página.

INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO E AGRADECIMENTOS são considerados como Título 1 (todas as letras são maiúsculas).

O Título 2, que é um subtítulo do Título 1, usa apenas a primeira letra maiúscula. O Título 3, que é um subtítulo do Título 2, está no mesmo formato, mas em itálico. Tudo em uma linha separada.

Tente usar abreviações no texto com moderação. Escreva as abreviações por extenso antes da primeira vez em que forem usadas no texto. Use o sistema métrico para todas as medições sem períodos (cm, mL, s). Defina todos os símbolos usados em equações e fórmulas. Não abrevie a palavra "Figura" ou "Tabela" em títulos ou texto.

Introdução

A Introdução deve colocar o foco do manuscrito em um contexto mais amplo. Ao redigir a Introdução, pense nos leitores que não são especialistas nesse campo. Inclua uma breve revisão da literatura chave. Se houver controvérsias ou discordâncias relevantes na área, elas devem ser mencionadas para que um leitor não especialista possa se aprofundar nessas questões. A Introdução deve concluir com uma breve declaração do objetivo geral dos experimentos e um comentário sobre se esse objetivo foi alcançado.

Material e métodos

Esta seção deve fornecer detalhes suficientes para a reprodução dos resultados. Protocolos para novos métodos devem ser incluídos, mas protocolos bem estabelecidos podem ser simplesmente referenciados.

Resultados

A seção Resultados deve fornecer detalhes de todos os experimentos necessários para apoiar as conclusões do artigo. Não há limite de palavras específico para esta seção, mas detalhes de experimentos que são periféricos ao objetivo principal do artigo e que desviam do foco do artigo não devem ser incluídos. A seção pode ser dividida em subseções, cada uma com um subtítulo conciso. A seção deve ser escrita no passado.

Discussão

A Discussão deve expor as principais conclusões do trabalho junto com algumas

explicação ou especulação sobre o significado dessas conclusões. Como as conclusões afetam as suposições e modelos existentes no campo? Como pesquisas futuras podem se basear nessas observações? Quais são os principais experimentos que devem ser feitos?

A Discussão deve ser concisa e bem argumentada.

Os Resultados e a Discussão podem ser combinados em uma seção, se desejado.

Agradecimentos

Todos os agradecimentos (incluindo os de concessão e apoio financeiro) devem ser digitados em um parágrafo imediatamente anterior à seção de referência. Solicita-se aos autores de manuscritos submetidos ao GMR que declarem a fonte de todo o financiamento que permitiu a realização da pesquisa descrita.

Aqueles que contribuíram para o estudo, mas não atendem aos nossos critérios de autoria, devem ser listados nos Agradecimentos com uma descrição da contribuição.

Os autores são responsáveis por garantir que qualquer pessoa nomeada nos Agradecimentos concorde em ser nomeada.

Não inclua fontes de financiamento nos Agradecimentos ou em qualquer outro lugar no arquivo do manuscrito. As informações de financiamento devem ser inseridas apenas na seção de divulgação financeira do sistema de envio on-line.

Referências

As referências devem consistir principalmente de artigos de periódicos indexados. Referências para técnicas que são essenciais para a compreensão ou repetição dos métodos devem estar sempre em periódicos de fácil acesso (indexados).

As referências são listadas no final do manuscrito e listadas em ordem alfabética.

Não inclua citações nos resumos.

As referências no texto devem incluir o nome do autor e o ano entre parênteses, por exemplo, (Searle, 1961) ou (King e Wilson, 1975). Quando uma referência com mais de dois autores é citada, apenas o primeiro autor é citado, por exemplo (Comstock et al., 1958). As referências devem ser citadas no texto em ordem cronológica, por exemplo (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). Referências a "resultados não publicados" e "artigos submetidos" devem aparecer no texto entre parênteses após o(s) nome(s) do(s) indivíduo(s). Exemplo: (Pereira KS, Martins PK e Silva TM, resultados não publicados). **Não mais do que 40 referências devem ser citadas em um artigo completo, 20 referências em uma comunicação curta e 60 referências em um artigo de revisão .**

As referências, sob o título "Referências", devem incluir apenas os trabalhos referidos em; o texto. As referências devem ser citadas da seguinte forma: artigos de periódicos - nomes e iniciais dos quatro primeiros autores (depois disso usando et al.), ano, título do periódico abreviado de acordo com PubMed ou Web of Science, número do volume, números da primeira e última página; livros - nomes dos autores, ano, título completo, edição, editoras, endereço (cidade); artigos publicados em simpósios - nomes dos autores, ano, título completo do livro, nome(s) do(s) editor(es) entre parênteses, editora, endereço (cidade), página inicial e final.

Referências de formatação

Como todas as referências serão vinculadas eletronicamente tanto quanto possível aos artigos que citam, a formatação adequada das referências é crucial.

As abreviações dos nomes dos periódicos devem ser aquelas encontradas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

FONTE	FORMATAR
artigos publicados	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y e outros. (2011). cDNA, clonagem de sequência genômica e superexpressão do gene da proteína ribossômica L9 (rpL9) do panda gigante (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet. Mol. Res.</i> 10: 1576-1588.</p> <p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, et al. (2014). A suscetibilidade ao LES em têmeis do sul da Índia pode ser influenciada pela pressão de seleção genética nos genes TLR2 e TLR9. <i>Mol. imunol.</i> S0161- 5890(14)00313-7.</p>
Artigos aceitos e não publicados	Igual aos artigos publicados, mas substitua "In press" por números de página ou DOI.
Sites ou artigos online	<p>Huynen MMTE, Martens P e Hilderink HBM (2005). Os impactos da globalização na saúde: uma estrutura conceitual. <i>Saúde global.</i> 1: 14. Disponível em [http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14].</p>
livros	Bates B (1992). <i>Negociando pela vida: uma história social da tuberculose</i> . 1ª ed. University of Pennsylvania Press, Filadélfia.
capítulos de livro	Hansen B (1991). Epidemias e história da cidade de Nova York para o público. In: <i>AIDS e o historiador</i> (Harden VA, Risse GB, eds.). Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda.
Artigos depositados (preprints, e-prints ou arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreira DU, et al. (1991). O metabolismo de aminoácidos entra em conflito com a diversidade de proteínas. Pré-impressão. Disponível: arXiv:1403.3301v1. Acessado em 17 de março de 2014.
Mídia publicada (jornais impressos ou online e artigos de revistas)	<p>Fonte H (2014). Para pinguins já vulneráveis, estudo descobre que a mudança climática é outro perigo O jornal New York Times. 29 de janeiro de 2014. Disponível em [http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-fins.html]. Acessado em 17 de março de 2014.</p>
Novas mídias (blogs, sites ou outros trabalhos escritos)	<p>Allen L (2006). Anunciando os blogs PLOS. 1 de setembro de 2010 [citado em 17 de março de 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. São Francisco: PLOS 2006 - . [cerca de 2 telas]. Disponível em [http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/].</p>
Teses de mestrado ou dissertações de doutorado	<p>Wells A (1999). Explorando o desenvolvimento do periódico acadêmico independente e eletrônico. Tese de mestrado. Universidade de Sheffield, Sheffield. Disponível em [http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09].</p>
Bancos de dados e repositórios (Figshare, arXiv)	<p>Roberts SB (2013). Faixas de recursos do navegador de genoma QPX. Banco de dados: figshare [Internet]. Acessado em [http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214].</p>

O link abaixo pode ser acessado para ver como outras referências devem aparecer.

Exemplos de estilo de referência

Material suplementar

Os autores podem usar quase qualquer descrição como o nome do item para um arquivo de material suplementar, desde que contenha um "S" e um número. Por exemplo, "Figura S1" e "Figura S2", "Tabela S1" e "Tabela S2" e assim por diante.

Os arquivos de material suplementar são publicados exatamente como fornecidos e não são copiados.

Legendas de material suplementar

Liste as legendas do material suplementar no final do arquivo do manuscrito. Não envie legendas em um arquivo separado.

O número e o nome do arquivo são obrigatórios em uma legenda, e é altamente recomendável incluir também um título de uma linha ou uma legenda (para figuras).

Exemplo de legenda

Texto S1. Título/Legenda é fortemente recomendado.

Citações no texto

Exigimos que você cite material suplementar no texto do manuscrito. Se você citar informações de apoio no texto, as citações precisam estar em ordem numérica.

Figuras e tabelas

Tabelas e Figuras são citadas em letras maiúsculas, por extenso, não abreviadas e seguindo a ordem de citação no texto (Ex.: Figura 1, Figura 2, Figura 3, e assim por diante).

Figuras

As ilustrações/figuras (fotografias, desenhos, diagramas e gráficos) devem estar cada uma em um único arquivo, numeradas em uma série consecutiva de algarismos arábicos na ordem em que são citadas no texto. As ilustrações devem ser enviadas como arquivos separados. Todas as ilustrações devem ser fornecidas em formato TIFF (.tiff) em cores ou preto e branco. As imagens devem ser salvas como arquivos independentes e separados. A resolução da imagem deve ser de 300 a 600 dpi. Não incorpore imagens dentro do arquivo de texto. Indique a localização de cada figura no texto. Não esqueça de enviar a legenda em página separada.

Cite as figuras em ordem numérica crescente na primeira aparição no arquivo do manuscrito. Se alguma de suas figuras estiver sob direitos autorais, notifique o escritório da revista.

Legendas das figuras

As legendas das figuras devem ser inseridas no texto do manuscrito, imediatamente após o parágrafo em que a figura é citada pela primeira vez (ordem de leitura). Não inclua legendas como parte dos próprios arquivos de figuras ou envie-os em um documento separado.

No mínimo, inclua o seguinte nas legendas de suas figuras:

- Um rótulo de figura com algarismos arábicos. Combine o rótulo de sua figura com o nome do arquivo carregado no envio (por exemplo, uma citação de figura de "Figura 1" deve se referir a um arquivo de figura denominado "GMR número-f1.tif").
- Um título conciso e descritivo

A legenda também pode incluir uma legenda, conforme necessário.

Tabelas

Cuidados especiais devem ser tomados para garantir que todas as tabelas estejam formatadas corretamente.

Científico os símbolos usados devem estar em Symbol ou Times New Roman. As tabelas devem ser numeradas consecutivamente

(com algarismos arábicos) referidos por número no texto e desenhados para caber no tamanho da coluna ou página da revista. Use tabelas com células para separar colunas. Não use espaços, tabulações ou linhas verticais. Justifique à esquerda o título acima da tabela. Indique a localização de cada tabela no manuscrito.

Coloque cada tabela em seu arquivo de manuscrito diretamente após o parágrafo em que foi citada pela primeira vez (ordem de leitura). Não envie suas tabelas em arquivos separados.

As tabelas requerem um rótulo (por exemplo, "Tabela 1") e um breve título descritivo para ser colocado acima da tabela. Coloque legendas, notas de rodapé e outros textos abaixo da tabela.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS SOLICITADAS NA SUBMISSÃO

declaração de financiamento

Esta seção deve descrever as fontes de financiamento que apoiaram o estudo. Inclua os números de concessão relevantes e o URL do site de qualquer financiador.

Conflitos de interesse

O autor correspondente é solicitado a declarar, em nome de todos os autores, se há algum interesse financeiro, pessoal ou profissional que possa ser interpretado como tendo influenciado o estudo.

Quaisquer interesses conflitantes relevantes dos autores devem estar disponíveis para editores e revisores durante o processo de revisão e serão declarados nos artigos publicados.

Para informações mais detalhadas sobre o estilo GMR, clique [aqui](#)

