

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP / GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Aryane Campos Reis

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE DNA SATÉLITE E
COMPORTAMENTO MEIÓTICO NO COMPLEXO
POLIPLOIDE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.**

TESE

JUIZ DE FORA
2017

ARYANE CAMPOS REIS

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE DNA SATÉLITE E
COMPORTAMENTO MEIÓTICO NO COMPLEXO
POLIPLOIDE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora
2017

Aos meus pais,
pelo amor incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Chegou uma das partes mais difíceis da tese: “os Agradecimentos”. São tantas as recordações de momentos especiais que vivi durante o desenvolvimento deste estudo, que agora, chegando ao final e com os olhos marejados, só me resta agradecer!

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos, me dando força para perseverar e seguir em frente;

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFJF, CAPES, CNPq, FAPEMIG e a Universidade Federal de Juiz de Fora pelo financiamento do trabalho;

Ao amigo e orientador Lyderson, pela confiança e pelos ensinamentos durante todos estes anos de convivência, que certamente contribuíram para minha formação! Admiro sua dedicação ao trabalho e sua generosidade, que o fazem um exemplo de profissional e de pessoa a ser seguido!

Obrigada pela oportunidade de fazer parte do seu time!

Aos meus pais, Rita e Elton, à minha irmã Danielle, e a tia Maria, pelo exemplo de vida, compreensão e amor. Ao Anthony, por fazer meus dias mais felizes!

Ao Saulo, por partilhar seus sonhos comigo, por sempre me inspirar e por todos os momentos especiais que passamos juntos dentro e fora do laboratório!

Aos meus padrinhos Isaura e José Augusto por sempre fazer parte de minha vida, pelos inúmeros conselhos, dedicação e carinho;

Aos professores José Marcello S. Campos e Fátima Regina G. Salimena, que se tornaram verdadeiros amigos, obrigada pelos ensinamentos e disposição em ajudar;

Aos amigos do lab. de genética da UFJF Ana Luiza, Victória, Elyabe, Camila, Juliana, Sirlei, Laís, Thaís, Shaiany, Amanda, Matheus, Elisa, Dani, Rafaella, Geovana, Renan e Víctor pela parceria e risadas entre um experimento e outro, pela amizade e trocas de experiências;

Às secretárias da pós-graduação Graça e Fernanda, às meninas responsáveis pela limpeza dos laboratórios Natália e Mariana e ao Silvione, pela gentileza e simpatia em nos atender e ajudar.

Muito obrigada!

“Nenhuma atividade no bem é insignificante. As mais altas árvores são oriundas de minúsculas sementes.”

Chico Xavier.

*“Nothing in Biology Makes Sense
Except in the Light of Evolution.”*

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

Lippia alba (Verbenaceae), é uma espécie herbácea tropical com grande plasticidade fenotípica e genômica, amplamente utilizada na medicina popular. Recentemente, a espécie foi descrita como um novo complexo autopoliplóide contendo cinco números cromossômicos ($2x=30$, $2x=30+8$, $3x=45$, $4x=60$ e $6x=90$), e esforços têm sido feitos a fim de entender sua origem e evolução. No presente trabalho, foram descritos perfis cariotípicos mais detalhados da espécie, por meio de mapeamento cromossômico utilizando sondas espécie-específicas e análises do comportamento meiótico e de viabilidade polínica. A partir do sequenciamento genômico de baixa cobertura (Illumina MiSeq), foram desenvolvidos novos marcadores citogenéticos (denominados CL66 e CL98) os quais foram utilizados para o mapeamento cromossômico em acessos representando os cinco citótipos do complexo. Para a análise meiótica, seis estágios da divisão (metáfase I; anáfase I + telófase I; metáfase II; anáfase II + telófase II) foram quantificados, e aproximadamente, 100 células foram avaliadas para cada estágio. Os mesmos acessos foram avaliados quanto à viabilidade polínica (1.000 grãos de pólen foram quantificados para cada indivíduo). Os resultados da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) revelaram que ambas as repetições satélite estão localizadas na porção terminal dos cromossomos. Em geral, a repetição CL98 mostrou um padrão uniforme nos diferentes acessos. Foram observados dois, três, quatro e seis cromossomos marcados em diploides, triploides, tetraploides e hexaploide, respectivamente, revelando que o número de cromossomos marcados variou proporcionalmente, de acordo com o nível de ploidia do acesso. Por outro lado, a repetição CL66 apresentou-se polimórfica. Variações foram observadas entre os acessos, principalmente, entre os indivíduos diploides. Com relação às análises meióticas, alto percentual de irregularidade foi observado nos citótipos poliploides. Entretanto, alguns acessos $2x$ também mostraram consideráveis erros durante a microsporogênese. Entre as irregularidades encontradas, destacam-se: pareamento cromossômico anormal; segregação cromossômica desigual; cromossomos perdidos; tríades e políades. Os resultados da viabilidade polínica corroboraram os dados da meiose. A partir do conjunto de dados obtidos foi possível concluir que 1) a metodologia para o desenvolvimento de marcadores cromossômicos específicos para *L. alba* mostrou-se eficiente; 2) as repetições satélite exibiram diferentes comportamentos (estável e dinâmico) no genoma de *L. alba*; 3) a ocorrência de microsporogênese irregular em diploides, associada à viabilidade polínica, sugerem que os acessos $2x$ sejam elementos importantes na formação do complexo poliploide e 4) a ampla variação cariotípica observada na espécie pode ser consequência de múltiplos e independentes eventos de duplicação genômica, aliado a rearranjos cromossômicos. Possivelmente, *L. alba* encontra-se em processo de estabilização do seu cariótipo tornando a espécie, um importante modelo para estudos de poliploides naturais nos trópicos.

Palavras-chave: autopoliplóide; citótipo; hibridização fluorescente *in situ*; sequenciamento paralelo em massa; poliploidia.

ABSTRACT

Lippia alba (Verbenaceae) is a tropical aromatic shrub with extensive phenotypical and genomic plasticity widely used in traditional medicine. Recently, the species was described as a new natural autoploid complex with five distinct chromosome numbers ($2x=30$, $2x=30+8$, $3x=45$, $4x=60$ and $6x=90$). Strides have been done in order to understand the cytotypes origin and species evolution. In this study, a detailed karyotype of *L. alba* using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with species-specific probes was described. We also report the meiosis behavior and pollen viability in sixty accessions. Using massive parallel sequencing (Illumina MiSeq platform) new cytogenetic landmarks (CL66 and CL98) were chosen for probing all cytotypes described for the species. For meiotic analysis, the percentage of abnormalities was quantified, evaluating around 100 cells in six stages (metaphase I; anaphase I + telophase I; metaphase II; anaphase II + telophase II). Around 1,000 pollen per accession were used to estimate pollen viability. FISH results revealed that both satDNA arrays are located preferentially on terminal sites of the chromosomes. In general, the CL98 repeat showed a uniform pattern in different accessions. We observed 2, 3, 4, and 6 marked chromosomes respectively in diploid, triploid, tetraploid and hexaploid accessions revealing that the number of depicted chromosomes varied proportionally according to the ploidy level. On the other hand, the CL66 repeat was polymorphic. Great variations were observed among the accessions mainly within the diploids. In general, the meiotic analysis revealed higher index of abnormalities in polyploid cytotypes. However, some $2x$ accessions also showed considerable irregularities during the microsporogenesis. Desynapsis, unequal segregation, lost chromosomes, triads and polyads were the most common irregularities observed. Pollen viability analysis corroborated the meiosis data. It was possible to conclude that 1) the development of specific landmarks for *L. alba* was efficient; 2) the karyotypic profiles of both satDNA revealed different behavior; 3) microsporogenesis analysis and pollen viability of $2x$ accessions suggest that diploids are the key point for the origin of the polyploid complex and 4) independent and multiples events of genome duplication associated to chromosome rearrangements may have generated great karyotypic variation in the species. *L. alba* karyotype is possibly under stabilization process making the species an important model to study natural polyploids in the tropics.

Keywords: autoploidy; cytotype; fluorescence *in situ* hybridization; massive parallel sequencing; polyploidy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Lippia alba</i> , ramo contendo folhas e flores e detalhe da inflorescência	68
Figura 2.	Figuras ilustrativas geradas a partir do software SeqGrapheR representando cinco famílias de repetições em <i>Lippia alba</i> identificadas após o sequenciamento genômico de baixa cobertura	75
Figura 3.	Metáfases representativas das hibridizações fluorescente <i>in situ</i> sequenciais com as sondas de DNA satélite CL66 e CL98 no acesso diploide de <i>Lippia alba</i>	78
Figura 4.	Metáfase e cariograma representando os cromossomos marcados com as sondas CL66 e DNAr 18S do acesso diploide BGEN-29.	78
Figura 5.	Metáfases representativas da hibridização fluorescente <i>in situ</i> com a sonda CL66 em <i>Lippia alba</i>	79
Figura 6.	Metáfases representativas da hibridização fluorescente <i>in situ</i> com a sonda CL98 em <i>Lippia alba</i> .	80
Figura 7.	Cariogramas representando as repetições CL66 e CL98 em acessos de <i>Lippia alba</i>	80
Figura 8.	Número de cromossomos com sítios de repetição CL66 em 47 acessos de <i>Lippia alba</i> .	89
Figura 9.	Número de cromossomos com sítios de repetição CL98 em 33 acessos de <i>Lippia alba</i> .	90
Figura 10.	Oito perfis cariotípicos de diploides de <i>Lippia alba</i> ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66.	91
Figura 11.	Dois perfis cariotípicos de aneuploides de <i>Lippia alba</i> ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66.	91
Figura 12.	Quatro perfis cariotípicos de triploides de <i>Lippia alba</i> ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66.	92

Figura 13.	Quatro perfis cariotípicos de tetraploides de <i>Lippia alba</i> ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66.	93
Figura 14.	Perfil cariotípico do hexaploide de <i>Lippia alba</i> ilustrando os 20 cromossomos CL66 ⁺	94
Figura 15.	Metáfases e kariogramas representando dez cromossomos marcados com a sonda CL66 em três acessos diploides de <i>Lippia alba</i> .	95
Figura 16.	Metáfases e kariogramas representando 11 cromossomos marcados com a sonda CL66 em dois acessos diploides de <i>Lippia alba</i> .	95
Figura 17.	Metáfases e kariogramas representando 12, 12 e 13 cromossomos marcados, com a sonda CL66 em três acessos diploides de <i>Lippia alba</i> .	96
Figura 18.	Metáfases e kariogramas representando 14 e 18 cromossomos marcados com a sonda CL66 em dois acessos diploides de <i>Lippia alba</i> .	96
Figura 19.	Metáfases e kariogramas representando 16 cromossomos marcados com a sonda CL66 em três acessos diploides de <i>Lippia alba</i> .	97
Figura 20.	Metáfases e kariogramas representando 13 e 18 cromossomos marcados com a sonda CL66 em dois acessos aneuploides de <i>Lippia alba</i> .	97
Figura 21.	Metáfases e kariogramas representando 16, 16 e 18 cromossomos marcados com a sonda CL66 em três acessos triploides de <i>Lippia alba</i>	98
Figura 22.	Metáfases e kariogramas representando dez e 18 cromossomos marcados com a sonda CL66 em dois acessos tetraploides de <i>Lippia alba</i>	99
Figura 23.	Diferentes perfis do cromossomo portador do sítio intersticial CL66 em acessos do complexo <i>Lippia alba</i> .	100
Figura 24.	Esquema representativo de possíveis deleções propostas para explicar os diferentes perfis encontrados para o cromossomo portador do sítio intersticial CL66 em <i>Lippia alba</i>	100

Figura 25.	Perfis cariotípicos em diploides de <i>Lippia alba</i> ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL98.	101
Figura 26.	Perfis cariotípicos de triploides de <i>Lippia alba</i> ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL98.	101
Figura 27.	Perfis cariotípicos de tetraploides de <i>Lippia alba</i> ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL98.	102
Figura 28.	Perfis cariotípicos de aneuploides e hexaploide de <i>Lippia alba</i> ilustrando o número de cromossomos marcados com a sonda CL98.	102
Figura 29.	Meiócitos representando algumas irregularidades observadas durante a microsporogênese de <i>Lippia alba</i> .	110
Figura 30.	Figuras representativas de meiócitos em diferentes estágios da microsporogênese em <i>Lippia alba</i> . Coloração com DAPI e cromossomos submetidos à hibridização com a sequência CL66	114
Figura 31.	Variação do percentual de irregularidade meiótica e percentual de inviabilidade polínica em acessos diploides, triploides e tetraploides de <i>Lippia alba</i>	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Solução para reação de nick-translation	70
Tabela 2.	Solução de hibridização	72
Tabela 3.	Sequências satélite específicas de <i>Lippia alba</i> obtidas por meio do sequenciamento genômico de baixa cobertura..	74
Tabela 4.	Número de acessos de <i>Lippia alba</i> mapeados com a repetição satélite CL66 em cinco níveis de ploidia e medidas morfométricas do cromossomo portador do sítio CL66 intersticial	88
Tabela 5.	Número de acessos de <i>Lippia alba</i> mapeados com repetição satélite CL98 em cinco níveis de ploidia	89
Tabela 6.	Comportamento meiótico em 36 acessos diploides de <i>Lippia alba</i>	111
Tabela 7.	Comportamento meiótico em 24 acessos poliploides de <i>Lippia alba</i> .	113
Tabela 8	Parâmetros de viabilidade polínica em acessos diploides de <i>Lippia alba</i> pelo teste de Diacetato de Fluoresceína (FDA).	116
Tabela 9.	Parâmetro de viabilidade polínica em acessos triploides e tetraploides de <i>Lippia alba</i> pelo teste de Diacetato de Fluoresceína (FDA)	117

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>Ai</i>	Índice de heterogeneidade cromossômica
A	Adenina
BC	Braço Curto
BL	Braço Longo
C	Citosina
CMA ₃	Cromomicina A ₃
CR	<i>Centromere retrotransposons</i>
ddH ₂ O	Água Destilada e Deionizada
DAPI	4`6-diamino-2-phenylindole
DNA	“Deoxyribonucleic acid” - Ácido Desoxirribonucléico
DNA _r	DNA ribossomal
Dntp	Desoxirribonucleítideo fosfatado
FDA	Fluorecein diacetate – Diacetato de Fluoreceína
FISH	“Fluorescence <i>in Situ</i> Hybridization”- Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
G	Guanina
GISH	“ <i>Genomic in Situ</i> Hybridization”- Hibridização Genômica <i>in Situ</i>
m	Metacêntrico
HC	Heterocromatina constitutiva
HF	Heterocromatina facultativa
n	Número Haploide de Cromossomas
pg.	Picogramas
r	Razão entre os braços
RNA	“Ribonucleic acid”- Ácido Ribonucléico
RNA _{se}	Ribonuclease
RON	Região Organizadora de nucléolo
SSC	(NaCl 3M/Citrato Trissódico.2H ₂ O 0,3M)
sm	Submetacêntrico
T	Timina
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
x	Número cromossômico do complemento monoploide
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
8-HQ	8-Hidroxiquinoleína
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1 DIVERSIDADE GENÔMICA EM PLANTAS	20
1.1.1 VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE DNA	20
1.1.2 VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE BASES DO GENOMA	24
1.1.3 VARIAÇÃO CARIOTÍPICA.....	26
1.1.4 ORIGEM DE DIVERSIDADE GENÔMICA EM PLANTAS.....	31
1.2 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE VEGETAL UTILIZANDO SEQUÊNCIAS GENÔMICAS REPETITIVAS	34
1.2.1 HETEROCROMATINA E SEQUÊNCIAS REPETITIVAS UNIVERSAIS.....	34
1.2.2 SEQUÊNCIAS REPETITIVAS ESPÉCIE-ESPECÍFICAS.....	38
1.2.3 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA HETEROCROMATINA – UM HISTÓRICO NA CITOGENÉTICA VEGETAL.....	41
1.2.4 CARACTERIZAÇÃO DE REGIÕES CROMOSSÔMICAS NA ERA PÓS GENÔMICA.....	44
1.2.5 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E ESTUDOS DE DIVERSIDADE VEGETAL .	46
1.3. POLIPLOIDIA E DIVERSIDADE GENÔMICA EM PLANTAS	47
1.3.1 REPRODUÇÃO E ESTABELECIMENTO DE POLIPLOIDES	50
1.3.2 ECOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE POLIPLOIDES	54
1.3.3 CONSEQUÊNCIAS MOLECULARES DA POLIPLOIDIA	57
1.4 <i>Lippia alba</i> - UM MODELO PARA ESTUDOS DE POLIPLOIDES TROPICAIS	60
1.4.1 PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM <i>Lippia alba</i>	60
1.4.2. O COMPLEXO POLIPLOIDE <i>Lippia alba</i>	61
1.5 JUSTIFICATIVA	64
2 SEQUENCIAMENTO PARALELO EM MASSA E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS ESPÉCIE-ESPECÍFICOS PARA <i>L. alba</i>	65
2.1 INTRODUÇÃO	65
2.2 OBJETIVOS	67
2.2.1 OBJETIVO GERAL	67
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	68
2.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	69
2.3.3 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE <i>L. alba</i>	69

2.3.4 CONSTRUÇÃO DAS SONDAS PARA FISH.....	70
2.3.5 CONFECÇÃO DE LÂMINAS PARA A HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i>	71
2.3.6 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA	71
2.3.7 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i> (FISH)	72
2.4 RESULTADOS	73
2.4.1 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE <i>L. alba</i>	73
2.4.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i> (FISH)	76
3. IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE SEQUÊNCIAS SATÉLITE NO COMPLEXO POLIPLOIDE <i>L. alba</i>	81
3.1 INTRODUÇÃO	81
3.2. OBJETIVOS	83
3.2.1. OBJETIVO GERAL	83
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	83
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	84
3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	84
3.3.2 MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO E HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i>	84
3.4 RESULTADOS	85
4 INSTABILIDADE MEIÓTICA EM CITÓTIPOS DE <i>L. alba</i>	103
4.1 INTRODUÇÃO	103
4.2 OBJETIVOS	105
4.2.1 OBJETIVO GERAL	105
4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	105
4.3. MATERIAL E MÉTODOS	106
4.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	106
4.3.2 CONFECÇÃO DE LÂMINAS PARA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO.....	106
4.3.3 TESTE DE VIABILIDADE POLÍNICA	107
4.4. RESULTADOS	108
4.4.1 COMPORTAMENTO MEIÓTICO.....	108
4.4.2 VIABILIDADE POLÍNICA	115
5 DISCUSSÃO.....	119
5.1 SEQUÊNCIAS REPETITIVAS NO GENOMA DE <i>L. alba</i>	119
5.2 MAPEAMENTO DA REPETIÇÃO CL98 REFORÇA A HIPÓTESE INICIAL DE AUTOPOLIPLOIDIA EM <i>L. alba</i>	120
5.3 PLASTICIDADE GENÔMICA EM <i>L. alba</i> EVIDENCIADA PELA REPETIÇÃO SATÉLITE CL66.....	123
5.4 O SÍTIO INTERSTICIAL CL66: UM MARCADOR CROMOSSÔMICO PARA <i>L. alba</i>	126

5.5 VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM DIPLOIDES DE <i>L. alba</i>	128
5.6 DISTRIBUIÇÃO DE DNA SATÉLITE NO COMPLEXO POLIPLOIDE <i>L. alba</i>	131
5.7 GAMETAS DESBALANCEADOS E NÃO REDUZIDOS: FONTE DE VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA NO COMPLEXO <i>L. alba</i>	134
5.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	140
6 CONCLUSÃO	142
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
APÊNDICE A	183
APÊNDICE B	184

1 INTRODUÇÃO GERAL

A poliploidia ou duplicação genômica corresponde a um dos processos evolutivos mais frequentes em plantas (OTTO e WHITTON, 2000; SOLTIS et al., 2005; DE BODT et al., 2008; JIAO et al., 2011; SOLTIS e SOLTIS, 2013). Considerada o principal fator envolvido na especiação da flora, a poliploidia ocorre em diferentes linhagens, sendo um processo ubíquo e determinante no incremento da biodiversidade global (FINIGAN, TANURDZIC e MARTIENSSEN 2012; SOLTIS e SOLTIS, 2013). Estudos recentes relatam que todas as angiospermas já passaram, por no mínimo, uma multiplicação genômica durante a sua história evolutiva, e inúmeros paleopoliploides estão distribuídos em todo o globo terrestre (BOWERS et al., 2003; FAWCETT et al., 2009; JIAO et al., 2011).

Dentre as maneiras de se estudar a duplicação genômica, a comparação entre os genomas parentais e poliploides, por meio de análises citogenéticas, consiste em uma das abordagens mais eficaz. Inúmeros trabalhos relatam a detecção de poliploides através de estudos cromossômicos, os quais datam desde o início do século passado (GOODSPEED e CLAUSEN, 1928; STEBINS, 1938; CHESTER et al., 2010; 2011; RENNY-BYFIEL et al., 2011; BUGGS et al., 2012; EMADZADE et al., 2014). Dentre as informações obtidas por meio das análises citogenéticas, os dados sobre o número e a morfometria cromossômica, comportamento meiótico e os mapas citogenéticos, consistem em abordagens amplamente utilizadas para a descrição cariotípica. Assim, aliada a outras técnicas, a citogenética proporciona valiosas informações que respaldam inferências sobre evolução cromossômica em diferentes taxa (CHESTER et al., 2010; 2011; RENNY-BYFIEL et al., 2011; BUGGS et al., 2012; SOLTIS e SOLTIS, 2013).

Neste contexto, *Lippia alba* (Verbenaceae) é uma importante espécie medicinal amplamente empregada na medicina popular e que constitui um excelente modelo para estudos de poliploidia em plantas tropicais. Formado por cinco diferentes citótipos, com indivíduos diploides ($2x=30$), aneuploide ($2n=30+8$), triploides ($3x=45$), tetraploides ($4x=60$) e hexaploide ($6x=90$), o complexo poliploide *L. alba* apresenta grande variação genômica e cariotípica (REIS et al., 2014). Análises da microsporogênese realizadas em diferentes acessos sugerem a

formação do complexo por meio de cruzamentos entre os citótipos envolvendo gametas não reduzidos e desbalanceados (REIS et al., 2014; REIS, SOUSA e VICCINI, 2016). Entretanto, os dados obtidos até o momento sugerem a necessidade de estudos adicionais empregando metodologias mais direcionadas à espécie e envolvendo um número superior de acessos para um melhor entendimento sobre a extensão da variação intraespecífica e evolução cariotípica de *L. alba*.

Assim, no presente trabalho foram desenvolvidos marcadores cromossômicos específicos para *L. alba* (obtidos a partir do sequenciamento paralelo em massa), bem como seu respectivo mapeamento cromossômico em acessos abrangendo o cinco níveis de ploidia encontrados na espécie. Além disso, foram realizadas análises do comportamento meiótico e da viabilidade polínica em acessos representando os níveis de ploidia mais frequentes em *L. alba* (2x, 3x e 4x).

1.1 DIVERSIDADE GENÔMICA EM PLANTAS

1.1.1 VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE DNA

As espécies divergem amplamente quanto a constituição genômica e cariotípica, aspectos determinantes para a identificação de taxa e caracterização da flora (STEBBINS, 1950). A ampla heterogeneidade de habitats, com variações ecológicas e climáticas, impostas aos indivíduos exigem adaptações dos seres aos ambientes, e para isso, modificações nos respectivos genomas são necessárias (BAWA, 1992). Tais alterações genômicas são essenciais para a manutenção das espécies e incremento da biodiversidade (BAWA, 1992; PELLICER et al., 2010).

Dentre os aspectos genômicos mais divergentes em plantas, podemos citar o tamanho do genoma nuclear, designado 1C (PELLICER et al., 2010). A plasticidade e a diversidade de genomas podem ser constatadas quando verificamos as estimativas de conteúdo de DNA de todos os organismos eucariotos que já tiveram o tamanho do genoma mensurado. Se considerarmos o menor valor 1C já descrito, encontrado no microsporídio parasito *Encephalitozoon intestinalis* (0,0023 pg) e o maior valor, que pertence a uma espécie poliploide de angiosperma (*Paris japonica* com 152,23 pg de DNA) a variação de quantidade de DNA dentre todos os eucariotos chega a 57 mil vezes (PELLICER et al., 2010).

Com relação à diversidade de conteúdo de DNA nos diferentes grupos vegetais, o clado das briófitas possui estimativas para 236 espécies (Plant DNA C-values database: banco de dados. Disponível em: <http://data.kew.org/cvalues/>), sendo *Notothylas orbicularis* e o musgo *Holomitrium arboretum* os representantes com menor valor 1C descrito (0,17 pg). Por outro lado, o maior genoma de briófitas pode ser encontrado na hepática *Mylia taylorii* (Myliaceae), que possui 1C=7,96 pg de DNA (LEITCH e LEITCH, 2013). Segundo Kuta e Przywara (2000) os genomas relativamente pequenos, encontrados neste grupo, podem ser justificados pelos cromossomos de tamanhos reduzidos e pelos raros eventos de poliploidia ocorridos durante a evolução das briófitas.

Com relação ao conteúdo de DNA encontrados nas Pteridófitas, poucas estimativas foram realizadas até o momento. Neste clado apenas 128 espécies tiveram o genoma mensurado, destas, o gênero *Selaginella* apresenta os menores valores 1C (0,086 - 0,24 pg) (Plant DNA C-values database: banco de dados. Disponível em <http://data.kew.org/cvalues/>). As espécies deste gênero são diploides e possuem cromossomos de tamanho reduzido, o que justifica o pouco conteúdo de DNA nuclear encontrado neste clado. Em contrapartida, as espécies de *Psilotum* e *Tmesipteris* são caracterizadas por possuírem cromossomos grandes (4,5-18 μ m) e vários níveis de ploidia (BROWNSEY e LOVIS, 1987; GREILHUBER e LEITCH, 2013). Nestes gêneros os genomas possuem cerca de 70 pg de DNA (BROWNSEY e LOVIS 1987; GREILHUBER e LEITCH, 2013).

As gimnospermas, embora seja um grupo que apresente poucas estimativas de quantidade de DNA descritas (se comparado às angiospermas), é o clado mais bem representado, com aproximadamente 24% das espécies amostradas, o que corresponde a 355 taxa (LEITCH e LEITCH 2013; Plant DNA C-values database: banco de dados. Disponível em <http://data.kew.org/cvalues/>). O menor genoma documentado para as gimnospermas apresenta 2,25 pg de DNA e pertence à espécie *Gnetum ula* (Gnetaceae) e o maior genoma estimado (36 pg) pode ser encontrado em *Pinus ayacahuite* (Pinaceae). A variação de 1C neste clado é de apenas 16 vezes, revelando a uniformidade da quantidade de DNA nas diferentes espécies de gimnospermas (LEITCH e LEITCH, 2013).

No grupo das angiospermas, está contido o maior genoma de todos os eucariotos e o menor genoma de todos os vegetais, o que culmina com uma ampla variação de conteúdo de DNA (cerca de 2.400 vezes). Neste clado, 7.542 espécies foram avaliadas quanto ao tamanho do genoma (Plant DNA C-values database: banco de dados. Disponível em <http://data.kew.org/cvalues/>). No entanto, apesar de ser o grupo que contém a maior quantidade de indivíduos analisados, devido a grande diversidade de espécies, a amostragem torna-se pequena. Apenas 2,14% das angiospermas foram investigadas quanto ao valor 1C até o momento. As menores quantidades de DNA registradas pertencem às espécies carnívoras do gênero *Genlisea* (Lentibulariaceae) (FLEISCHMANN et al., 2014). Os genomas de algumas espécies deste gênero são conhecidos como “ultrasmall genome”, sendo *G. tuberosa* a espécie que apresenta o menor valor de conteúdo de DNA já descrito (FLEISCHMANN et al., 2014). Nesta espécie, o valor 1C, equivale a 61 Mpb (0,062

pg de DNA), menor valor encontrado para todos os vegetais (FLEISCHMANN et al., 2014). Por outro lado, a maior quantidade de DNA descrita para um eucarioto pode ser observada em *Paris japonica* (Melanthiaceae), com $1C=152,23$ pg de DNA (PELLICER et al., 2010). Esta monocotiledônea trata-se de um octaploide com 40 cromossomos (PELLICER et al., 2010).

Provavelmente, a quantidade superior de DNA e a ampla variação de conteúdo $1C$ observada dentre as angiospermas devem-se aos eventos de poliploidia, os quais contribuíram significativamente para a diversificação dos grupos e da flora, em geral (JIAO et al., 2011). Adicionalmente, o aumento da quantidade de DNA neste grupo também pode ser justificado por processos de amplificação de sequências repetitivas, mais especificamente retrotransposons e sequências de DNA satélites (BENNETZEN et al., 2005; GROVER e WENDEL 2010; KEJNOVSKY et al., 2012). Tais mecanismos são capazes de aumentar o número de cópias de sequências específicas, incrementando o conteúdo genômico total, como pode ser observado em espécies do gênero *Fritillaria*, por exemplo, (AMBROZOVA et al., 2011).

A variação na quantidade de DNA não diverge apenas entre clados distantes, mas também pode ser observada entre gêneros próximos, espécies correlatas e até entre indivíduos de uma mesma espécie (SLOVAK et al., 2009; SMARDA et al., 2010). As primeiras estimativas de quantidade de DNA em plantas datam das décadas de 50 e 60 em que espécies filogeneticamente próximas foram avaliadas (OGUR et al., 1951; MARTIN e SHANKS 1966; ROTHFELS et al., 1966). A partir de então, tornou-se clara a grande diversidade no tamanho dos genomas (OGUR et al., 1951; MARTIN e SHANKS 1966; ROTHFELS et al., 1966). Na família Ranunculaceae, por exemplo, as estimativas de conteúdo de DNA variam cerca de 40 vezes para 22 gêneros analisados (ROTHFELS et al., 1966). Em *Lippia* (Verbenaceae), *L. corymbosa* apresenta o menor valor de conteúdo de DNA descrito até o momento ($1C = 0,825$ pg) enquanto *L. alba* possui o maior valor ($1C = 3,45$ pg) (CAMPOS et al., 2011; REIS et al., 2014). Neste grupo, os autores sugerem que o aumento da quantidade de DNA seja devido a eventos de poliploidia, principal mecanismo evolutivo no gênero (CAMPOS et al., 2011). Em populações de *Collinsia verna* (Scrophulariaceae), por exemplo, as estimativas do conteúdo de DNA variam de 7,35 pg à 28,56 pg de DNA, evidenciando a grande variação intraespecífica nesta espécie (GREENLEE et al., 1984). Com relação a indivíduos de uma mesma

população, consideráveis variações podem ser observadas em *Microseris douglasii*, com diferenças de até 20 vezes (PRICE et al., 1986) e espécimes de *Poa annua* (MOWFORTH e GRIME, 1989).

De maneira geral, embora haja grande variação no tamanho do genoma e inúmeros eventos de poliploidização ao longo da evolução, os dados de quantidade de DNA das plantas revelam que as espécies apresentam o conteúdo de DNA nuclear relativamente reduzido (PELLICER et al., 2010). Os maiores genomas são encontrados em algumas angiospermas com vários níveis de ploidia, e em raras espécies de Pteridófitas. Estudos sugerem que genomas pequenos teriam sido selecionados ao longo da evolução, uma vez que o tamanho do genoma influencia diretamente no fenótipo e adaptação do indivíduo (GREILHUBER e LEITCH, 2013). Considerando que a quantidade de material genético no núcleo está diretamente relacionada às dimensões celulares, genomas pequenos, conseqüentemente, resultariam em células menores. Estas, por sua vez, teriam rápidas divisões celulares com tempo curto de geração, agilizando o crescimento e o estabelecimento de plântulas (LEITCH et al., 2004; GREILHUBER e LEITCH 2013). Além disso, segundo Knight et al. (2005) existe uma correlação positiva entre tamanho do genoma e massa de sementes. As plantas que possuem genomas grandes produzem sementes grandes, o que implica em baixa habilidade de dispersão e colonização de novos habitats, ao passo que, indivíduos com genoma reduzido apresentam uma ampla variação nos tamanhos de sementes, consistindo em uma característica mais vantajosa (BEAULIEU et al., 2007; VESELY´ et al., 2012).

Adicionalmente, outro fator relevante que pode limitar o tamanho do genoma é a disponibilidade de elementos essenciais para a produção de ácidos nucléicos, como nitrogênio e fósforo (HANSON et al., 2001; LEITCH e LEITCH 2008). Assim, em ambientes em que os solos são pobres em nutrientes, existiria uma tendência em haver plantas com genomas reduzidos. De acordo com Leitch e Leitch (2013) a correlação entre tamanho de genoma e nutrientes pode explicar os grandes genomas observados nas gimnospermas. Geralmente, a maioria das espécies de gimnospermas é encontrada em regiões montanhosas, onde os solos são arenosos e ricos em nutrientes. Por outro lado, espécies de gimnospermas localizadas em regiões de solos carentes de nutrientes, como acontecem com as espécies do gênero *Gnetum*, apresentam tamanho genômico limitado (LEITCH e LEITCH, 2013).

Além das variações no conteúdo de DNA nuclear, a diversidade genômica também pode ser estimada por diferenças na composição de bases e pelos muitos perfis cariotípicos encontrado nas plantas, como será abordado em seguida.

1.1.2 VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE BASES DO GENOMA

Considerando que os genomas de todos os organismos são compostos pelas mesmas bases nitrogenadas, adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) (exceto alguns retrovírus que possuem uracila substituindo a base timina), o percentual de bases AT e GC e sua disposição nas diferentes espécies são responsáveis por influenciar nos processos regulatórios e funcionais nas células (SMARDA e BURES 2012). Além disso, as diferenças na composição genômica refletem a diversidade genética das diferentes espécies, consistindo em importantes parâmetros para estudos de taxonomia, sistemática e evolução (MEISTER e BAROW, 2007). Em plantas, embora existam inúmeras estimativas de quantidade de DNA total, os dados sobre conteúdo AT/GC ainda são escassos (MEISTER e BAROW 2007; SMARDA et al., 2008). O último levantamento realizado sobre a constituição de bases genômicas aponta que aproximadamente mil espécies vegetais de diferentes posições filogenéticas foram avaliadas (SMARDA e BURES, 2012). Os dados revelaram que a maior variação de conteúdo GC pode ser encontrada no grupo das algas verdes. Neste grupo, o gênero *Spirogyra*, por exemplo, apresenta 39% do genoma composto pelas bases guanina e citosina enquanto *Scenedesmus acuminatus* possui 63,8% de conteúdo GC (SERENKOV 1962). Além das algas verdes, diferenças significativas também podem ser encontradas em Pteridófitas. Neste clado uma variação de 38% pode ser observada nas famílias Davalliaceae e Polypodiaceae e 48% em Lygodiaceae (SMARDA e BURES, 2012). De maneira geral, dentre as espermatófitas, baixas quantidades de GC no genoma são encontradas nas famílias Cyperaceae, Juncaceae e Thurniaceae, com aproximadamente 33% de bases guanina e citosina (SMARDA e BURES, 2012). No clado das gimnospermas, destaca-se o *Ginkgo biloba*

(Ginkgoaceae) com menor percentual investigado (34% de GC) (BAROW e MEISTER, 2002).

Com relação às angiospermas, é possível observar uma tendência em maiores quantidades de bases guanina e citosina em monocotiledôneas. Em média, 45% do genoma dessas espécies é composto por guanina e citosina (LI e DU, 2014). Representantes das famílias Xyridaceae, Eriocaulaceae, e algumas espécies de Liliaceae, Dasypogonaceae e Araceae possuem os valores de GC próximos a 49% (SMARDA et al., 2010 B; SMARDA e BURES, 2012). Adicionalmente, variação na composição de bases também pode ser encontrada dentre as espécies de gramíneas (Poaceae), com uma amplitude média de 43% a 50% de conteúdo de GC (BAROW e MEISTER 2002; SMARDA e BURES, 2012). Com relação às dicotiledôneas, as variações entre os clados são menores, e em média, 34% do genoma é composto pelas bases guanina e citosina. Os representantes de Brassicaceae e Asteraceae possuem os maiores percentuais de GC, aproximadamente 39% em média (LI e DU, 2014).

Estudos demonstram que as variações de composição genômica são menores quando clados próximos são analisados. As comparações de percentual de GC entre gêneros e entre tribos evidenciam certa uniformidade nos genomas e possibilitam algumas inferências evolutivas. Em *Crepis* (Asteraceae), por exemplo, o conteúdo de GC em *C. dinarica*, *C. froelichiana*, *C. incarnata*, *C. praemorsa* variou de 59,2 a 60,8% demonstrando a homogeneidade de bases do gênero (MEISTER e BAROW, 2007). Porém, variações consideráveis entre espécies próximas também podem ocorrer. Tais diferenças na composição genômica de espécies correlatas contribuem com informações sobre a reorganização dos genomas ao longo da evolução, e auxiliam nas caracterizações de linhagens ancestrais. Smarda e colaboradores (2008), por exemplo, combinando dados de conteúdo GC e filogenia de espécies de *Festuca*, inferiram que a evolução e a diversificação do grupo foram baseadas em ampliações e perdas de sequências repetitivas. Mudanças no percentual de bases podem ser resultados de atividades de elementos transponíveis, os quais, além de alterar o tamanho do genoma também modificam a sua constituição (BENNETZEN et al., 2005; GROVER e WENDEL, 2010; KEJNOVSKY et al., 2012). Em *Oryza australienses*, o genoma teve um acréscimo considerável de bases guanina e citosina através da ação de retrotransposons ricos em GC, por exemplo (SMARDA e BURES, 2012).

Com relação às variações de composição genômica intraespecíficas, na maioria das vezes, as diferenças são restritas às espécies poliploides. Após a poliploidia, mecanismos de reestruturação genômica resultam em eliminação e amplificação de regiões não codificantes, como as sequências repetitivas (CHESTER et al., 2011; SMARDA e BURES, 2012; CHESTER et al., 2013; MAVRODIEV et al., 2015). Dentre as regiões cromossômicas ricas em GC que são eventualmente susceptíveis às modificações pós-duplicação podemos citar as sequências de DNA ribossomal (CHESTER et al., 2010). Em eucariotos, os *loci* dos genes ribossomais 5S e 28S são compostos por centenas e milhares de cópias ricas em citosinas e guaninas, e eventuais mudanças nestes *clusters* podem alterar a composição do genoma nuclear. Em espécies poliploides de Brassicaceae, por exemplo, em que grande parte do genoma é composto por genes ribossomais (1,17%) (INGLE et al., 1975), as eliminações de DNAr após eventos de duplicação genômica, resultou na diminuição do conteúdo de GC no genoma total (SMARDA e BURES 2012). Portanto, as alterações nestas sequências, muito comuns após poliploidia, podem modificar consideravelmente a composição dos genomas quanto ao percentual de bases.

Além das eliminações e ampliações de sequências (resultantes de eventos de poliploidia) pequenas variações intraespecíficas na composição dos genomas também ocorrem. Estas podem ser decorrentes da incorporação de genomas citoplasmáticos (plastídios e mitocôndrias) e da transferência horizontal de genomas parasitas. Adicionalmente, de acordo com Marie e Brown (1993) uma sutil diferença na constituição genômica também pode ser detectada entre indivíduos dioicos que apresentam cromossomos sexuais, uma vez que estes são ricos em repetições GC (KUBAT et al., 2008; KEJNOVSKY et al., 2009; JANOUSEK et al., 2012).

1.1.3 VARIAÇÃO CARIOTÍPICA

O cariótipo se refere ao conjunto cromossômico mitótico de uma espécie com suas respectivas características. Cada espécie possui seu cariótipo próprio, o qual é definido quanto ao número de cromossomos, tamanho e forma cromossômica,

simetria cariotípica e pela presença e localização de marcadores cromossômicos naturais (que incluem perfil de distribuição de heterocromatina, posição do centrômero e constrições secundárias) (SUMNER, 2003). A constância numérica e estrutural do complemento cromossômico ao longo das divisões celulares assegura a perpetuação dos caracteres citológicos para as gerações futuras, processo essencial para a conservação e manutenção das espécies. Na maioria dos casos, as grandes alterações cariotípicas são deletérias, porém, ocasionalmente, algumas delas podem proporcionar vantagens aos indivíduos, e serem transmitidas aos descendentes, resultando em diversidade genômica e especiação em longo prazo (SUMNER, 2003). Estudos demonstram que a ocorrência de alterações cromossômicas estruturais e numéricas resultou na origem de novas espécies e diversificação da flora (LEVIN et al., 2002; SOLTIS et al., 2008). Em *Nothoscordum*, por exemplo, diversas alterações estruturais combinadas a eventos de poliploidia resultaram na grande variação cariotípica observada no gênero (SOUZA et al., 2012). Em *Melampodium*, além de eventos de poliploidia, mecanismos de disploidias também contribuíram para a diversificação do grupo (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2009).

As comparações cariotípicas entre taxa podem respaldar hipóteses sobre os processos evolutivos e de diversificação de espécies (SUMNER, 2003; MAVRODIEV et al., 2015). Em geral, espécies próximas possuem cariótipos similares e as análises dos respectivos conjuntos cromossômicos fornecem valiosas informações, para estudos taxonômicos, sistemáticos e evolutivos. Dentre os parâmetros citogenéticos mais estudados, o número cromossômico somático constitui a informação mais investigada.

As descrições de número cromossômico podem indicar relações de parentesco e ancestralidade, além de auxiliar em estudos sobre poliploidia. Geralmente, as espécies que apresentam muitos cromossomos (poliploides) possuem uma origem mais recente, sendo consideradas derivadas, enquanto que o número reduzido de cromossomos em um táxon pode representar uma condição plesiomórfica. Em *Lippia*, eventos de poliploidia são sugeridos como um dos principais mecanismos envolvidos na diversificação no gênero. Estudos sugerem que o número básico para o gênero seja próximo de $x=7$ (SANDERS, 2001) e $x=5$ (CAMPOS et al., 2011). Assim, as espécies que possuem n superior a 10 cromossomos teriam surgido mais recentemente, por meio de duplicação genômica

aliada a eventos de displóidia e/ou aneuploidia. Em Bromeliaceae, um estudo recente sugere que o número básico da família seja $x=25$, embora estudos anteriores assumam que eventos de hibridação e duplicação cromossômica tenham ocorrido entre espécies com $x=8$ ou $x=9$ (NUNES e CLARINDO, 2014) o que torna a maioria das espécies de Bromeliaceae ($2n=50$) alohexaploides. Em alguns casos, a redução do número cromossômico pode ocasionar a diversificação de espécies. Em *Boronia* (Rutaceae), estudos sugerem que a evolução cromossômica do gênero ocorreu por meio de displóidias descendentes. Assim as espécies mais derivadas possuem o menor número cromossômico (SHAN, YAN e PLUMMER, 2003). Em espécies de *Brachyscome* (Asteraceae) estudos de filogenia a partir da sequência plastidial *matk* revelaram que as espécies se divergiram independentemente por aneuploidias descendentes com redução de $n=9$ para $n=8$, $n=7$, $n=5$, $n=4$ e $n=3$ em diferentes linhagens (WATANABE et al., 1999).

Nos vegetais, os menores números cromossômicos descritos podem ser encontrados nas espécies *Zingeria beibersteiniana* (Poaceae); *Colpodium versicolor* (Poaceae); *Haplopappus gracilis* (Asteraceae); *Brachyscome dichromosomatica* (Asteraceae); *Ornitogalum tenuifolium* (Hyacinthaceae) e *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae), as quais apresentam o cariótipo formado por apenas dois pares de cromossomos (VANZELA et al., 1996; CREMONINI, 2005). Em contrapartida, *Ophioglossum reticulatum*, uma pteridófito, possui cerca de 630 pares cromossômicos, o maior número já descrito para todos os eucariotos (KHANDELWAL, 1990).

Com relação às gimnospermas, poucas variações cariotípicas são observadas se comparado aos outros grupos. A variação no número cromossômico é de $2n=14$ a $2n=66$ cromossomos, em todo o clado (WEISS-SCHNEEWEISS e SCHNEEWEISS, 2013), com vários gêneros apresentando o mesmo número básico (CHUANG e HU, 1963). Em Cupressaceae, por exemplo, 26 gêneros dos 27 pertencentes à família apresentam $x=11$ cromossomos (AHUJA, 2005). Segundo Leitch e Leitch (2013), poucos indivíduos possuem elevados níveis de ploidia, o que pode ser explicado pelos esporádicos eventos de multiplicação genômica em gimnospermas (5% em todo o clado e apenas 1,5% dentre as coníferas) (KHOSHOO, 1959; AHUJA, 2005). Algumas coníferas poliploides podem ser encontradas nos gêneros *Fitzroya*, *Juniperus* e *Sequoia* (Cupressaceae) sendo três indivíduos tetraploides (*F. cupressoides*, *J. chinensis* e *J. squamata*) e um

hexaploide (*S. sempervirens*) (KHOSHOO, 1959; AHUJA, 2005; HUSBAND, et al., 2013).

A baixa incidência de poliploidia em gimnospermas, sobretudo nas espécies lenhosas, pode ser explicada pelo grande tamanho do lote haploide nestes indivíduos (HUSBAND et al., 2013). Nestas espécies, a multiplicação genômica provocaria aumento do volume celular e tal condição seria incompatível com a formação adequada das fibras do lenho, restringindo assim, o seu crescimento (MURRAY, 1998; OTTO e WHITTON, 2000; HUSBAND et al., 2013). De fato, poliploides sintéticos de *Pinus*, *Picea*, e *Larix* induzidos por meio de tratamentos com colchicina apresentaram retardo no crescimento e morte prematura, comprovando as possíveis restrições ocasionadas pelos elevados níveis de ploidia (AHUJA, 2005).

Com relação ao clado das angiospermas, as informações cariotípicas nos diferentes grupos taxonômicos são discrepantes. Alguns taxa de angiospermas possuem refinadas caracterizações cariotípicas, como ocorre nas espécies dos gêneros *Crepis*, *Melampodium*, *Hypochaeris* (Asteraceae) e *Nicotiana* (Solanaceae), (LIM et al., 2000; DIMITROVA e GREILHUBER 2001; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008; 2009), enquanto em outros grupos (como os gêneros de Lentibulariaceae), os dados citogenéticos são escassos (WEISS-SCHNEEWEISS e SCHNEEWEISS 2013).

As descrições de número cromossômico nas angiospermas revelam uma variação de aproximadamente 160 vezes, visto que o menor cariótipo possui $2n=4$ (observado em *Rhynchospora*, por exemplo) e o maior $2n=640$ cromossomos (encontrado em *Sedum suaveolens*, Crassulaceae) (GUERRA e LUCENO, 1996; BENNETT 1998; GUERRA, 2008; BAKER, 2013). Dentre as espécies de angiospermas mais estudadas do ponto de vista citogenético, destacam-se as monocotiledôneas de interesse econômico, como trigo, milho, cevada, arroz, cana-de-açúcar e sorgo (PATERSON et al., 2012). Aproximadamente 25% a 30% das espécies de monocotiledôneas possuem descrições do número cromossômico (BENNETT, 1998; GUERRA, 2008).

Em média, as angiospermas apresentam 16 cromossomos no lote haploide, com a maioria das espécies possuindo de sete a 20 cromossomos, valor bem inferior se comparado às pteridófitas, as quais possuem em média $n=57$ (BAKER, 2013). O elevado número cromossômico em pteridófitas pode ser devido aos mecanismos de fissão cromossômica ou a eventos de poliploidia, que constitui a

hipótese mais aceita (BAKER, 2013). Embora a poliploidia seja bastante comum entre as angiospermas, o genoma das pteridófitas são menos dinâmicos e com baixos índices de perdas de sequências/cromossomos quando comparado ao genoma das angiospermas, os quais possuem rápidas evoluções cariotípicas (BAKER, 2013). A baixa taxa de evolução em samambaias pode ser verificada na uniformidade cariotípica (numérica e estrutural) em diferentes gêneros de pteridófitas (WAGNER e WAGNER, 1980). Além disso, outro fator que confirma a baixa taxa de evolução genômica neste grupo (embora os estudos sejam apenas de caráter especulativo) é a reduzida atividade de elementos transponíveis, importante fator evolutivo que causa expansão e contração de genomas (LEITCH et al., 2005; BAKER, 2013). Em pteridófitas, tais elementos móveis são restritos e menos ativos, justificando as poucas mudanças cariotípicas no clado.

Contudo, a diversidade cariotípica das plantas não se restringe apenas ao número cromossômico, mas abrange também os tamanhos e as morfologias cromossômicas, parâmetros relevantes para as caracterizações cariotípicas. Os dados morfométricos possibilitam classificar individualmente cada cromossomo e detectar possíveis alterações estruturais. A morfometria cromossômica fornece informações sobre reestrutura genômica e diversidade cariotípica, permitindo inferências acerca de adaptação e evolução dos taxa. Em plantas, é observada uma grande variação do tamanho dos cromossomos nas diferentes espécies. Em *Lilium* (Liliaceae), por exemplo, alguns cromossomos possuem 20 μm de comprimento (PERUZZI et al., 2009) e em *Paris* (Melanthiaceae) o tamanho excede 30 μm (PELLICER et al., 2010), enquanto que em *Melampodium montanum* (Asteraceae) e *Bromelia karatas* (Bromeliaceae) os cromossomos possuem comprimento de apenas 0,6 a 1,2 μm (ÉDER-SILVA, FELIZ e BRUNO, 2007; WEISS-SCHNEEWEISS, STUESSY e VILLASENOR, 2009). Estudos indicam que a simetria cariotípica é mais uniforme dentre as angiospermas, sendo a maioria dos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (LEVITZKY, 1931; STEBBINS, 1971; WEISS-SCHNEEWEISS e WEISS-SCHNEEWEISS, 2013). Em média, os comprimentos de cromossomos individuais neste grupo variam de 0,6 μm a 14,6 μm (LEVIN e FUNDERBURG, 1979; WEISS-SCHNEEWEISS, 2013), sendo a maioria dos cariótipos compostos por cromossomos pequenos, com aproximadamente 1 a 3 μm de comprimento (STACE 2000). No entanto, consideráveis variações na simetria cromossômica também podem ser observadas entre gêneros de uma mesma família e até entre espécies

que compõem um mesmo gênero. Em *Crepis* (Asteraceae), por exemplo, além da variação numérica entre as espécies, diferenças no tamanho dos cromossomos e no grau de simetria cariotípica são encontradas (DIMITROVA e GREILHUBER, 2000; LEVIN, 2002). Outro gênero de Asteraceae que se destaca apresentando ampla variação no complemento cromossômico é *Brachyscome*. As espécies deste gênero possuem de 2 a 9 cromossomos por genoma e o tamanho do lote haploide varia de 25 μm a 82 μm , com o índice de assimetria cariotípica variando de 0,09 a 0,5 (LEVIN, 2002).

Em gimnospermas, embora seja o clado com menos variações numéricas, estudos indicam que estruturalmente os cariótipos possuem consideráveis diferenças. Análises de regiões genômicas com heterocromatina constitutiva e regiões ricas em AT e GC realizadas com fluorocromos base específicos revelaram padrões distintos de distribuição de heterocromatina entre as espécies (HIZUME et al., 1988; DAVIES et al., 1997; HIZUME, 1997; BOGUNIC et al., 2006; ISLAM-FARIDI et al., 2007). Do mesmo modo, a posição, o tamanho e o número de sítios dos genes ribossomais 28S e 5S apresentam ampla variação no grupo (MURRAY, 2013). Em *Podocarpus* (MURRAY et al., 2002), *Cycad* (KOKUBUGATA et al., 2000) e *Larix* (HIZUME et al., 1995) apenas um par de DNAr 28S é observado, enquanto que em *Pinus taeda* são observados 19 pares (ISLAM-FARIDI et al., 2007). Variações intraespecíficas também são encontradas em *Ceratozamia mexicana* e em *Pinus thunbergii* (HIZUME et al., 1998; 2002) revelando a grande diversidade estrutural nos genomas de gimnospermas. De maneira geral, o grupo é caracterizado por apresentar cromossomos grandes, em *Pinus*, por exemplo, 36 espécies possuem cromossomos que variam de 6,4–16,2 μm (HIZUME, 1988).

1.1.4 ORIGEM DE DIVERSIDADE GENÔMICA EM PLANTAS

As espermatófitas (plantas que produzem sementes) compreendem 96% de toda a diversidade de plantas vasculares do planeta. Dessas, uma pequena parte é representada pelas gimnospermas (850 espécies) e a grande maioria (com aproximadamente 352 mil espécies) pertence ao clado das angiospermas (PATON

et al., 2008). Esta grande diversidade da flora é consequência de diferenças genômicas encontradas nas variadas espécies e sua interação com o ambiente. Considerando que todos os organismos contêm o material genético que especifica moléculas efetoras (RNA e proteínas), capazes de determinar funções e formas (fenótipo), e que as células são quimicamente compostas pelas mesmas macromoléculas básicas (proteínas, DNA, RNA, lipídeos e açúcares), a organização estrutural do genoma é o fator determinante para a diversidade de fenótipos e, conseqüentemente, das espécies. Neste contexto, as eventuais mudanças ocorridas no material genético, denominadas mutações, são de grande relevância (LEVIN, 2002).

As mutações constituem fonte de variação genômica, sendo matéria prima importante na geração de diversidade e formação de novas espécies. No entanto, as mutações só têm significado evolutivo quando ocorrem em células germinativas e são transmitidas às gerações futuras (LEVIN, 2002). Dentre os tipos de mutações capazes de modificar as estruturas genômicas, as mutações pontuais como substituição, adição e deleção de bases constituem os tipos de alterações mais simples que podem ocorrer. Tais mutações podem ser geradas naturalmente, devido a erros ocasionados pela enzima DNA polimerase durante a replicação do DNA, ou induzidos por agentes químicos e físicos como radiações ionizantes ou mutágenos (CLANCY, 2008).

No entanto, a notável diversidade genômica está também associada às grandes modificações na estrutura e no tamanho dos genomas (LYSÁK e SCHUBERT, 2013). Neste contexto, os rearranjos cromossômicos como deleção, duplicação, translocação e inversão consistem em mecanismos importantes para a reorganização do material genético (SCHUBERT e LYSÁK, 2011). Estas mutações, quando não deletérias ou prejudiciais para o organismo, podem acarretar em diversidade genômica e fenotípica, contribuindo para a diversificação das espécies. Moscone et al. (2007) por exemplo, estudando espécies de *Cephalanthera* (Orchidaceae) observaram que as diferenças cariotípicas entre as espécies foram originadas por complexos rearranjos cromossômicos. Alterações cromossômicas em *Hypochaeris* (Asteraceae) também constitui a base da diversidade cariotípica do gênero e resulta na diferenciação de cariótipos de espécies da América do Sul e da Europa (RUAS et al., 2005).

As alterações cromossômicas estruturais além de reorganizar todo o material genético, também podem alterar o número cromossômico do indivíduo, ocasionando disploidias. Segundo Stebbins (1971) as disploidias constituem mudanças importantes no número haploide das espécies e contribuem, significativamente, para diversificação e especiação das angiospermas (GRANT, 1981; LEVIN, 2002; STEBBINS, 1971). As disploidias podem incrementar o número cromossômico após fissões cromossômicas (disploidias ascendentes), ou reduzir, através de disploidias descendentes, por meio de fusões (LYSÁK e SCHUBERT, 2013). Segundo Kenton et al. (1993) as quebras cromossômicas são frequentemente associadas aos cromossomos metacêntricos ricos em heterocromatina, enquanto as fusões tendem a ocorrer, preferencialmente, entre cromossomos pobres em heterocromatina. Alternativamente, a diminuição do número cromossômico também pode ser originada por translocações robertsonianas. Neste tipo de translocação, ocorre troca de material genético entre cromossomos acrocêntricos com posterior fusão dos centrômeros, resultando na formação de um longo cromossomo metacêntrico e um pequeno cromossomo, que geralmente é perdido. Dentre as espécies que sofreram translocação robertsoniana podemos citar *Vicia faba* (Fabaceae), *Pinus elliotii* e *P. sylvestris* (Pinaceae) (FUCHS et al., 1995). Nestas espécies, houve diminuição do número cromossômico ao longo da evolução cariotípica, e sequências teloméricas foram encontradas em porções cromossômicas intersticiais, comprovando a ocorrência de translocação robertsoniana (FUCHS et al., 1995).

Por outro lado, as disploidias ascendentes têm sido inferidas para *Allium* (Alliaceae), incrementando o número cromossômico no gênero de $x=7$ para $x=9$ cromossomos (LEVAN, 1932) e em *Cymbispata* (Commelinaceae) (LEVIN, 2002). Em *Hypochoeris radicata* (Asteraceae), após fissões cromossômicas, houve diversos rearranjos estruturais que culminaram com a transposição dos genes ribossomais 28S para outro cromossomo do lote haploide (HALL e PARKER, 1995). Todas estas variações genômicas, quando fixadas em populações distantes, podem resultar em isolamento reprodutivo e originar as chamadas “raças cromossômicas”, culminando posteriormente, com o processo de especiação (LEVIN, 2002). Em populações alopátricas de *Clarkia speciosa* (Onagraceae), por exemplo, rearranjos estruturais envolvendo nove cromossomos do lote haploide originaram um gradiente de diferentes raças cromossômicas, que diferem ao longo das regiões norte e sul da Califórnia (LEVIN, 2002).

Outro mecanismo bastante comum capaz de alterar o número de cromossomos individuais em plantas são as aneuploidias. Neste processo, há o ganho ou a perda de cromossomos individuais, por meio de falhas na segregação cromossômica durante as divisões celulares. Uma das consequências ocasionadas por aneuploidias é a alteração da dosagem gênica. Pelo fato de ser uma anomalia drástica que altera todo o balanço gênico, o acréscimo ou a perda de cromossomos, na maioria dos casos, causam desvantagens ou são letais, possuindo pouca relevância em processos de especiação (EHRENDORFER, 1964; 1980). No entanto, as aneuploidias são fixadas mais frequentemente em poliploides, e neste caso, também podem contribuir para o estabelecimento do indivíduo e sua diversificação (LEWIS et al., 1967; AINSWORTH et al., 1983; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2009).

Dentre os mecanismos em potencial para a origem de diversidade da flora, a poliploidia, seguramente, constitui o principal fator responsável pela formação de novas espécies (SOLTIS, SOLTIS e TATE, 2003; SOLTIS et al., 2007; 2008; SOLTIS e SOLTIS, 2009; JIAO et al., 2011; FAWCETT et al., 2013; MAVRODIEV et al., 2015). A poliploidia baseia-se na multiplicação de todo o genoma e os indivíduos formados, ou citótipos, apresentam o dobro do número cromossômico dos parentais. O processo de especiação por poliploidia deve-se ao isolamento reprodutivo ocasionado por eventuais incompatibilidades e/ou por diferenças morfológicas ocorridas após a multiplicação genômica (WOOD et al., 2009), como será abordado detalhadamente adiante.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE VEGETAL UTILIZANDO SEQUÊNCIAS GENÔMICAS REPETITIVAS

1.2.1 HETEROCROMATINA E SEQUÊNCIAS REPETITIVAS UNIVERSAIS

A estrutura do genoma dos eucariotos é composta por porções mais densas e menos densas (vistas em microscopia) denominadas regiões de heterocromatina e

euromatina, respectivamente (STRAUB, 2003). O primeiro relato sobre heterocromatina data de 1928 quando o botânico Heitz visualizou, em núcleos de briófitas, regiões fortemente coradas com carmim acético, que permaneciam compactadas após a mitose (HEITZ, 1928; STRAUB, 2003). A partir de então, o termo heterocromatina foi utilizado para indicar as regiões mais condensadas do genoma. Em contrapartida, o termo euromatina foi utilizado para designar porções mais claras do genoma (vista em microscopia) que descondensam durante a progressão do ciclo celular (HEITZ, 1928; STRAUB, 2003). Além da caracterização da heterocromatina, Heitz também inferiu que tais regiões picnóticas teriam baixa frequência gênica e pouca atividade transcricional (HEITZ, 1928; DILLON e FESTENSTEIN, 2002). A partir de então, vários trabalhos têm sido realizados visando entender e caracterizar a ultraestrutura da cromatina, associando a forma à sua função (CHEUNG et al., 2000; SUMNER, 2003; KOUZARIDES, 2007; FERNANDES et al., 2008; BANNISTER e KOUZARIDES, 2011; FEITOZA e GUERRA, 2011).

A heterocromatina pode ser classificada em facultativa (HF) ou constitutiva (HC). A heterocromatina facultativa pode ser encontrada em apenas um homólogo do par e sua atividade transcricional varia de acordo com o tecido onde a célula se encontra e o estágio de desenvolvimento (SUMNER, 2003). A atividade transcricional dessas regiões é controlada por fatores epigenéticos, os quais atuam de acordo com a fase do ciclo celular e as condições ambientais (KOUZARIDES, 2007; CHEN et al., 2010). Um exemplo bem estudado de heterocromatina facultativa pode ser observado em um dos homólogos do cromossomo X em fêmeas de mamíferos, em que, apenas um cromossomo do par é expresso. Por outro lado, a heterocromatina constitutiva é encontrada em ambos os homólogos, sendo transcricionalmente inativa em estado permanente (SUMNER, 2003). Além disso, estas regiões de HC são constituídas por repetições de DNA *in tandem*, localizadas em porções cromossômicas específicas, como os centrômeros e telômeros, por exemplo (SUMNER, 2003).

Na maioria dos organismos, a heterocromatina telomérica é formada por uma cromatina especial composta de repetições curtas de DNA conservadas (ricas em guanina e citosina) associadas a inúmeras proteínas, essenciais para a manutenção e proteção das extremidades cromossômicas (GREIDER, 1995; KHAIR et al., 2009; SCHOEFTNER et al., 2009). Em plantas, o motivo TTTAGGG é bastante

conservado, presente desde espécies basais (como musgos *Physcomitrella patensna*) até espécies mais derivadas, como as angiospermas dos gêneros *Zea*, *Hordeum* e *Peas* (SIOMOS e RIHA, 2012). Segundo Fajkus et al., (2005) apenas a ordem Asparagales (com cerca de 6 mil espécies) difere das demais espécies. Este clado contém a sequência telomérica similar aos hexa-nucleotídeos encontrados em vertebrados (TTAGGG). Em Asparagales, algumas espécies, tais como do gênero *Cestrum*, *Vestia*, *Sessea* (Solanaceae) e *Allium* (Alliaceae) não apresentam as repetições teloméricas convencionais (PICH et al., 1996; SYKOROVA et al., 2003; FAJKUS et al., 2016), permanecendo tais regiões ainda desconhecidas para a maioria das espécies, exceto para o gênero *Allium*, que teve as repetições teloméricas recentemente descritas (FAJKUS et al., 2016).

Estudos demonstram que, embora as repetições teloméricas sejam altamente conservadas em eucariotos, a extensão das unidades de repetição é variável. De maneira geral, o comprimento do telômero é proporcional ao tamanho do genoma (PETRACEK et al., 1990; FAJKUS et al., 1995; KILIAN et al., 1995). Em algas unicelulares os telômeros apresentam 0,5 Kb enquanto em angiospermas o comprimento total é da ordem de 100 Kb (PETRACEK et al., 1990; FAJKUS et al., 1995; KILIAN et al., 1995; SIOMOS e RIHA, 2012). Além das variações entre as espécies filogeneticamente distantes, diferenças intraespecíficas no comprimento de minissatélites teloméricos também são encontradas (SHAKIROV e SHIPPEN, 2004). Em ecótipos de *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, indivíduos de uma determinada região apresentam variações de 2-5 Kb de comprimento, enquanto indivíduos coletados em outra localidade possuem telômeros maiores, com o comprimento entre 3,5-9 Kb de extensão (SHAKIROV e SHIPPEN, 2004).

Com relação à heterocromatina centromérica e pericentromérica, a sequência de DNA é constituída, na maioria das espécies, por repetições de DNA altamente repetitivas, denominadas de DNA *alpha* satélite (JIANG et al., 2003). A extensão das unidades de repetições varia dentre as diferentes espécies (HIRSCH e JIANG, 2012). Contudo, na maioria dos vegetais, as repetições possuem comprimento de aproximadamente 150-200 pb. No entanto, em algumas espécies a extensão das unidades de repetição pode ter apenas 6 pb, como observado em cevada (HUDAKOVA et al., 2001; HOUBEN et al., 2007), 52 pb em *Torenia fournieri* e *T. bailonii* (KIKUCHI et al., 2005) e 178 pb, como encontrado em *Arabidopsis* (MARTINEZ-ZAPATER et al., 1986; HESLOP-HARRISON et al., 1999). Além de

variações no comprimento, existem variações na composição das sequências repetitivas. Embora o centrômero tenha mantido a sua função altamente conservada ao longo da evolução, a composição das sequências *alpha* satélites que estruturam os centrômeros é amplamente variável nas diferentes espécies (HIRSCH e JIANG, 2012). Em *Solanum bulbocastanum*, por exemplo, as repetições centroméricas são similares às sequências dos telômeros (TEK e JIANG, 2004).

Muitas dessas repetições satélites centroméricas correspondem à retroelementos restritos às regiões próximas aos centrômeros, denominadas *centromere retrotransposons* – CRs. Os retrotransposons são sequências dinâmicas de DNA que atuam incrementando porções do genoma por meio do mecanismo “copia-e-cola” (SLOTKIN et al., 2012). Em vegetais, a família de CR pertence à classe *Ty3-gypsy*, e as espécies mais estudadas compreendem as culturas de importância econômica, como milho, arroz, trigo, cana-de açúcar e cevada (ANANIEV et al., 1998; CHENG et al., 2002; DONG et al., 1998; HUDAKOVA et al., 2001; LIU et al., 2008; NAGAKI e MURATA, 2005; ZHONG et al., 2002). Estudos demonstram que tais sequências de DNA satélites estão associadas à CENH3 (histona centromérica variante da H3 encontrada nos eucariotos), o que justifica a preferência e abundância dos retrotransposons próximos às regiões centroméricas (ZHONG et al., 2002; NAGAKI et al., 2004; LIU et al., 2008).

Além das heterocromatinas terminais e centroméricas, regiões repetitivas compostas por HC também são observadas em porções intersticiais dos cromossomos. O sítio de heterocromatina intersticial mais comum e estudado em plantas corresponde aos espaçadores dos genes ribossomais 45S (5,8S, 18S e 28S) e 5S (ROA e GUERRA, 2012). Os genes de DNA ribossomal são responsáveis pela síntese dos RNAs ribossomais e pela formação das subunidades 60S e 40S do ribossomo. Estas regiões diferem em organização, atividade transcricional, número de *loci*, extensão, e grau de homogeneização intragenômico nas diferentes espécies (FELINER e ROSSELLÓ, 2012). Assim, além da importância funcional e fisiológica para as células, os genes ribossomais constituem importantes marcadores citogenéticos que auxiliam na caracterização de espécies e possibilitam inferências evolutivas. As regiões de DNA ribossomal são sequências repetidas *in tandem* típicas de heterocromatina constitutiva rica em citosina e guanina (SUMNER, 2003; NEVES et al., 2005). As sequências de DNAr 28S são localizadas em sítios específicos nos cromossomos, denominadas regiões organizadoras de nucléolo

(RONs). Em angiospermas, geralmente, os genes 28S são terminais e encontrados em braços curtos dos cromossomos, e quando ativos formam nucléolos bem aparentes (NEVES et al., 2005; ROA e GUERRA, 2012). Já o gene ribossomal 5S não apresenta uma localização específica, e pode ser encontrado em qualquer região cromossômica, inclusive estar adjacente aos genes ribossomais 28S (NEVES et al., 2005), ou seja, localizado entre os espaçadores intergênicos 26S e 18S, como ocorre em alguns clados de Asteraceae (GARCIA et al., 2010) e na briófito *Marchantia polymorpha* (SONE et al., 2009), por exemplo.

1.2.2 SEQUÊNCIAS REPETITIVAS ESPÉCIE-ESPECÍFICAS

Adicionalmente a heterocromatina observada nas regiões teloméricas, centroméricas e nos espaçadores dos genes ribossomais, vários estudos relatam a presença de sítios heterocromáticos intersticiais em diferentes espécies de plantas (APPELS et al., 1978; DEUMLING e GREILHUBER 1982; GUERRA, 1985, 1993; BADAIEVA et al., 1996; MIRANDA et al., 1997; PEDROSA et al., 2000). Tais sequências são formadas por repetições de DNA satélites, que apresentam diferenças quanto à estrutura e extensão dos arranjos, e podem compor grandes porções dos genomas nucleares (GARRIDO-RAMOS, 2015). Em *Pisum sativum* as famílias de DNA satélite correspondem a aproximadamente 35-48% de todo o genoma da espécie (MACAS, NEUMANN e NAVRÁTILOVÁ, 2007). Além disso, algumas espécies podem apresentar grande diversidade de famílias de repetições enquanto em outras taxa, a heterogeneidade é menor. Em *Pisum* e em *Beta* são encontrados diversos tipos de DNA satélite, enquanto em *Fritillaria* e *Musa* há pouca diversidade de repetições (MACAS NEUMANN e NAVRATILOVA, 2007; MENZEL et al., 2008; HRIBOVA et al., 2010; AMBROZOVÁ et al., 2011).

Geralmente, as sequências consistem em motivos de repetição que variam em comprimento de dinucleotídeos a arranjos superiores a 10 Kb (PLOHL et al., 2008; FELINER e ROSSELÓ, 2012;). Além disso, o número de cópias e o padrão de organização e distribuição são muitas vezes espécie-específica (KUBIS et al., 1998). Frequentemente, diferentes famílias de DNA satélites coexistem em espécies

correlatas, o que torna possível a construção de bibliotecas de DNA satélites e inferências sobre ancestralidade (GARKOVIC e PLOHL 2002; PLOHL et al, 2008). Em arroz, por exemplo, duas famílias de DNA satélites (inicialmente identificadas no genoma de *Oryza sativa*), também foram encontradas em várias outras espécies de Triticaceae, porém, o número de cópias das repetições varia consideravelmente dentre as espécies (VERSHININ, ALKHIMOVA e HESLOP-HARRISON, 1996). Em *Nicotiana*, uma extensa repetição de 2,2 Kb denominada *NicCL3* é encontrada abundantemente no genoma de *N. tomentosiformis* (2% do DNA genômico total), ao passo que, em *N. tabacum* esta sequência é menos frequente (RENNY-BYFIELD et al., 2011; 2012).

Estudos demonstram que as repetições de DNA satélite correspondem a partes dinâmicas dos genomas eucariotos, susceptíveis a várias alterações e rearranjos estruturais (UGARKOVIC e PLOHL 2002; PLOHL et al., 2008; TORRES et al., 2011; RICHARD et al., 2013; GARRIDO-RAMOS, 2015), sendo, assim, bons marcadores para estudos de caracterização e evolução cariotípica (NAVRATILOVA, NEUMANN e MACAS 2003; PIRES et al., 2004; TORRES et al., 2011). As eventuais mudanças nos perfis destas repetições contribuem para o entendimento da dinâmica e plasticidade dos genomas ao longo do tempo e podem auxiliar os estudos de evolução cromossômica (UGARKOVIC e PLOHL, 2002; PLOHL et al., 2008). Em *Beta*, a análise comparativa de oito sequências repetitivas contribuiu para esclarecer relações taxonômicas em quatro seções do gênero e permitiu a detecção de híbridos (SCHMIDT e HESLOP-HARRISON, 1994). Em *Gossypium* a identificação de elementos móveis no genoma de poliploides e dos respectivos parentais auxiliou no entendimento da reestruturação genômica após a duplicação cromossômica (HU, GROVER e WENDEL, 2010). Em *Fritillaria*, o estudo comparativo de sequências repetitivas entre *F. affinis* e *F. imperialis* possibilitou o reconhecimento de diferentes famílias de elementos repetitivos e inferências sobre a expansão do genoma nas espécies do gênero (AMBROZOVÁ et al., 2010). Já em *Secale*, o mapeamento da repetição *R173* (denominada *UCM600* em centeio) em espécies silvestres e em espécies correlatas, como as espécies de *Triticum*, revelou a presença de introgressão de DNA de *Secale* no genoma de trigo (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2011). Em *Nicotiana*, várias famílias de DNA satélites têm sido identificadas (como as repetições *HRS60*; *NTS9*; *NTRS* e *NicCL3*), a fim de auxiliar os estudos de caracterização estrutural dos genomas e os aspectos evolutivos (GAZDOVA et

al., 1995; MATYASEK et al., 1997; JAKOWITSCH et al., 1998; RENNY-BYFIELD et al., 2011; 2012).

Famílias específicas de DNA satélite também podem ser encontradas em cromossomos sexuais e em cromossomos B (KEJNOVSKY et al., 2009). Nos vegetais, são raros os casos de cromossomos sexuais heteromórficos (VYSKOT e HOBZA, 2004). No entanto, quando há diferenças na morfologia cromossômica, geralmente, o cromossomo Y é maior que seu homólogo X (KEJNOVSKY et al., 2009). Segundo Kejnovsky et al., (2009), o tamanho superior do cromossomo Y pode ser justificado pelo o acúmulo de sequências de DNA repetitivo. Em *Carica papaya*, por exemplo, regiões heterocromáticas (exclusivas do cromossomo Y) constituem cerca de 20% de todo o cromossomo (YU et al., 2008). Em cromossomos Y de *Rumex* são encontrados dois tipos principais de famílias de DNA satélites denominadas *RAE180* e *RAYS* (SHIBATA, HIZUME e KUROKI, 1999; 2000).

Com relação às repetições encontradas em cromossomos B, os retroelementos correspondem à classe mais abundante de DNA repetitivo. A espécie *Brachyscome dichromosomatica*, apresenta retrotransposons específicos de cromossomo B (denominados *Bd49*) (FRANKS et al., 1996). As famílias de DNA repetitivo *D1100* e *E3900* são encontradas exclusivamente em cromossomos B de *Secale cereale*, apresentando pouca homologia com outras espécies do gênero (SANDERY et al., 1990; WILKES et al., 1995). Em *Crepis capillaris*, os cromossomos B são compostos por repetições de dinucleotídeos (CA)_n pertencentes à família *B134*, localizada em regiões pericentroméricas (JAMILENA et al., 1995). Segundo os autores, as repetições em *C. capillaris* foram abundantemente amplificadas nos cromossomos B após sua origem a partir de cromossomos A. Sequências altamente repetitivas (correspondentes à transposons) também são encontradas em cromossomos A e B em *Zea mays* (ANFENITO e BIRCHLER, 1993; LAMB et al., 2007).

1.2.3 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA HETEROCROMATINA – UM HISTÓRICO NA CITOGENÉTICA VEGETAL

Como previamente mencionado, O DNA repetitivo compõe grande parte dos genomas vegetais (KUBIS, SCHMIDT e HESLOP-HARRISON,1998; HESLOP-HARRISON, 2000; MACAS et al., 2007) e sua caracterização gera informações a respeito da constituição e organização dos genomas, além de permitir subsídios evolutivos entre grupos (RUAS et al., 2005; CHESTER et al., 2010). Uma das maneiras mais eficazes de estudo e caracterização da heterocromatina é por meio de análises citogenéticas. O estudo sobre cromossomos iniciou-se na segunda metade do século XIX com Flemming (em 1879-1882) propondo os termos mitose e cromatina e com Strasburger (em 1884) descrevendo o processo de fertilização em angiospermas (SUMNER, 2003). A partir de então, várias técnicas de citogenética, que visam à caracterização cariotípica têm sido propostas e aprimoradas.

Um dos trabalhos mais importantes de caracterização de heterocromatina vegetal, que se tornou referência para trabalhos futuros, foi realizado na década de 30 por Bárbara McClintock's (McCLINTONCK'S, 1929; 1932; 1938). A pesquisadora detectou regiões heterocromáticas (knobs) em paquítenos de milho (*Zea mays*) e identificou, a partir do perfil heteropicnótico e medidas cromossômicas, os pares de homólogos. No entanto, sua contribuição mais relevante foi a descoberta de elementos móveis no genoma (McCLINTONCK'S, 1929; 1932; 1938; 1941; 1984). A partir de então, os estudos envolvendo o mapeamento cromossômico se expandiram para outras espécies como *Oryza sativa*, *Sorghum propinquum* e *Lycopersicon esculentum* (BARTON, 1950; SHASTRY et al., 1960; MARGOON et al., 1961; MISRA et al., 1967; RAMANNA e PARKKEN, 1967). Contudo, uma caracterização baseada apenas em mapeamento de knobs torna-se limitada quando as espécies investigadas possuem poucas porções de heterocromatina constitutiva e o cariótipo simétrico (com cromossomos similares). Assim, torna-se necessária a utilização de técnicas mais elaboradas para a distinção de homólogos e para o mapeamento físico da heterocromatina, como as técnicas de bandeamentos cromossômicos.

Dentre as técnicas citogenéticas mais utilizadas em plantas, o bandeamento cromossômico é um método prático e eficiente para o estudo da heterocromatina (SUMNER, 2003). O primeiro relato de utilização de bandeamento data de 1968

quando Caspersson e colaboradores utilizaram corantes fluorescentes (quinacrina) em metáfases de *Vicia faba* para caracterização da heterocromatina rica em GC (CASPERSSON et al., 1968; ZELENIN e ZOSHCHUK, 2000). Estes foram os primeiros estudos que demonstraram um padrão de bandas específicas, e possibilitou a caracterização de cromossomos individuais com a utilização de corantes fluorescentes (CASPERSSON et al., 1968). Em 1970 o bandeamento C realizado por Pardue e Gall revelou blocos de heterocromatina centromérica constituídas por DNA satélite (caracterizando heterocromatina constitutiva). E em 1975, Goodpasture et al., desenvolveram a técnica de coloração com nitrato de prata para a visualização de nucléolos e RONS ativas na intérfase precedente (GOODPASTURE e BLOOM, 1975; GOODPASTURE et al., 1976).

Ainda na década de 70, com o desenvolvimento dos bandeamentos fluorescentes base-específicos, os trabalhos para a caracterização de genomas vegetais foram intensificados, uma vez que permitiram a distinção de diferentes tipos de heterocromatina. Desde então, os fluoróforos mais utilizados têm sido: DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol) e Hoechst 33258 que apresentam afinidade pelas bases nitrogenadas adenina e timina; e Mitramicina e CMA₃ (Cromomicina A₃) os quais possuem afinidade por citosina e guanina. Com o advento do bandeamento duplo DAPI/CMA₃ proposto por Schweizer (1973) tornou-se possível a identificação simultânea de regiões genômicas ricas em AT e CG, respectivamente (SUMNER, 2003).

Mais recentemente, com o desenvolvimento da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) que reúne conhecimentos sobre citologia, citogenética clássica e genética molecular, tornou-se possível a localização exata de sequências pré-determinadas no genoma. A técnica baseia-se na complementariedade de bases entre a sonda e o DNA alvo, sendo um método mais preciso para a visualização de porções cromossômicas específicas. A hibridização *in situ* (HIS) foi utilizada pela primeira vez por Gall e Pardue em 1969, com o uso de radioisótopos em cromossomos de *Xenopus*. A princípio, as sondas quentes, como eram chamadas, utilizavam trítio (³H) e fósforo radioativo (³²P) para as marcações. No entanto, apesar das hibridizações serem bastante sensíveis na detecção de sequências curtas, a marcação com isótopos radioativos apresentava grandes desvantagens. As marcações geravam lixo radioativo, os sinais eram de baixa resolução, as análises

dispendiam tempo (chegando até 150 dias em cromossomos de *Phaseolus*, por exemplo) e havia o risco de exposição do pesquisador à radiação (GUERRA, 2004).

Posteriormente, por motivos de biossegurança, o método foi aprimorado ao longo dos anos, e atualmente, as sondas são marcadas apenas com nucleotídeos modificados. As marcações podem ser diretas, quando os *dntps* utilizados são acoplados a fluorocromos ou indiretas, quando os nucleotídeos possuem uma molécula marcadora (biotina ou digoxigenina, por exemplo) e esta é detectada posteriormente por um anticorpo associado a um fluoróforo (GUERRA, 2004; JIANG e GILL, 2006).

Assim, devido a sua alta especificidade e caráter informativo, a FISH é uma técnica amplamente utilizada na citogenética vegetal, constituindo uma ferramenta fundamental e indispensável na caracterização cariotípica e em estudos de evolução cromossômica (ALLABY e BROWN, 2001; GU e XIÃO, 2003; NEVES et al., 2005; WAN et al., 2012; MAVRODIEV et al., 2015). Dentre as sondas de FISH mais utilizadas, destacam-se as sequências repetitivas de DNA como os genes ribossomais 28S e 5S, telômeros e centrômeros (ALLABY e BROWN, 2001; NEVES et al., 2005; WAN et al., 2012).

Adicionalmente, o genoma inteiro de uma espécie pode ser utilizado como sonda. Neste caso, a técnica é denominada GISH (Genome *in situ* Hibridization), sendo uma técnica bastante aplicada para a distinção de subgenomas de híbridos e aloploidos (KENTON et al., 1993). Outra variante recente da técnica de FISH corresponde à metodologia da fibra de DNA estendida, ou “Fiber-FISH”. A princípio, esta técnica foi realizada em células humanas (WIEGANT et al., 1992) e posteriormente adaptada para materiais vegetais. Um dos primeiros trabalhos envolvendo “fiber-FISH” em plantas foi desenvolvido por Franz et al., (1996) em núcleos de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* com o intuito de mapear sequências repetitivas. Nesta técnica, os núcleos interfásicos são aderidos em uma lâmina de modo que a cromatina fique parcialmente livre para ser estendida, formando finas fibras de DNA (FRANSZ et al., 1996). O método é empregado para o mapeamento de sequências curtas de DNA ou sequências adjacentes muito próximas, as quais com o método convencional (usando metáfases mitóticas ou paquítenos) não são possíveis à visualização individual das sequências devido à baixa resolução (JIANG e GILL, 2006). Esta técnica é utilizada em projetos de sequenciamento genômico para a visualização de “gaps” e em estudos sobre

organização e estrutura de sequências repetitivas como centrômeros e telômeros (GINDULLIS et al., 2001; CHENG et al., 2002; JIANG e GILL, 2006).

Atualmente, as tecnologias de sequenciamento genômico combinados à citogenética possibilitam o reconhecimento e o mapeamento de regiões genômicas até então desconhecidas. Com o advento das plataformas de sequenciadores em massa, porções do genoma podem ser rapidamente sequenciadas e posteriormente detectadas por meio de hibridizações *in situ*. Inúmeros trabalhos têm utilizado técnicas de citogenética molecular após o sequenciamento genômico a fim de caracterizar e mapear regiões de DNA repetitivo (RENNY-BYFIELD et al., 2011; 2012; TORRES et al., 2011; CHESTER et al., 2013; EMADZADE et al., 2014). As pesquisas são voltadas principalmente para a caracterização de espécies (MACAS et al., 2011), estudos sobre poliploides, (BUGGS et al., 2012), filogenia e evolução (GROVER et al., 2012).

1.2.4 CARACTERIZAÇÃO DE REGIÕES CROMOSSÔMICAS NA ERA PÓS GENÔMICA

O mapeamento de regiões genômicas específicas tem possibilitado a caracterização e a comparação entre as diferentes espécies, auxiliando em estudos evolutivos e filogenéticos (BUGGS et al., 2012; GROVER et al., 2012). Entretanto, apesar dos dados sobre estrutura e organização genômica serem determinantes para o entendimento da dinâmica do processo evolutivo, as informações para a maioria das plantas ainda são escassas. Os trabalhos sobre composição e mapeamento de regiões específicas se restringem, principalmente, aos grupos de interesse econômico como Solanaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae e Poaceae, não havendo informação para a maioria das espécies vegetais (HUANG et al., 2009; VOGEL et al., 2010; WU e TANKSLEY, 2010). Neste contexto, o mapeamento físico de regiões específicas realizadas com o uso de BACs (cromossomos artificiais de bactéria) e FISH permite localizar as regiões genômicas de interesse, somando informações sobre a composição e estrutura de variados genomas vegetais. No entanto, até pouco tempo atrás, o desenvolvimento de novos marcadores

cromossômicos consistia em metodologias laboriosas que demandavam tempo até serem empregadas.

Recentemente, este cenário tem se modificado. Com o advento dos novos sequenciadores, os genomas de várias espécies têm sido investigados (RENNY-BYFIELD et al., 2011; 2012; TORRES et al., 2011; CHESTER et al., 2013; EMADZADE et al., 2014). O sequenciamento paralelo em massa permite conhecer o genoma de forma mais rápida e com grande eficiência. As novas plataformas são capazes de gerar informações de milhões de pares de bases em uma única corrida, viabilizando o conhecimento de regiões genômicas ainda inexploradas de forma econômica e rápida (POMPANON e SAMADI, 2015). Aliada à técnica de FISH, o mapeamento de sequências específicas possibilita uma caracterização mais refinada do cariótipo, bem como documentar eventuais alterações cariotípicas intraespecíficas. As informações auxiliam na compreensão sobre a estrutura e dinâmica dos genomas, e permite discussões acerca de padrões evolutivos e filogenéticos nos diferentes grupos de plantas (FLAGEL e BLACKMAN, 2012). Estudos sobre a composição e dinâmica de genomas, especialmente no que diz respeito às regiões repetitivas, têm sido frequentemente avaliadas (MACAS et al., 2007; SWAMINATHAN, VARALA e HUDSON, 2007; WICKER et al., 2009; RENNY-BYFIELD et al., 2011; 2012). Em *Musa acuminata*, por exemplo, a partir do sequenciamento genômico foi possível identificar e localizar com uso da FISH, diferentes classes de elementos repetitivos, que auxiliaram em estudos de diversidade genética e seleção de indivíduos para técnicas de melhoramento (HRIBOVA et al., 2010).

Considerando que as famílias de DNA repetitivo correspondem a grande porção do genoma (KUBIS, SCHMIDT e HESLOP-HARRISON, 1998; HESLOP-HARRISON, 2000; MACAS et al., 2007) cada vez mais, trabalhos de sequenciamento de regiões repetitivas em espécies não modelos têm sido realizados, principalmente em estudos sobre poliploidia e evolução cariotípica (TORRES et al., 2011; BUGGS et al., 2012). No complexo *Prospero autumnale* (uma série aneuploide com $x=5, 6$ e 7) a identificação da repetição satélite *PaB6* e seu respectivo mapeamento permitiram importantes inferências evolutivas nos diferentes citótipos da espécie (EMADZADE et al., 2014). Em populações naturais de *Tragopogn micellus*, um neoalopoliploide, foi possível investigar as alterações cromossômicas decorridas ao longo de 40 gerações e inferir sobre a estrutura e

estabilidade cromossômica da espécie após eventos de poliploidia (CHESTER et al., 2011). Renny-Byfiel et al., (2011) estudando retroelementos em três espécies de *Nicotiana*, observaram padrões distintos de sequências repetitivas na evolução de *N. tabacum* e seus parentais *N. silvestres* e *N. tomentosiformes*. Em variedades de *Cucumis sativus* a caracterização de blocos heterocromáticos e rearranjos cromossômicos possibilitaram estudos sobre a evolução cromossômica e a domesticação de *Cucumber* (YANG et al., 2012). Em *Brassica rapa* e *B. oleracea* comparações de substituição de nucleotídeos em retrotransposons ortólogos providenciaram informações sobre estrutura dos genomas e a dinâmica da cromatina em ambas as espécies (ZHAO et al., 2013).

Portanto, com o desenvolvimento das novas plataformas de sequenciadores e os avanços em bioinformática, tornou-se mais prática a identificação e a localização de regiões genômicas espécie-específicas, principalmente, regiões repetitivas.

1.2.5 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E ESTUDOS DE DIVERSIDADE VEGETAL

Nos últimos anos a preservação e conservação da biodiversidade têm sido de importância primária para a manutenção dos bancos de germoplasma e da variabilidade genética de espécies, contribuindo para a não extinção de indivíduos em risco (OLIVEIRA et al., 2006). A princípio, as coleções de germoplasma *ex situ* eram mantidas apenas por meio de avaliações dos caracteres morfológicos e fenotípicos, abordagens limitadas na caracterização da diversidade das espécies (KILIAN e GRANER, 2012). Assim, a fim de auxiliar nas caracterizações, técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas como subsídios para análises de diversidade. Com o uso de DNA *barcoding* e sequenciamento paralelo em massa, tornou-se viável a investigação da biodiversidade global, reunindo informações sobre taxonomia, sistemática, ecologia, biologia molecular e bioinformática (POMPANON e SAMADI, 2015). No entanto, embora enormes avanços tecnológicos tenham permitido conhecer mais a fundo as informações genéticas, as plataformas de sequenciamento para as espécies silvestres, que possuem o genoma totalmente desconhecido (e ausentes de genomas de referência) ainda são limitadas, sendo

inviável a montagem de todo o genoma. Para tais espécies, trabalhos de sequenciamento de DNA de cloroplastos e mitocôndrias e de regiões repetitivas nucleares são mais comuns e fornecem valiosas informações sobre a diversidade e evolução dos taxa (VARSHNEY et al., 2006; WICKER et al., 2006; RENNY-BYFIELD et al., 2012; STRAUB et al., 2012).

Neste contexto, as análises de regiões repetitivas espécie-específicas se caracterizam como sendo uma abordagem mais direcionada à espécie de interesse. Embora as regiões universais possam auxiliar em estudos genômicos nos diferentes taxa, sequências específicas são mais informativas quando se deseja conhecer a estrutura genética de indivíduos de uma mesma espécie ou população (EMADZADE et al., 2014). Burge et al., (2012) por exemplo, utilizando plataformas de sequenciamento em massa, desenvolveram *primers* de microssatélites específicos para *Ceanothus roderickii* (Rhamnaceae) visando estudos de fluxo gênico, diversidade genética e fragmentação populacional da espécie. Em *Lupinus luteus* o sequenciamento do DNA plastidial possibilitou detectar inversões de sequências e permitiu comparações de DNA plastidial com outras espécies de Fabaceae, auxiliando na filogenia do grupo (MARTIN et al., 2014). Em *Lecomtella* (Poacea) a partir do sequenciamento de DNA plastidial e nuclear foi possível gerar informações filogenéticas que auxiliaram na sistemática do gênero (BESNARD et al., 2013).

Assim, é notável a contribuição das novas tecnologias de sequenciadores para caracterização da diversidade e o entendimento de padrões evolutivos nos genomas vegetais. As informações geradas a partir de sequenciamento permitem a criação e o aperfeiçoamento de bancos de dados genômicos, com intuito de documentar a diversidade e a variabilidade de espécies (KILIAN e GRANER, 2012).

1.3. POLIPLÓIDIA E DIVERSIDADE GENÔMICA EM PLANTAS

A poliploidia é considerada o principal mecanismo envolvido na formação de novas espécies e diversificação da flora (OTTO e WHITTON, 2000; SOLTIS et al., 2005; DE BODT et al., 2008; SOLTIS e SOLTIS, 2009; 2013). A multiplicação genômica proporciona consideráveis mudanças nucleares, podendo gerar muitas

vezes variações fenotípicas, contribuindo assim para a diferenciação entre os taxa e o aumento da diversidade de espécies (DOYLE et al., 2008; SOLTIS e SOLTIS, 2009; FINIGAN, TANURDZIC e MARTIENSSEN, 2012; SOLTIS e SOLTIS, 2013). Indivíduos poliploides podem ser encontrados em diferentes linhagens filogenéticas, abrangendo uma vasta gama de espécies distribuídas em diversos ambientes em todo o globo (SOLTIS e SOLTIS, 2013). Estimativas da frequência de plantas poliploides têm sido tema de debates e discussões na comunidade científica há algum tempo, e os índices sobre a frequência de poliploidia em angiospermas eram controversos, variando de 20% a 80% (STEBINS, 1938; GRANT, 1963; MASTERSON, 1994; SOLTIS et al., 2009; WOOD et al., 2009). A princípio, de acordo com Grant (1963) o número básico de todas as angiospermas corresponderia à $x=7$ e $x=9$ cromossomos. No entanto, de acordo com Masterson (1994) as angiospermas que possuem n superior a 11 cromossomos são espécies poliploides. Todavia, estudos recentes sugerem que todas as angiospermas já passaram, no mínimo, por um evento de multiplicação genômica durante sua história evolutiva (JIAO et al., 2011; SOLTIS e SOLTIS, 2013). Em *Arabidopsis thaliana* (uma espécie modelo e considerada diploide), a presença de genes duplicados no genoma revela a ocorrência de pelo menos 12 eventos de poliploidia durante seu curso evolutivo, constituindo, portanto, em uma espécie paleopoliploide (TANG et al., 2008). Os paleopoliploides são indivíduos que passaram por eventos de duplicação cromossômica há milhares de anos e que ao longo das reestruturações do genoma adotaram o comportamento dissômico (BOWERS et al., 2003; FAWCETT et al., 2009; JIAO et al., 2011). Dentre os gêneros paleopoliploides mais conhecidos podemos citar *Zea*, *Glicine*, *Gossypium*, *Sorghum*, *Oryza* (PATERSON et al., 2004), *Populus* (TUSKAN et al., 2006), *Vitis* (VELASCO et al., 2007), e *Carica* (MING et al., 2008). Geralmente, os paleopoliploides possuem múltiplas origens e uma das maneiras de se detectar a paleopoliploidia é por meio de comparações de sequências genômicas entre as espécies correlatas (MA e GUSTAFSON, 2005; LIU et al., 2006).

Com o advento das novas plataformas de sequenciadores, a identificação do número de cópias de famílias gênicas por genoma tornou-se mais viável e acessível, assistindo aos estudos evolutivos, sobretudo em poliploides (SOLTIS e SOLTIS, 2013). A presença de múltiplas cópias de genes/sequências é indício de ocorrência de poliploidia, e a respectiva identificação de genes ortólogos auxilia em estudos

sobre ancestralidade, origem da poliploidia e construção de árvores filogenéticas (MAVRODIEV et al., 2015). Recentemente, análises filogenômicas realizadas em diferentes espécies sugerem a existência de um ancestral comum para as espermatófitas e outro ancestral comum para o clado das angiospermas (JIAO et al., 2011). Segundo Jiao et al., (2011), intensos eventos de duplicação genômica ocorreram há 319 e 192 milhões de anos, os quais originaram inovações importantes que derivaram as plantas com sementes e flores, respectivamente.

Estudos indicam que a frequência de poliploidia pode estar atrelada ao tamanho do genoma, havendo uma correlação negativa entre tamanho do genoma e incidência de poliploidia (GRIF, 2000; WOOD et al., 2009). Assim, as espécies que apresentam poucos cromossomos são mais propícias à duplicação genômica (GRIF, 2000; WOOD et al., 2009; HUSBAND, BALDWIN e SUDA, 2013). De fato, quando observamos diferentes grupos taxonômicos é possível notar que algumas linhagens possuem pré-disposição em manter indivíduos poliploides, enquanto em outras, a frequência de duplicação genômica é menor (HUSBAND, BALDWIN e SUDA, 2013). De acordo com Wood (2009), a incidência de poliploidia intragenérica é superior a 50% em espécies que possuem o número cromossômico entre $2n=4$ e $2n=14$. Já em gêneros em que as espécies apresentam de 26 a 108 cromossomos, a incidência de poliploidia é inferior a 20%. Adicionalmente, a frequência de poliploides é superior em plantas herbáceas e perenes se comparada às espécies lenhosas (VAMOSI e DICKINSON, 2006).

Basicamente, os indivíduos poliploides podem ser classificados em alopoliploides, quando há duplicação de diferentes genomas após hibridação, e autopoliploides, quando ocorre a duplicação do mesmo conjunto cromossômico (STEBBINS, 1971). A autopoliploidia foi considerada há muito tempo como sendo menos frequente na natureza em comparação a alopoliploidia (SOLTIS e SOLTIS, 2009; STEBBINS, 1947; PARISOD, HOLDEREGGER e BROCHMANN, 2010; SOLTIS et al., 2010). No entanto, estimativas recentes apontam que o número de autopoliploides pode estar subestimado, devido principalmente, às dificuldades no reconhecimento e identificação de citótipos autopoliploides crípticos (BAKER et al., 2016).

Dentre os neopoliploides existentes, as espécies *Spartina anglica* (AINOUCHE et al., 2004); *Senecio cambrensi*; *S. eboracensis* (ABBOT e LOWE 2004), *Cardamine schultzii* (URBANSKA et al., 1997), *Tragopogon mirus* e *T.*

miscellus (SOLTIS e SOLTIS, 2009) constituem exemplos recentes de diversificação da flora de angiospermas via aloploidia. De acordo com Kihara e Ono (1926) os aloploidos são híbridos permanentes que possuem comportamento dissômico, fato que não compromete sua fertilidade e reprodução. Desse modo, os aloploidos são considerados mais estáveis que os indivíduos autopoliploides. Por outro lado, de acordo com Wettstein (1927) os autopoliploides são inviáveis na natureza, devido à sua baixa fertilidade, fazendo-se necessária a restauração da condição diploide novamente para a sua conservação na natureza. No entanto, os problemas relacionados à reprodução sexual, ocasionados pela redundância genômica nos autopoliploides podem ser contornados pela reprodução assexuada, como a propagação vegetativa e apoximia, mecanismos bastante comuns em neopoliploides.

1.3.1 REPRODUÇÃO E ESTABELECIMENTO DE POLIPLÓIDES

A biologia reprodutiva e o estabelecimento de poliploides têm sido objeto de estudo desde o início do século passado (ERNST, 1918; STEBBINS, 1938; GUSTAFSSON, 1947; STEBBINS, 1950). Modelos predizem que as espécies capazes de se autofecundar são mais prováveis em estabelecer linhagens poliploides com sucesso, se comparada às espécies que possuem fecundação cruzada (RODRIGUEZ, 1996; BAACK, 2005; RAUSCH e MORGAN, 2005). As primeiras observações sobre o sistema reprodutivo em poliploides datam da década de 50, quando Grant (1956) e Stebbins (1957) observaram alta frequência de autofecundação em espécies poliploides. Segundo Stebbins (1957) após a duplicação genômica, muitos citótipos recém-formados apresentam a alteração no tipo reprodução (de alogamia para autogamia). A proposta inicial de Stebbins foi confirmada em estudos posteriores (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; BARRINGER, 2007), os quais revelaram que citótipos poliploides são preferencialmente autógamos, ao passo que, seus parentais diploides podem exibir ambos os tipos de fertilização. A mudança de alogamia para autogamia em poliploides mostrou-se um evento comum em angiospermas após a duplicação genômica, e foi descrito como

um mecanismo chave capaz de contribuir significativamente para a origem de outros indivíduos poliploides. De acordo com Ramsey e Schemske (1998) espécies alopoliploides autógamas apresentam 34 vezes mais chance de originar citótipos poliploides se comparadas às espécies alopoliploides que apresentam fecundação cruzada.

Os indivíduos neopoliploides são caracterizados por apresentarem falhas durante toda a divisão meiótica e conseqüentemente, o comprometimento na reprodução sexual. Em alopoliploides, os diferentes genomas submetidos ao mesmo núcleo podem apresentar incompatibilidade cinética no ciclo celular, culminando em divisões assincrônicas. Além disso, eventuais pareamentos entre cromossomos homeólogos podem levar à formação de univalentes e multivalentes resultando em segregação desigual dos cromossomos (ZIELINSKI e SCHEID, 2012). Já em autopoliploides, a meiose é afetada pela presença de múltiplas cópias de homólogos. As falhas no processo de sinapse na prófase I seguida de segregação cromossômica desbalanceada também levam a irregularidades meióticas e induzem a formação de gametas inviáveis. Inúmeros trabalhos relatam a baixa fertilidade em poliploides devido às anormalidades na microsporogênese (HE et al., 2010; GRANDONT, JENCZEWSKI e LLOYD, 2013). Em autotetraploides de *Oryza sativa*, por exemplo, a baixa fertilidade de pólen deve-se aos altos índices de irregularidades meióticas (HE et al., 2010). Segundo Mestiri et al. (2010) a presença de univalentes e multivalentes em alohexaploides de trigo, é causada por diferenças cinéticas durante a divisão, acarretando em erros de pareamento cromossômico, e culminando com a formação de gametas desbalanceados. Em triploides de *Coprinus cinereus* e em autotetraploides de *Solanum*, a formação de múltiplos complexos sinaptonêmicos em prófase I comprometem toda a divisão celular, inviabilizando a formação dos gametas masculinos (RASMUSSEN et al., 1981; STACK, 1982). Assim, em função das inúmeras falhas na gametogênese, Wettstein (1927) propôs que a condição poliploide só é viável quando aliada a propagação vegetativa ou associada à reprodução por apomixia.

Na apomixia a reprodução acontece de maneira assexuada sem que ocorra fertilização, e as sementes formadas são geneticamente idênticas à planta mãe (CARMAN, 1997; RICHARDS, 1997). O processo de apomixia está frequentemente associado à condição poliploide, podendo ser uma das principais conseqüências após a duplicação genômica. Em *Pilosessa officinarum*, por exemplo, os indivíduos

poliploides são apomíticos, enquanto suas contrapartes diploides se reproduzem normalmente de maneira sexual (MRÁZ et al., 2008). Fenômeno similar também ocorre em espécies de *Paspalum*, (NORRMANN et al., 1989; QUARIN et al., 2001), *Calamagrostis* (NYGREN, 1948) e *Brachiaria* (NAUMOVA et al., 1999). Estudos indicam que ambos os processos (poliploidia e apomixia) compartilham características em comum, uma vez que são desencadeados após hibridações e estão envolvidos na formação de gametas não reduzidos (HUSBAND et al., 2013). Embora a reprodução por apomixia reduza a variabilidade genética, ela propicia a dispersão de sementes poliploides possibilitando a perpetuação da espécie/citótipo (RICHARDS, 1997), como acontece em *Arnica cordifolia* (KATO, 2006; 2007).

De acordo com a hipótese da assincronia do gene duplicado, a condição apomítica em poliploides teria surgido através de conflitos entre os genes relacionados à reprodução em subgenomas de híbridos (CARMAN, 1997). Assim, para contornar a incompatibilidade entre os subgenomas e reestabelecer a reprodução por sementes, teria surgido o processo de apomixia. Desse modo, uma vez estabelecida, a condição apomítica é transmitida para as gerações futuras, já que a reprodução assexuaI preserva a constituição genômica primária e mantém os genes responsáveis pela apomixia na população. Por outro lado, a reprodução sexual acelera o processo de diploidização genômica, levando à eliminação de genes duplicados (inclusive os genes responsáveis pela apomixia) e ao longo das gerações reestabelece a condição diploide. Por essa razão, muitas plantas poliploides são apomíticas enquanto os diploides apresentam reprodução sexual (CARMAN, 1997).

A propagação vegetativa também é eficiente para a manutenção e sobrevivência de poliploides (OTTO e WHITTON, 2000). Estudos indicam que o processo de clonagem é intensificado em indivíduos com vários níveis de ploidia (STEBBINS, 1950; OTTO e WHITTON, 2000). Em citótipos de *Campanula patula*, por exemplo, a reprodução vegetativa é predominante em indivíduos octoploides se comparado aos parentais diploides (HUSBAND et al., 2013). Segundo Stebbins (1950), a duplicação genômica leva ao aumento do número de meristemas por planta, influenciando na propagação e colonização de habitats. Além disso, a reprodução assexuaI assegura a permanência do novo citótipo no ambiente, ainda que ele apresente desvantagens sexuais (KAO, 2007).

Os citótipos poliploides sempre surgem dentro de populações diploides, constituindo a princípio, uma minoria de indivíduos na população total (LEVIN 2002). Normalmente, em ecossistemas estáveis, os poliploides recém-formados não são capazes de competir com os parentais (CONANT e WOLFE, 2007; FEILD e AREN, 2007; HEGARTY e HISCOCK, 2008) e acabam sendo eliminados da população com o passar das gerações (LEVIN, 2002; KATO, 2007). De acordo com Wood et al., (2009) o estabelecimento de neopoliploides é um fenômeno raro na natureza. A inferioridade numérica de tetraploides, por exemplo, (em populações basicamente diploides), faz com que tais indivíduos recebam a maioria de pólenes provindos de citótipos diploides, fato que dificulta sua produção de sementes e descendentes tetraploides. Por outro lado, uma vez originado, os neopoliploides devem se fixar nas populações, para posteriormente, serem capazes de competir pelo ambiente ou colonizar novos habitats. A ocorrência de autopolinizações, processos de apoximia e propagação vegetativa, já discutidos, favorecem a sua propagação e estabelecimento nas populações (LEVIN, 2002).

Geralmente, populações formadas por diferentes citótipos são evolutivamente instáveis, exceto quando os citótipos habitam locais restritos (com preferência em micro-habitats) ou possuem isolamento pré-zigótico (BAACK, 2005; HALVERSON et al., 2008). Eventualmente, os neopoliploides são capazes de superar a desvantagem numérica e colonizar locais diferentes de sua origem. Contudo, para que isso ocorra, é necessário que os poliploides recém-formados tenham grandes vantagens competitivas em relação aos diploides ou tenham diferentes tratamentos ecológicos (LEVIN, 2002). A princípio, os diferentes citótipos compartilham os mesmos nichos ecológicos, todavia a duplicação genômica pode proporcionar mudanças fenotípicas que alteram as interações ecológicas, e permitem que áreas antes não habitadas pela espécie sejam ocupadas pelos novos citótipos (LEVIN, 1983; SOLTIS e SOLTIS, 1993; OTTO e WHITTON, 2000; LEVIN, 2002). Diferentes tipos de polinizadores e herbívoros, períodos distintos de floração e incompatibilidade sexual são exemplos de contrastes ecológicos que favorecem a coexistência de citótipos (LEVIN, 2002; THOMPSON, NUISMER e MERG, 2004). Em *Plantago media*, por exemplo, as flores de indivíduos diploides florescem cerca de três semanas antes que as flores dos tetraploides, fato que diminui a competição por polinizadores e permite a simpatria dos citótipos (VAN DIJK et al., 1992).

1.3.2 ECOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE POLIPLÓIDES

Inúmeros estudos demonstram que poliplóides são capazes de se adaptar às condições extremas, as quais não seriam toleradas pelos seus parentais diploides (LEVIN, 1983; THOMPSON e LUMARET, 1992; SOLTIS e SOLTIS, 1993; OTTO e WHITTON, 2000; HEGARTY e HISCOCK, 2002; SOLTIS, SOLTIS e TATE, 2003; HEGARTY e HISCOCK, 2007). Um exemplo pode ser visto em hexaploides de *Achillea borealis*, os quais possuem um valor adaptativo superior se comparado aos indivíduos tetraploides da mesma espécie (FAWCET et al., 2013). O potencial adaptativo observado em poliplóides está relacionado, provavelmente, à alta heterozigosidade e à diversidade alélica (OTTO e WHITTON, 2000), que levam a mudanças no padrão de expressão gênica (CROW e WAGNER, 2006; HA et al., 2008; HEGARTY et al., 2008). A duplicação genômica altera significativamente a atividade dos genes, seja por meio de modificações nas sequências de DNA ou através do perfil epigenético (FINIGAN, TANURDZIC e MARTIENSSEN, 2012). Tais mecanismos resultam em mudanças fenotípicas, que podem ser cruciais para a adaptação, distribuição e ecologia das espécies (LUKENS et al., 2006; OZKAN et al., 2001; KOH et al., 2010).

Contrastes ecológicos entre citótipos são comuns. Em *Chamerion angustifolium*, há um aumento gradual na colonização de ambientes quentes de acordo com o aumento do nível de ploidia (MOSQUIN, 1967). Os citótipos diploides desta espécie são encontrados, preferencialmente, em locais mais frios em comparação aos tetraploides (encontrados em locais de clima intermediário) e aos hexaploides (localizados em ambientes com temperatura superior) (MOSQUIN, 1967). Em *Vaccinium uliginosum* (HAGERUP, 1933), *Anthoxanthum odoratum* (HEDBERG 1969), *Fraxinus americana* (SCHAEFER e MIKSCHE, 1977) e *Centaurea jacea* (HARDY et al., 2000) por exemplo, os parentais diploides apresentam maior tolerância ao frio se comparado com seus respectivos autopoliplóides. Em *Eragrostis cambessediana*, as plantas diploides colonizam habitats úmidos enquanto os tetraploides e octoploides ocorrem em habitats secos (HAGERUP, 1932). Em *Tragopogon*, diferenças de habitats também são encontradas entre os parentais diploides e os alotetraploides. Os parentais *T. dubius*, *T. pratensis* e *T. porrifolius* ocorrem preferencialmente em regiões secas,

alagadas e sombreadas, respectivamente. Já os alotetraploides *T. miscellus* e *T. mirus* não apresentam restrições de habitats, possuindo uma ampla distribuição (SOLTIS et al., 1995). A incidência de luz solar também é um dos parâmetros para a segregação de citótipos. Em *Deschampsia caespitosa*, os tetraploides ocorrem em habitats abertos com alta incidência de luz solar, e os diploides são encontrados em áreas de florestas (ROTHERA e DAVY, 1986). Padrão similar também é observado em *Dactylis glomerata* (LUMARET et al., 1987). Estes exemplos deixam claro como as diferenças ecológicas podem influenciar na distribuição de citótipos poliploides e contribuir, em longo prazo, para a diversificação das espécies.

Geralmente, os poliploides apresentam distribuição mais ampla, abrangendo diferentes ambientes, ao passo que os diploides são mais restritos. De acordo com Levin (2002) a expansão de poliploides ocorre principalmente a partir da periferia em busca de novos habitats. Os citótipos podem ser localizados em regiões geográficas distantes, havendo um isolamento reprodutivo entre os indivíduos (alopatria), ou habitarem regiões próximas (parapatría) ou ainda, dividirem o mesmo ambiente, sendo simpátricos (neste caso deve haver algum isolamento ecológico entre eles. Em casos de simpatria e parapatría, há a possibilidade de ocorrer fluxo gênico entre os citótipos e a criação de uma zona híbrida (LEVIN, 2002). Nestes locais são encontrados indivíduos com níveis de ploidia intermediários, como triploides, por exemplo, (normalmente originados de cruzamentos entre 2x e 4x). Em *Galax urceolata*, indivíduos diploides são encontrados, principalmente, ao norte das montanhas Blue Ridge (nordeste dos EUA) enquanto os tetraploides localizam-se preferencialmente ao sul (BURTON e HUSBAND, 1999). Adicionalmente, indivíduos triploides desta espécie também são encontrados em locais intermediários, ou seja, zonas de contato entre os citótipos (BURTON e HUSBAND, 1999). De acordo com Levin (2002), casos de simpatria são mais frequentes. Dentre os exemplos de populações com miscigenação de citótipos podemos citar *Dalea formosa* (SPELLENBERG, 1981), *Atriplex canescens* (SANDERSON e STUTZ, 1994), *Solidago altissima* (HALVERSON et al., 2008), *Dactylorhiza maculata* (STÅHLBERG, 2009) e *Vicia cracca* (TRÁVNÍČEK et al., 2010). Com relação à alopatria, espécies poliploides podem ser separadas dos parentais diploides por centenas ou milhares de anos como no caso da espécie *Nymphoides indica*. Os espécimes 2x são encontrados no Velho Mundo enquanto os 4x localizam-se nas Américas (ORNDUFF, 1970).

Com relação à distribuição global de poliploides, estudos demonstram que regiões de altas latitudes e altitudes possuem grande número de espécies poliploides (HAGERUP, 1927; STEBBINS, 1950; OTTO e WHITTON, 2000; LEVIN, 2002; BROCHMANN et al., 2004). Os autores sugerem que áreas inóspitas e com climas severos, como as regiões árticas, sejam preferencialmente habitadas por indivíduos com alta variabilidade genética e plasticidade genômica e fenotípica, que os tornam capazes de adaptar às condições rigorosas (STEBBINS, 1950; LÖVE e LÖVE, 1957). Um bom exemplo pode ser visto em *Dupontia*, um gênero exclusivamente da flora ártica que possui na sua história evolutiva vários eventos de hibridação e duplicação genômica envolvendo os gêneros *Arctophila* e *Poa*, (BROCHMANN et al., 2004). *Dupontia* apresenta indivíduos 6x, 9x, 12x, 15x e 18x com $2n=42$, $2n=44$, $2n=84$, $2n=88$, $2n=126$ e $2n=132$ cromossomos, que são encontrados na América do Norte, Rússia e Svalbard (território norueguês) (BRYSTING et al., 2004).

Além disso, a frequência de poliploides também é superior em regiões que passaram por eventos de glaciações e catástrofes ecológicas (FAWCETT et al., 2009; VAN de PEER et al., 2009). Stebbins (1984) observou que áreas previamente glaciadas possuem grande quantidade de poliploides, enquanto áreas que não passaram por processo de glaciação, embora apresente latitude superior (como acontece na região nordeste do Alasca), apresentam menor incidência de poliploidia. Assim, uma correlação entre glaciação e poliploidia foi estabelecida. Brochmann et al., (2004) estudando a flora ártica constataram que, nas regiões da Beríngia (antiga “ponte” que conectava o Alasca à Sibéria) não glaciadas, a frequência de diploides é superior (26%) às regiões atlânticas que passaram por glaciações (apenas 10%). Além disso, a incidência de poliploides na região atlântica é consideravelmente superior (87%) à frequência de poliploides na Beríngia (BROCHMANN et al., 2004). Estes resultados reforçam a proposta de Stebbins (1984). Ciclos de glaciação também são propostos para explicar a diversificação e riqueza de espécies do gênero *Draba* (Brassicaceae) (JORDON-THADEN e KOCH, 2008) e em *Townsendia hookeri* (Asteraceae), nos quais os poliploides desta espécie são encontrados em áreas glaciadas, enquanto diploides são confinados a áreas não glaciadas (THOMPSON e WHITTON, 2006). Além disso, Stebbins (1984) também observou que a incidência de poliploidização em regiões insulares é superior, quando

comparada às regiões continentais, mesmo quando ambas as regiões estão localizadas na mesma latitude.

Adicionalmente, eventos catastróficos, como impactos de asteroides na Terra e o aumento das atividades vulcânicas ocorridas no Cretáceo-terciário (K-T), que causaram extinções em massa de animais e plantas, também contribuíram para o estabelecimento de linhagens poliploides (FAWCETT et al., 2009). As linhagens de plantas que passaram por no mínimo uma duplicação genômica neste período, foram capazes de suportar a grande mudança climática e originaram importantes famílias de angiospermas (Poaceae, Asteraceae, Solanaceae e Fabaceae) (FAWCETT et al., 2009). Assim, os autores sugerem que, paradoxalmente, os eventos catastróficos que culminaram com a grande extinção de espécies no período do Cretáceo-terciário levaram ao surgimento de inovações e plantas mais complexas, por meio da seleção de indivíduos potencialmente mais adaptados às mudanças dos ambientes, como os poliploides, contribuindo assim, para a diversificação da flora (FAWCETT et al., 2009; FAWCETT, VAN de PEER e MAERE, 2013).

1.3.3 CONSEQUÊNCIAS MOLECULARES DA POLIPLOIDIA

Como previamente relatado, o potencial adaptativo observado em poliploides deve-se às inúmeras alterações nucleares ocorridas pós-duplicação genômica, que acabam por resultar em maior plasticidade fenotípica. Estudos em poliploides naturais recém-formados (como *Brassica*, *Arabidopsis*, *Tragopogon*, *Triticum*, *Nicotiana*, *Glycine* e *Gossypium*) e sintéticos possibilitam investigar as mudanças imediatas após a poliploidia e entender a dinâmica da reestruturação dos genomas (WENDEL, 2000; KASHKUSH et al., 2003; COMAI, 2005; JACKSON e CHEN, 2010).

Dentre as modificações genômicas ocorridas em curto prazo, as mutações do tipo *indels*, sobretudo as eliminações de sequências, são as alterações mais comuns. Em *Tragopogon mirus*, por exemplo, deleções de sequências são frequentemente observadas em poliploides de diferentes origens (KOH, SOLTIS e SOLTIS, 2010). Em autotetraploides de *Phlox drummondii*, a duplicação

cromossômica foi acompanhada de perdas de DNA (17%) logo na primeira geração e atingiu uma redução de 25% do genoma nas duas gerações seguintes, com um decréscimo da quantidade de DNA em todos os cromossomos do complemento haploide (RAINA et al., 1994). De acordo com Raina et al. (1994) as eliminações de DNA nesta espécie foi um processo adaptativo que auxiliou no estabelecimento dos tetraploides, uma vez que a diminuição da quantidade foi acompanhada de um aumento na produção final de sementes (cerca de 30%). Em *Brassica napus*, poliploides sintéticos (recém-formados) e naturais (originados há mais tempo) apresentam diferença de até 60% no conteúdo de DNA (VERMA e REES, 1974). O mapeamento dos genes ribossomais 28S e 5S (marcadores citogenéticos importantes) também evidencia reduções significativas de DNA. Em diversas espécies, há diminuição dos *loci* ribossomais após a poliploidização (CLARKSON et al., 2005; VAIO et al., 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007; MLINAREC et al., 2011). Vários estudos demonstram que as eliminações de sequências em poliploides são constantes ao longo das gerações (GRANT, 1969; BOYKO et al., 1984; OZKAN, TUNA e ARUMUGANATHAN, 2003; LEITCH e BENNETT, 2004; HAN et al., 2005) sendo um processo natural e contínuo que auxilia na homogeneização genômica e contribui para o processo de diploidização (LEITCH e BENNETT, 2004).

Embora menos frequentes, acréscimos de quantidade de DNA após a poliploidia também podem ocorrer. Em *Nicotiana rustica* e *N. tabacum*, por exemplo, houve um aumento de 2% no tamanho do genoma após a poliploidia (NARAYAN, 1998). Dentre os mecanismos capazes de aumentar o tamanho do genoma, a ativação de elementos móveis constitui o principal fator de expansão genômica. Em indivíduos poliploides e em híbridos, estudos sugerem que a ativação e o acúmulo de transposons estão associados à rápida modificação na estrutura genômica e epigenética, contribuindo para a reestruturação do genoma e estabelecimento dos indivíduos (KASHKUSH et al., 2002, 2003; de BOER et al., 2007; PETIT et al., 2007; HU et al., 2010; PETIT et al., 2010). Segundo McClintock (1984), a atividade dos elementos transponíveis aumenta a chance de ocorrência de rearranjos cromossômicos estruturais, o que pode auxiliar na divergência de subgenomas em alopoliploides e contribuir para a restauração do comportamento dissômico. As inversões e translocações, apesar de não alterarem a quantidade de material genético também constituem alterações relevantes e refletem a reorganização

genômica após a duplicação. Um dos exemplos de ocorrência de translocações entre genomas de alopoliploides recém-formados pode ser visto em alopoliploides de *Tragopogon* (CHESTER et al., 2011).

Mudanças nos perfis epigenéticos (como metilação de DNA e modificações de grupos químicos em caudas de histonas), mecanismos cruciais na expressão gênica, também são recorrentes em poliploides (LUKENS et al., 2006; WANG et al., 2006). Em alopoliploides de trigo foram encontradas alterações no padrão de metilação de citosinas em regiões de DNA repetitivo na geração F1 (SHAKED et al., 2001). Em *Oryza*, indivíduos híbridos também apresentaram aumento de metilação de DNA, se comparado aos genomas parentais (XIONG et al., 1999). Em *Brassica napus*, mudanças no perfil de metilação foram observadas logo na primeira geração de poliploides, e este padrão manteve-se constante até a sexta geração, embora algumas reversões e novas metilações tenham surgido em alguns descendentes (GAETA et al., 2007). Em *Glycine*, a avaliação do transcriptoma de folhas de tetraploides mostrou-se cerca de 70% inferior quando comparado aos progenitores diploides, sugerindo silenciamento gênico após a poliploidia (COATE e DOYLE, 2010).

A dinâmica dos genomas de poliploides recém-formados (incluindo todas estas modificações) denominada de “choque genômico”, contribui para a reorganização nuclear e auxilia na retomada do comportamento dissômico, condição favorável à reprodução e perpetuação das espécies (DODSWORTH, CHASE e LEITCH, 2015). Dentre os neopoliploides naturais e que, possivelmente, estão passando por mecanismos de reestruturação genômica pós-poliploidia podemos citar: *Turnera sidoides*, Turneraceae (KOVALSKY e NEFFA, 2012); *Andropogon gerardii*, Poaceae (KEELER e DAVIS, 1999); *Paspalum quadrifarium*, Poaceae (SPERANZA, VAIO e MAZZELLA, 2003); *Senecio carniolicus*, Asteraceae, (SUDA et al., 2007); *Solidago altissima*, Asteraceae (HALVERSON, et al., 2008); *Medicago sativa*, Fabaceae (HAVANANDA, BRUMMER e DOYLE 2011); *Phragmites australis*, Poaceae (NAKAGAWA, OHKAWA e KANEKO, 2013); *Tragopogon mirus*, Asteraceae (SOLTIS et al., 1995) e *Lippia alba*, Verbenaceae, recentemente descrito (REIS et al., 2014), dentre outras espécies.

1.4 *Lippia alba* - UM MODELO PARA ESTUDOS DE POLIPLOIDES TROPICAIS

1.4.1 PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM *Lippia alba*

O gênero *Lippia*, um dos maiores gêneros pertencente à família Verbenaceae está inserido na tribo Lantaneae Endler e reúne cerca de 100 taxa organizados em sete seções. As espécies apresentam diferentes portes e hábitos, e podem ser encontradas nas formas de ervas, arbustos e pequenas árvores, com ampla distribuição nas regiões tropicais da América e África, sendo Brasil e México os centros de diversidade do grupo (O'LEARY et al., 2012).

Dentre as espécies de *Lippia*, destaca-se *L. alba*, um arbusto aromático bastante utilizado na medicina popular. Conhecida regionalmente como erva cidreira, dentre outras nomenclaturas populares, a espécie destaca-se por apresentar inúmeras atividades farmacológicas e ser empregada rotineiramente como paliativo de diversos distúrbios humanos, sendo a sua ação sedativa a mais utilizada (HENEHELLE et al., 2008; MESA-ARANGO et al., 2009; RICCIARDI et al., 2009; JANNUZZI et al., 2010; TELES et al., 2012). As propriedades medicinais encontradas em *L. alba* devem-se aos variados compostos químicos encontrados em seus órgãos vegetativos (HENEHELLE et al., 2008; MESA-ARANGO et al., 2009; RICCIARDI et al., 2009; JANNUZZI et al., 2010; TELES et al., 2012). Os constituintes químicos prevalentes na espécie são: linalol, citral (netral e geraniol), limoneno, carvona, cariofileno, β -mirceno, canfora, 1-8cineol, germacreno e α -fenchono (SCHOCKEN, 2007). Um estudo recente, realizado com 37 acessos mantidos sob as mesmas condições ambientais revelou a existência de uma possível relação entre nível de ploidia e componente majoritário do óleo essencial (citral, linalol ou carvona) (VICCINI et al., 2014). Uma vez que a produção química envolve complexas interações entre o ambiente e o genótipo, estudos que eliminem as variáveis ambientais são de grande importância para o entendimento dos mecanismos genéticos relacionados à produção química dos indivíduos. Assim, visto que a produção majoritária dos constituintes químicos e as atividades farmacológicas estão atreladas à constituição genética, o uso medicinal

indiscriminado da espécie, sem conhecimento de sua procedência, torna-se comprometedor. Portanto, estudos que visem caracterizar fitoquimicamente e geneticamente *L. alba* são de grande relevância para a sociedade.

Adicionalmente às variações químicas, *L. alba* também apresenta ampla instabilidade morfológica (TORRES e LOPEZ, 2007). A corola pode apresentar flores brancas, rosas ou violáceas. A filotaxia pode ser oposta (encontrada na maioria dos indivíduos) ou verticilada, com 4, 6 ou 8 folhas por nó (incomum no gênero *Lippia*) (MOLDENKE, 1965; MÚLGURA de ROMERO et al., 2003; VALE, 2010). Além disso, diferenças significativas na morfologia e nas dimensões da lâmina foliar também são frequentemente encontradas, assim como diferenças no tipo de tricoma e sua densidade no limbo foliar. Além disso, o porte e o hábito das plantas são variáveis, mesmo quando os indivíduos estão submetidos às condições ambientais idênticas (VALE, 2010).

Assim, tendo em vista a ampla variação fenotípica de *L. alba*, estudos que auxiliem na caracterização e contribuem para a identificação da espécie são de extrema importância. Neste contexto, as investigações genômicas e citogenéticas permitem o conhecimento mais refinado sobre os diferentes genótipos e auxiliam no entendimento dessa heterogeneidade fenotípica observada em *L. alba*.

1.4.2. O COMPLEXO POLIPLÓIDE *Lippia alba*

O primeiro relato sobre número cromossômico em *L. alba* data de 1960 quando Bose e Choudhy a descreveram como sendo uma espécie diploide* com $2n=30$ cromossomos (BOSE e CHOUDHURY, 1960). No entanto, mais recentemente, Pierre et al., (2011) avaliando a citogenética de indivíduos coletados em diferentes regiões, encontraram números cromossômicos até então desconhecidos para a espécie. Os novos acessos possuíam $2n=60$ cromossomos (consistindo de um poliploide) e o outro indivíduo apresentava uma variação cariotípica de $2n=12$ a $2n=60$ cromossomos, consistindo de um indivíduo mixoploide (PIERRE, 2008; 2011). Este foi o primeiro indício de ocorrência de poliploidia na espécie e formação de citótipos. A partir de então, foram realizadas diversas

* A fim de padronizar a nomenclatura dos citótipos descobertos recentemente, os acessos com trinta cromossomos foram tratados como diploides e os níveis de ploidia dos indivíduos que possuem número cromossômico superior a 30 tiveram tais indivíduos como referência (Reis et al., 2014).

abordagens citogenéticas mais aprimoradas, em vários acessos, visando uma caracterização mais refinada do cariótipo (SOUSA et al., 2009).

Dentre as abordagens citogenéticas mais utilizadas na caracterização de cromossomos de *L. alba*, destacam-se os bandeamentos e a técnica de FISH utilizando sequências 5S e 18S. A princípio, os estudos sobre a heterocromatina se restringiram a indivíduos com 30 e 60 cromossomos. As técnicas utilizadas para a descrição cariotípica foram o bandeamento DAPI/CMA, a impregnação com nitrato de prata e a hibridização fluorescente *in situ* (PIERRE, 2004; BRANDÃO et al., 2007; PIERRE, 2008; SOUSA et al., 2009). Os estudos revelaram um perfil heterocromático similar para ambos os citótipos, com regiões ricas em guanina e citosina (PIERRE 2008; SOUSA et al., 2009). Além disso, o bandeamento Ag-NOR mostrou um número máximo de quatro nucléolos em núcleos interfásicos em acessos com 30 cromossomos (SOUSA et al., 2009). Com relação aos genes ribossomais 18S e 5S, a princípio, a FISH revelou 6 sítios correspondentes aos genes ribossomais 18S e 2 sítios para a região 5S em acessos diploides (BRANDÃO et al., 2007). O indivíduo com 60 cromossomos, apresentou 10 sítios de DNAr 18S (PIERRE, 2008). Adicionalmente, variações na morfologia cromossômica também foram observadas entre e dentro os citótipos (PIERRE 2004; BRANDÃO et al., 2007; SOUSA et al., 2009). Estes trabalhos demonstraram que, além da ampla variação fenotípica, grande plasticidade genômica também pode ser observada entre os indivíduos de *L. alba*.

Assim, visando expandir as informações cariotípicas e descobrir a extensão da variação intraespecífica em *L. alba*, estudos genômicos, cariotípicos, químicos, morfológicos e proteômicos têm sido realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF envolvendo um número superior de acessos providos das cinco regiões do Brasil. Recentemente, estimativas do conteúdo de DNA por meio de citometria de fluxo e análises citogenéticas foram realizadas para 106 acessos de *L. alba*, provenientes de 14 estados brasileiros (REIS et al., 2014). As análises indicaram uma ampla variação no conteúdo 1C (de 1,31 a 3,45 pg de DNA), e a presença de cinco grupos cromossômicos. Os resultados revelaram três números cromossômicos inéditos para a espécie, sugerindo a formação natural de um complexo poliploide, com indivíduos diploides ($2n=30$), aneuploide ($2n=38$), triploides ($2n=45$), tetraploides ($2n=60$) e hexaploide ($2n=90$) (REIS et al., 2014). Além disso, os autores realizaram o mapeamento dos

genes ribossomais (18S e 5S) e a análise do comportamento meiótico e da viabilidade polínica em representantes dos cinco citótipos. Os resultados revelaram uma grande variação genômica, com alterações cromossômicas numéricas e estruturais durante a evolução cariotípica da espécie. Com base nos resultados obtidos, foi proposta uma hipótese para a formação do complexo poliploide, por meio de eventos de poliploidia e cruzamentos entre citótipos envolvendo gametas não reduzidos e desbalanceados (REIS et al., 2014).

Os dados mais recentes reforçam, mais uma vez, a grande variação intraespecífica em *L. alba*, e justificam a expansão de análises para mais acessos do complexo, com a utilização de técnicas mais refinadas que visam elucidar questões sobre a estabilidade e dinâmica do genoma de *L. alba*.

1.5 JUSTIFICATIVA

Lippia alba tem sido descrita como uma espécie variável e bastante plástica, do ponto de vista fenotípico, genômico e citogenético. Esta notável plasticidade pode ser comprovada pelas diversas fórmulas cariotípicas descritas e pela instabilidade genômica, observada durante a microsporogênese de vários acessos (SOUSA et al., 2009; PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014; 2016; VICCINI et al., 2014). Assim, tendo em vista esta ampla variação, faz-se necessária uma caracterização citogenética mais refinada e direcionada à espécie, a fim de contribuir para entender a extensão das variações intraespecíficas em *L. alba* e a origem do complexo poliploide.

Neste sentido, a fim de descrever perfis cariotípicos mais específicos de *L. alba* e compará-los entre os diferentes acessos, bem como obter uma visão global sobre a instabilidade e dinâmica de genomas diploides e poliploides, foi proposto neste trabalho o desenvolvimento de novos marcadores citogenéticos específicos para a espécie, e a validação e padronização de um protocolo de FISH eficiente para o mapeamento cromossômico em acessos abrangendo os cinco níveis de ploidia encontrados no complexo. Estes dados permitem obter uma perspectiva sobre a organização de sequências repetitivas no genoma de *L. alba* bem como contribuem para entender o comportamento de diferentes repetições e sua dinâmica em genomas poliploides.

Além disso, o presente trabalho visou incrementar os dados sobre a produção de gametas e viabilidade polínica contribuindo para entender a formação do complexo poliploide por meio de cruzamentos entre os citótipos. Em conjunto, os resultados contribuem para um melhor entendimento sobre a origem dos citótipos de *L. alba* e auxiliam os estudos sobre a dinâmica e reorganização de sequências repetitivas em genomas poliploides recém-duplicados.

CAPÍTULO 1

2 SEQUENCIAMENTO PARALELO EM MASSA E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES CROMOSSÔMICOS ESPÉCIE-ESPECÍFICOS PARA *L. alba*

2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 15 anos a genômica vegetal foi marcada por um expressivo progresso. Até então, os projetos de sequenciamento genômico eram caros e laboriosos. A primeira espécie de planta que teve seu genoma totalmente sequenciado foi *Arabidopsis thaliana*, com o projeto *The Arabidopsis Genome Initiative (AGI)* iniciado em 1996 e concluído em dezembro de 2000 (BEVAN, 1997). O genoma foi montado a partir de BACs, e consistiu em 115,4 milhões de nucleotídeos organizados. O sequenciamento de *A. thaliana* (terceiro genoma de um organismo eucarioto a ser desvendado) foi um marco para a genômica vegetal, e abriu portas para o sequenciamento de outras espécies como *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa* e *Vitis vinífera* dentre outras (MICHAEL e JACKSON, 2013). A princípio, os critérios para a seleção de espécies a terem o seu genoma sequenciado eram baseados em tamanho do genoma e ploidia (diploides); disponibilidade de linhagens puras (com baixa heterozigosidade); acesso aos mapas genéticos e físicos; e espécies modelos ou de importância econômica (MICHAEL e JACKSON, 2013).

Entretanto, nos últimos anos, este cenário tem se modificado, havendo um crescente e gradual aumento de dados genômicos para espécies silvestres (sem genoma de referência) (CHESTER et al., 2011; BUGGS et al., 2012; EMADZADE et al., 2014). As novas plataformas de sequenciadores têm possibilitado o acesso a sequências genômicas pouco estudadas, em tempo hábil e custo acessível (STRAUB, et al., 2012). As análises, além de contribuir para o entendimento sobre a estrutura e função dos genomas, também possibilitam comparações entre taxa (FLAGEL e BLACKMAN, 2012). A disponibilidade de informações genômicas de

diferentes espécies tornou possível estabelecer relações de parentesco e ancestralidade por meio de sintonias, além de auxiliar na identificação de eventos de poliploidia ocorridos há milhares de anos (em paleopoliploides) (FLAGEL e BLACKMAN, 2012). Adicionalmente, o sequenciamento genômico aliado ao mapeamento físico de regiões genômicas específicas, por meio da FISH, permite localizar as sequências de interesse ao longo dos cromossomos, viabilizando discussões sobre a organização e a dinâmica dos genomas, principalmente em poliploides (CHESTER et al., 2011; TORRES et al., 2011; BUGGS et al., 2012; CHESTER et al., 2013; MAVRODIEV et al., 2015). Na citogenética vegetal, a maioria dos estudos de caracterização e mapeamento cromossômico utilizando a técnica de FISH, se restringe às sondas universais (como o DNAr 28S e 5S, e às regiões teloméricas), sendo raros os estudos com sondas espécie-específicas.

No complexo poliploide *L. alba*, a identificação e o mapeamento do DNAr revelaram variações numérica e de distribuição dos sítios nos diferentes citótipos, sugerindo a ocorrência de rearranjos cromossômicos ao longo da evolução cariotípica (REIS et al., 2014). Os dados obtidos pela FISH incrementam as descrições cariotípicas e respaldam uma hipótese inicial de autopoliploidia na espécie. No entanto, mais estudos utilizando diferentes marcadores cromossômicos e envolvendo um número superior de acessos são necessários, a fim de se obter dados genômicos mais apurados e específicos para *L. alba*.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de marcadores cromossômicos específicos para *L. alba* a partir do sequenciamento genômico da espécie. Adicionalmente, a eficiência do método e a aplicação das sondas obtidas em cinco acessos são discutidos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visou testar a eficiência do método de construção de sondas de FISH específicas para *L. alba* a partir de sequências repetitivas obtidas pelo sequenciamento paralelo em massa, e sua respectiva validação por meio de hibridização fluorescente *in situ* em acessos representando os cinco níveis de ploidia encontrados no complexo *L. alba*.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar famílias de repetições específicas no genoma de *L. alba* por meio de sequenciamento de baixa cobertura utilizando ferramentas de bioinformática;
- Construir sondas provenientes de repetições encontradas e padronizar o protocolo de Hibridização Fluorescente *in situ* utilizando novos marcadores citogenéticos específicos para *L. alba*.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os acessos de *L. alba* estudados foram mantidos no campo experimental da UFJF e tombados no Herbário CESJ da UFJF conforme as técnicas usuais (Apêndice A). Para o sequenciamento genômico de *L. alba* (Figura 1), foi escolhido um acesso diploide ($2n=30$) que apresenta índice de comportamento meiótico regular. O acesso BGEN-29 (CESJ: 48466) foi mantido em vaso plástico de 10L contendo mistura solo:Plantmax®:areia na proporção 2:1:1 e cultivado em casa de vegetação na Estação Experimental de Plantas/ICB/UFJF à 28°C com fotoperíodo natural e 15 min de irrigação diária por aspersão.

Para as análises citogenéticas, estacas provenientes de plantas mantidas no campo foram coletadas no período matinal e imediatamente transferidas para o sistema de hidroponia, mantido no Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF.



Figura 1: *Lippia alba*. (a) ramo contendo folhas e flores; (b) detalhe da inflorescência.

2.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para a extração do DNA foi utilizado o método de CTAB (DOYLE e DOYLE,1990) com algumas modificações. Aproximadamente 10-20g de folhas jovens e frescas do acesso BGEN-29 foram coletadas em casa de vegetação e imediatamente submetidas ao congelamento com nitrogênio líquido. O tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido, transferido para microtubos de 2mL sendo imediatamente adicionado 1mL de tampão CTAB em cada amostra. As amostras foram incubadas a 65°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado ao microtubo 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e este foi centrifugado durante 10 min a 14680 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foi adicionado 8% do volume de acetato de amônio (7,5M) e 54% do volume de isopropanol gelado. As amostras foram homogeneizadas por inversão e estocadas por 30 min a -20°C. Decorrido o período de precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14680 rpm para a formação de um *pellet* de DNA. O sobrenadante foi descartado e então, as amostras foram lavadas em uma série crescente de etanol (70% e 95% gelado) e centrifugadas por 10 min. Ao final, o *pellet* de DNA resultante foi seco overnight e ressuspendido em 100µL de água ultrapura.

Para a verificação da qualidade e da quantidade de DNA das amostras, as mesmas foram analisadas em espectrofotômetro nanométrico (Nanodrop™) e em gel de agarose 1%.

2.3.3 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE *L. alba*

O DNA genômico do acesso BGEN-29 foi sequenciado no *Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida*, EUA. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq utilizando uma biblioteca *shotgun*. O software Trimmomatic foi utilizado para a remoção de sequências de baixa qualidade. Dezesesseis milhões de sequências de alta qualidade foram montadas por meio do programa SeqPrep. O aplicativo Blastn (1×10⁻¹⁵) foi utilizado para a

identificação e posterior retirada de sequências de origem mitocondrial e plastidial, restando apenas DNA nuclear. As sequências remanescentes foram analisadas na plataforma *RepetExplore* a fim de se localizar as sequências repetitivas em potencial para as hibridizações. Gráficos globulares ilustrando cada motivo de repetição foram construídos a partir do software *SeqGrapheR* (NOVAK, NEUMANN e MACAS, 2010).

2.3.4 CONSTRUÇÃO DAS SONDAS PARA FISH

As sondas foram produzidas a partir de oligos de DNA fita simples (Huntsville, AL, USA). Os oligos foram ressuspensos em água ultrapura, de acordo com as manufaturas do fabricante, sendo novamente diluídos para concentração de uso (200ng/μL). Em seguida, os oligos complementares foram submetidos à temperatura de 100°C por 5 min em um béquer contendo 1L de água para a formação de DNA dupla-fita. O DNA foi marcado por reação de *nick-translation* (Tabela 1) durante 2h à 15°C.

Tabela 1: Solução para reação de nick-translation.

Reagentes	Volume (μL)
DNA (5μg)	25
Tampão nick translation	5
Dntp mix (2mM cada)	5
Dutp marcado com Texas-red	1
água	6,75
DNA Pol I (10U/μL)	6,25
DNase	1
Vol. final	50

2.3.5 CONFECÇÃO DE LÂMINAS PARA A HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *in situ*

Meristemas radiculares emitidos pelo procedimento de estaquia foram imediatamente submetidos ao pré-tratamento com o bloqueador do fuso mitótico 8-hidroxi-quiloneína (HQ) 3 mM por 9 horas a 4°C. Decorrido o período de bloqueio, as raízes foram lavadas em água purificada, devidamente fixadas em etanol e ácido acético (3:1) e então armazenadas à -20°C por no mínimo 24 horas.

Para a remoção da parede celular, as raízes foram tratadas com solução enzimática Pectinase (Sigma) e Celulase (Serva-Onozuka R-10) nas concentrações de 20% e 2%, respectivamente, por cerca de 5 horas a 37°C. As lâminas foram confeccionadas a partir da técnica de dissociação celular com secagem ao ar (CARVALHO, 1993; 1997).

2.3.6 MORFOMETRIA CROMOSSÔMICA

Para a confecção dos kariogramas e análises da morfometria cromossômica, os cromossomos foram medidos com o auxílio do software *CellSens* após a digitalização das imagens obtidas via câmera Olympus DP72 em microscópio Olympus BX51. Foram realizadas medidas dos braços curtos (BC) e braços longos (BL), bem como o cálculo da razão entre braços cromossômicos de acordo com a fórmula: $r = BL/BC$. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964) em metacêntricos (m) e submetacêntricos (sm). Adicionalmente, foi calculado o índice de heterogeneidade cromossômica (A_i) de acordo com a expressão: $A_i = (BL-BC) / (BL+BC)$ como proposto por Watanabe et al. (1999).

2.3.7 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* (FISH)

A técnica de FISH foi realizada de acordo com Kato (2011). A mistura de hibridização contendo o tampão 2xSSC/1xTE, esperma de salmão e a sonda (Tabela 2) foi desnaturada durante 5 min a 99°C e imediatamente imersa em gelo. As lâminas foram desnaturadas com 30µL de esperma de salmão (140µg/µL) durante 3 min a 80°C. Após as etapas de desnaturação, a mistura de hibridização foi aplicada nas regiões de interesse das lâminas e a hibridização ocorreu *overnight* por cerca de 16h à 55°C.

No segundo dia do processo de hibridização, foram realizados os banhos de estringência. As lâminas foram lavadas em solução tampão 2xSSC à temperatura ambiente por 5 min. e à 55°C durante 10 min. Por fim, as lâminas foram montadas em DAPI contendo Vectashield e seladas com lamínulas e esmalte incolor.

A visualização dos sinais foi realizada em microscopia de fluorescência Olympus BX51. Aproximadamente de dez a 20 metáfases foram avaliadas para cada indivíduo.

Figuras representativas foram pseudocoloridas com auxílio de software de edição de imagens.

Tabela 2: Solução de hibridização.

Reagentes	Volume/lâmina
1xTE + 2x SSC buffer	8 µL
DNA de esperma de salmão (140ng/µL)	10 µL
Sonda	2 µL
Total	20 µL

2.4 RESULTADOS

2.4.1 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE *L. alba*

O sequenciamento genômico de *L. alba* produziu 29 milhões de *reads paired-end*. Um conjunto final de 4Gbp de dados foi obtido ao final das etapas de refinamento das sequências, o que equivale a aproximadamente a uma cobertura de 2,9 vezes o genoma de *L. alba*.

O software *RepeatExplorer* em conjunto com o *SeqGrpHeR* permitiu a identificação de 132 possíveis sequências repetitivas, de diferentes classes de repetições tais como: elementos transponíveis, sequências de DNAr e DNA satélites, que correspondem a 44,4% do genoma de *L. alba*. Inicialmente, cinco sequências candidatas mostraram gráficos com características globulares densas, compatíveis à ocorrência de repetições *in tandem* propícias à hibridização *in situ* (Figura 2). As repetições obtidas foram denominadas CL66 (com 168 pb compondo cada repetição); CL74 (com 471 pb em cada repetição); CL90 (possuindo 179 pb em cada repetição); CL98 (com 179 pb em cada repetição) e CL110 (com 18 pb em cada motivo de repetição) (Tabela 3).

Tabela 3: Sequências satélite específicas de *Lippia alba* obtidas por meio do sequenciamento genômico de baixa cobertura.

Repetições	Motivo de repetição
CL66	ATGGATTTTAAAAATTTTCAAAAAATTAATAAAATGATAGGCTATAGCCTAGGGA TTTCGACAAAATTCGGCAATTTTTGTTTTATGAGTAATTTTGCTAATAAATTGGTC CTTTTCATATTTCTTAATGTTCACTTTGTTGGGAATGGTTGATATGATTGTT
CL74	CCTCCGCATTCTGGCCCACCTTTTTCCGGCGACCCGCCAGCCCTGAGATTTTCAT TTATTTTTTCTACATTTTCGACCACCACCGGATTAGCGACCGCACAGGAGCGGG GCCCGCCTAGCCTCTTTTTGCATAAAAGTGGTTCGCAGGGGGCTTAAACGTCCG ATTTCCGGCCTGGAAAATCTGGCGCAATGGGCGTTGCCAATTGCGCGCGGCGTG GGCCCCGAGGAGAGCTTCGCGTGCATGCTGCTGGCCGCGTGGCGGCGTAC GGATCGGAAGTTATGCTCGTTCGAAGTTTATGGGCTACCGCGAGACGACTCC GGATCGCATAAATGGATTTTCGCGCGCACAACTAACGGGTGCGATCATAACCAGC ACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGAAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAG TAGTACTAGGATGGGTGACCCCTGGGAAGTCTCGTGTGCA
CL90	AGTTTTGGAGCTCATCAAGAAATTGGAAAAATCTCTAGGCAGCTGCCTAGAACTT CTGGCCAAAATTTGATAACTAGTATTCTGCAAGTATTTCTGCGAATAAGCTACAC CTATCCACTCATTTTCCATACATATTAATGTCAAACCTTAGTTTCTGCAGCCATGA TTCAATTTTCACG
CL98	TTTGAATTTTTAGAAAAATTTTAAAATCCATGAAAATCGTATCAACCATTCCCCA ACAAAGTATGAACATTAAGAAATATGAATAACGAGTAGATACGACCAATTTATTAG CAAACTACTCATTAAAGCAAAAATGCCGAATTTTATCGAAATCCCTAGGCTATA GCCCATCAATT
CL110	ATACCACTACCAATACCA

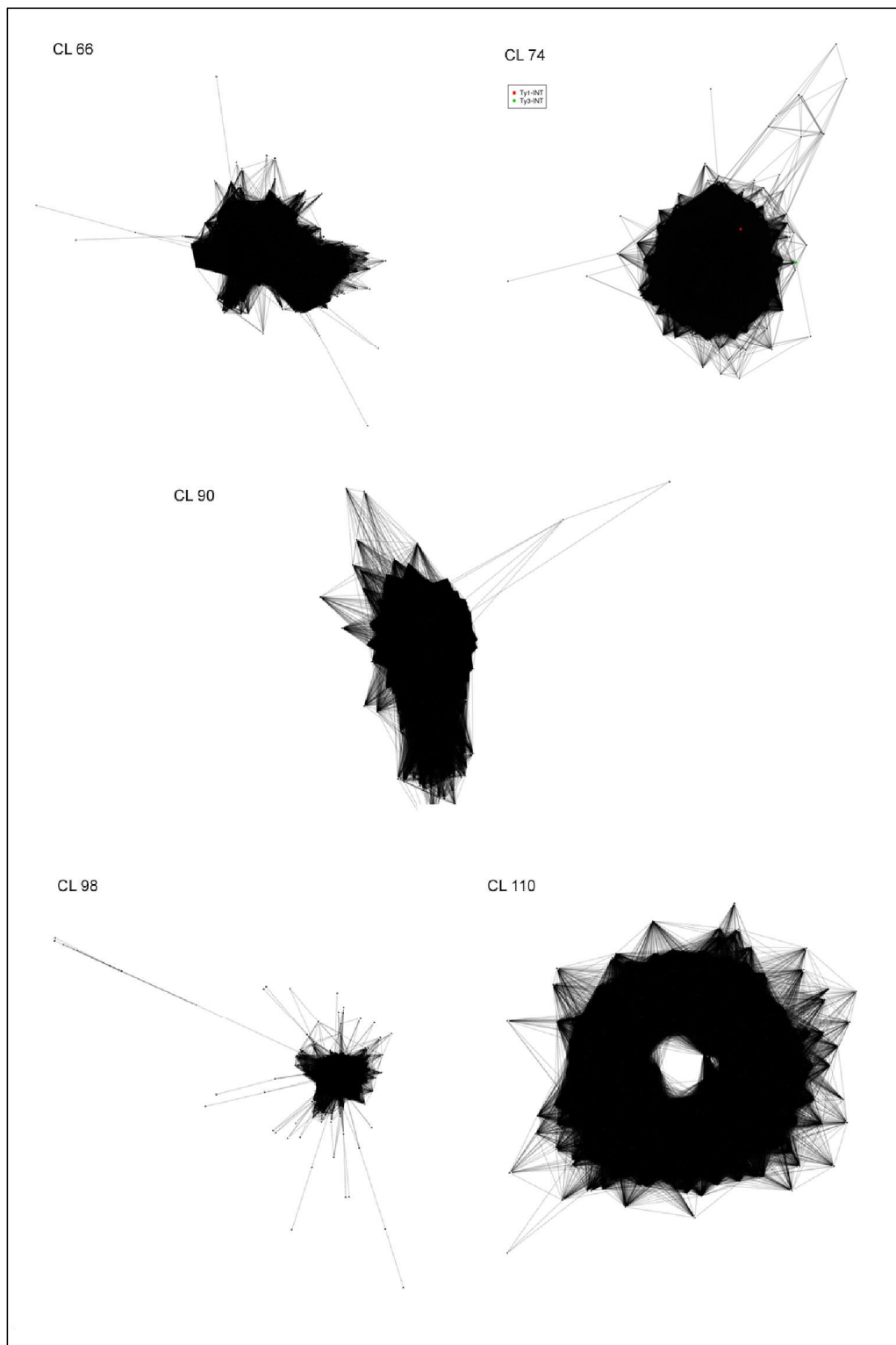


Figura 2: Figuras ilustrativas geradas a partir do software *SeqGraper* representando cinco famílias de repetições em *Lippia alba* identificadas após o sequenciamento genômico de baixa cobertura.

2.4.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* (FISH)

Os resultados obtidos a partir das hibridizações revelaram que das cinco sondas testadas, apenas uma (CL90) não apresentou marcação. A sonda CL74 revelou dois sítios subterminais em dois cromossomos homólogos, enquanto a sonda CL110 apresentou um padrão de marcação disperso no genoma. Já as hibridizações das sequências de DNA satélite CL66 e CL98 ocorreram em sítios específicos do genoma de *L. alba*, apresentando uma distribuição não randômica, localizada, preferencialmente, nas porções terminais dos cromossomos (Figura 3). Além disso, as hibridizações sequenciais realizadas com as sondas CL66 e CL98 em metáfases do acesso diploide (BGEN-29) revelaram que os arranjos satélites não são colocados e estão situados em cromossomos diferentes dos cromossomos portadores das regiões de DNA ribossomal 18S (Figuras 3 e 4).

Os resultados do mapeamento cromossômico referente à repetição satélite CL66 revelaram sítios terminais (frequentemente localizados em regiões DAPI⁺), exceto uma grande marca intersticial, presente no braço longo de um dos maiores cromossomos do conjunto. Alguns cromossomos apresentaram ambas as extremidades marcadas, mas o número de cromossomos com essa característica variou entre os indivíduos, não havendo relação com o nível de ploidia de cada acesso (Figuras 4 e 5).

O acesso diploide BGEN-29 apresentou dez cromossomos marcados, sendo três sítios localizados em braços curtos, cinco sítios em braços longos e dois homólogos com ambas as extremidades marcadas (Figura 5a). O aneuploide BGEN-16 mostrou 13 cromossomos hibridizados, sendo quatro sítios localizados em braços curtos, sete em braços longos e dois cromossomos com ambas as regiões terminais marcadas (Figura 5b). No acesso triploide BGEN-28, 16 cromossomos foram hibridizados com a sonda CL66. Destes, a maioria dos sítios foi localizada em braços curtos (oito sítios), cinco sítios estavam presentes em braços longos e três cromossomos apresentaram marcação em ambos os braços (Figura 5c). Já o acesso tetraploide BGEN-64 revelou apenas 10 sinais CL66⁺, sendo dois sítios mapeados em braços curtos e cinco em braços longos. Para este acesso três cromossomos apresentaram ambas as porções terminais hibridizadas (Figura 5d). Por fim, no acesso hexaploide BGEN-42, o mapeamento cromossômico revelou 20

cromossomos com sítios de DNA satélite CL66, oito deles localizados em braços curtos, nove em braços longos e apenas três cromossomos mostraram hibridização em ambos os braços cromossômicos (Figura 5e). Todos os acessos investigados apresentaram o sítio intersticial em braços longos de um dos maiores cromossomos do conjunto.

Com relação à repetição CL98, todos os sítios foram mapeados próximos às extremidades cromossômicas (Figuras 6 e 7). Os sinais CL98⁺ apresentaram tamanho e brilho similares nos diferentes indivíduos de *L. alba*, revelando uniformidade na estrutura desse arranjo nos diferentes indivíduos, quando comparada à sequência CL66. Além disso, também foi possível observar que o número de cromossomos hibridizados com esta sequência repetitiva foi proporcional ao nível de ploidia de cada acesso, uma vez que apenas um cromossomo foi hibridizado no complemento monoploide de *L. alba* ($x=15$). Assim, dois, três quatro e seis sítios CL98⁺ foram observados nos acessos diploide, triploide, tetraploide e hexaploide, respectivamente (Figura 7). No entanto, embora todos os sítios estejam localizados próximos à região terminal, houve diferenças na classificação dos braços cromossômicos que possuem os sítios CL98. O acesso diploide BGEN-29 apresentou os sítios em braços curtos, enquanto no aneuploide BGEN-16 os sítios foram localizados em braços cromossômicos longos, assim como no acesso triploide BGEN-28. No tetraploide BGEN-64, três sítios foram mapeados em braços curtos e um sítio foi localizado no braço longo. Finalmente, o acesso hexaploide BGEN-42 mostrou quatro cromossomos com marcas em braços curtos, um sítio no braço longo além de um cromossomo com ambos os braços cromossômicos marcados (Figura 7).

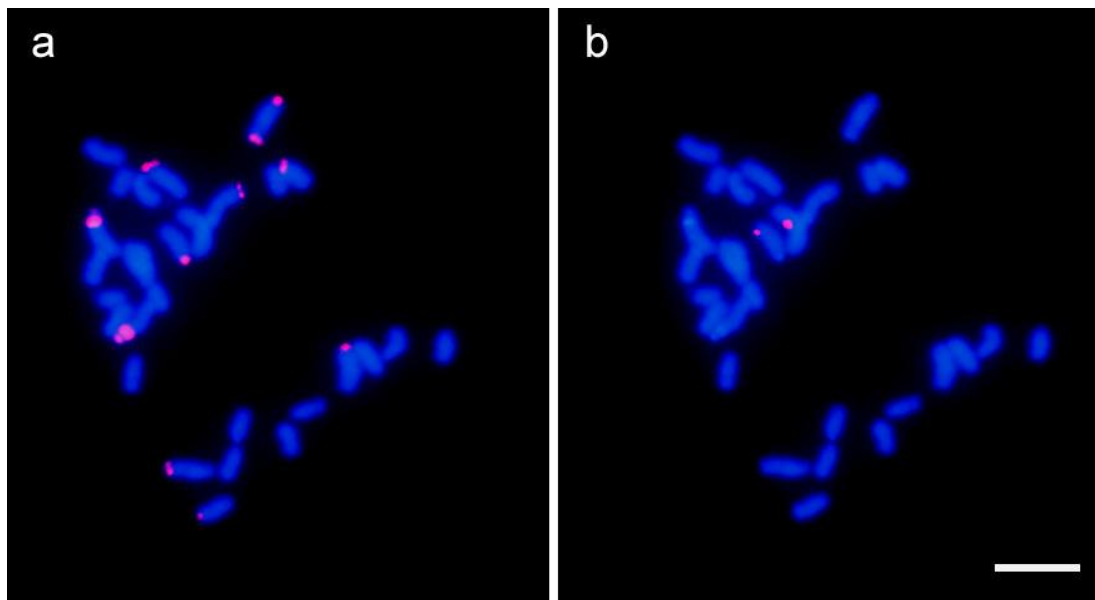


Figura 3: Metáfases representativas das hibridizações fluorescente *in situ* sequenciais com as sondas de DNA satélite CL66 e CL98 no acesso diploide de *Lippia alba* BGEN-29. a) Dez sítios CL66⁺; b) dois sítios CL98⁺. Barra = 5 μ m.

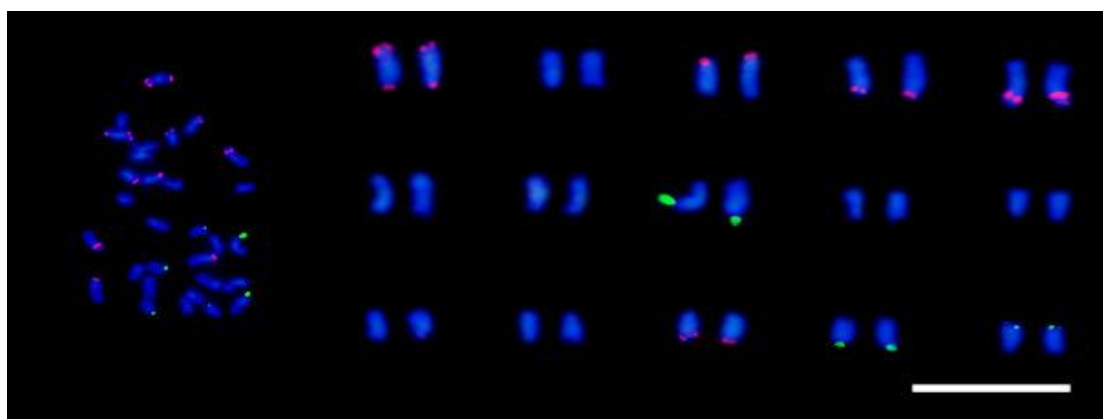


Figura 4: Metáfase e cariograma representando os cromossomos marcados com as sondas CL66 (em vermelho) e DNAr 18S (em verde) do acesso diploide BGEN-29. Barra = 5 μ m.

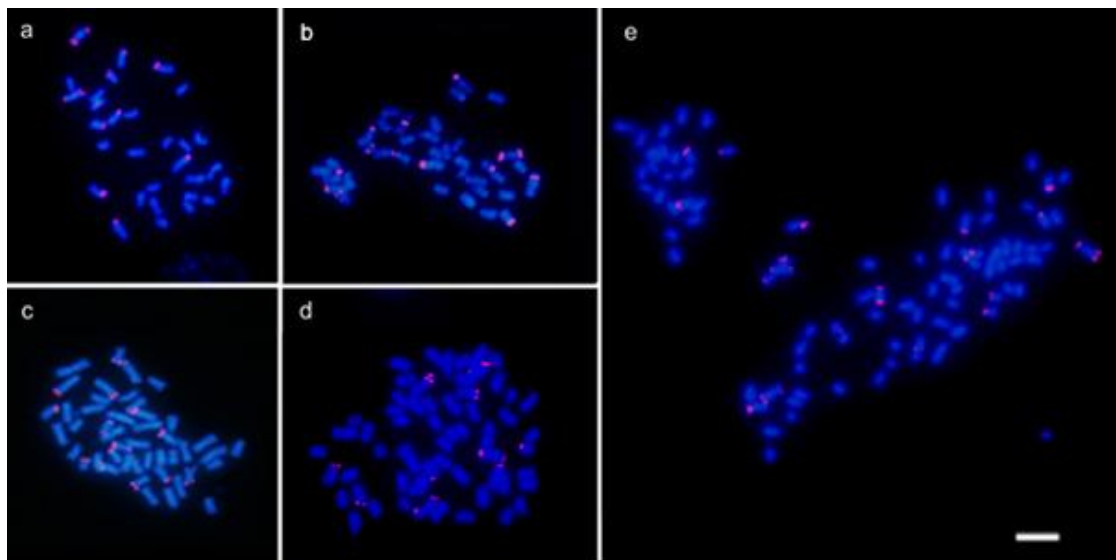


Figura 5: Metáfases representativas da hibridização fluorescente *in situ* com a sonda CL66 em *Lippia alba*. (a) diploide; (b) aneuploide; (c) triploide; (d) tetraploide e (e) hexaploide. Barra = 5 μ m.

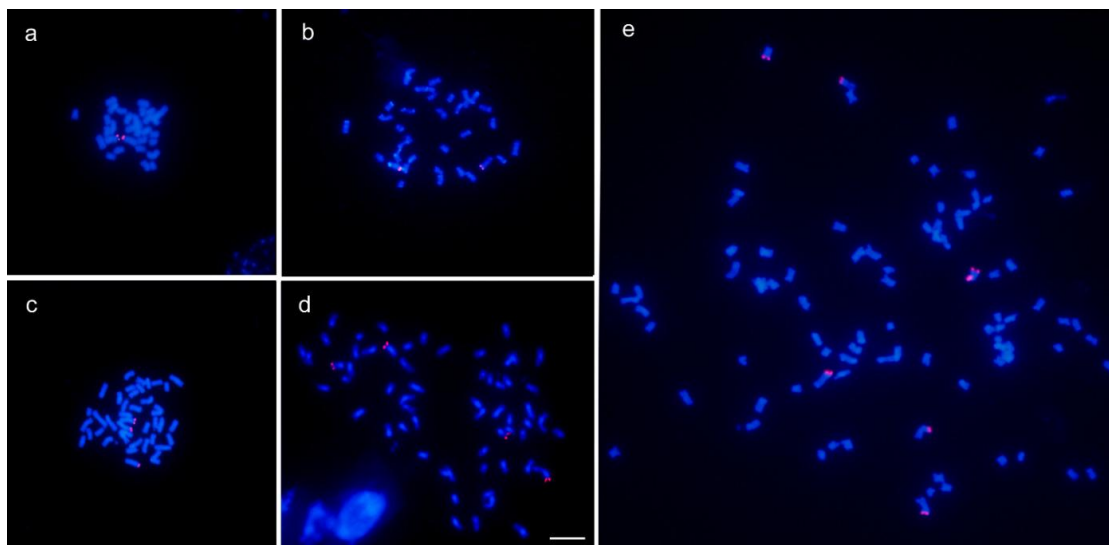


Figura 6: Metáfases representativas da hibridização fluorescente *in situ* com a sonda CL98 em *Lippia alba*. (a) diploide; (b) aneuploide; (c) triploide; (d) tetraploide e (e) hexaploide. Barra = 5 μ m.

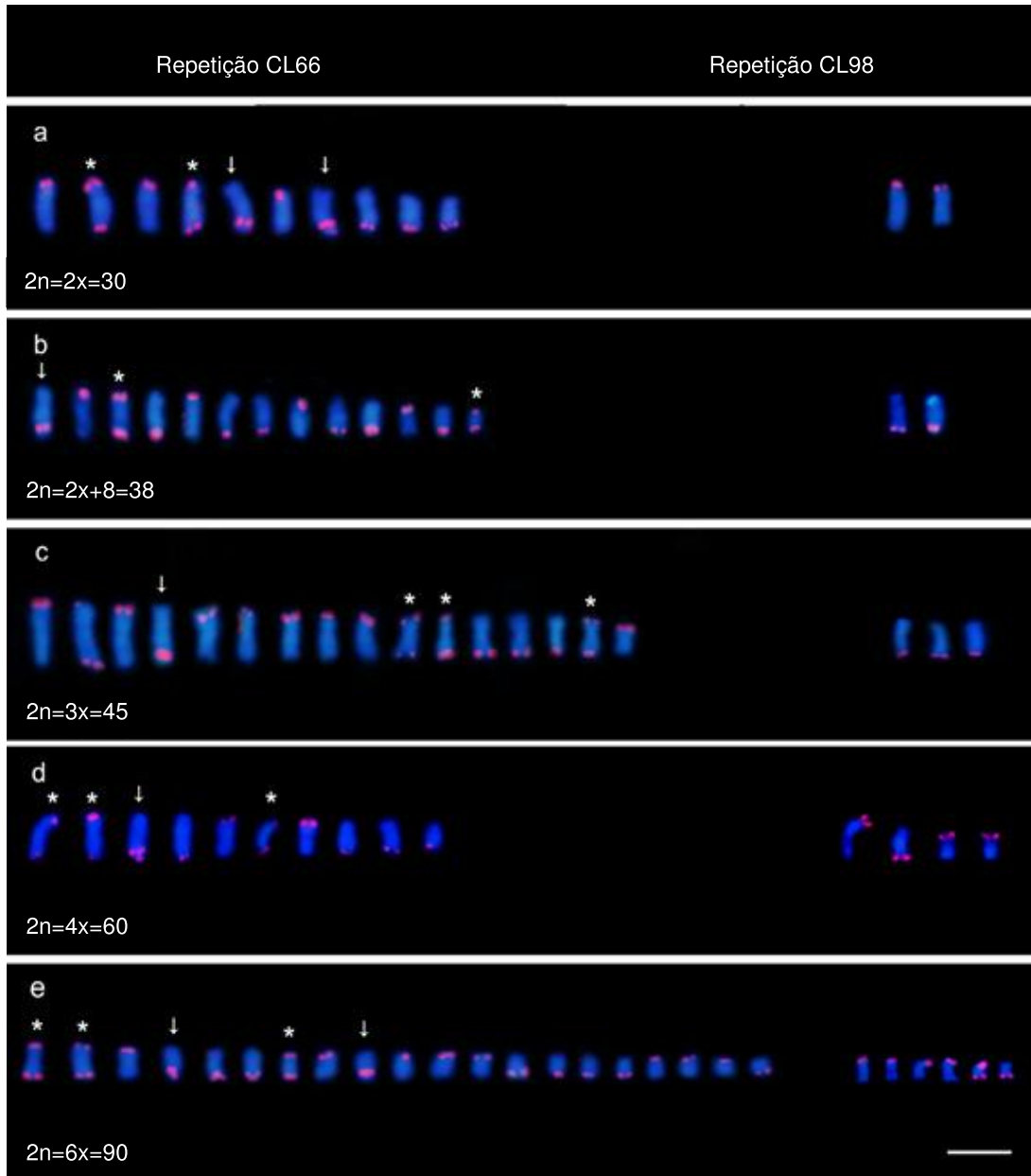


Figura 7: Cariogramas representando as repetições CL66 e CL98 em acessos de *Lippia alba*. (a) diploide; (b) aneuploide; (c) triploide; (d) tetraploide e (e) hexaploide. Setas indicam os cromossomos portadores do sítio intersticial; * indicam cromossomos com ambas as extremidades marcadas. Barra = 5 μ m.

CAPÍTULO 2

3. IDENTIFICAÇÃO E MAPEAMENTO DE SEQUÊNCIAS SATÉLITE NO COMPLEXO POLIPLOIDE *L. alba*

3.1 INTRODUÇÃO

A poliploidia constitui um dos principais mecanismos de especiação em plantas (DE BODT et al., 2008; JIAO et al., 2011; OTTO e WHITTON 2000; SOLTIS et al., 2005; SOLTIS e SOLTIS 2013). Dentre as consequências da duplicação genômica, além do aumento na quantidade de DNA, as alterações cromossômicas estruturais, como duplicação, deleção, inversão e translocação são bastante comuns. Frequentemente, tais rearranjos ocorrem em porções de DNA repetitivo, como as regiões de DNA satélites. Inúmeros estudos comprovam variações estruturais e numéricas em sítios de DNA satélite em genomas de poliploides, ressaltando o dinamismo dessas sequências frente à duplicação genômica (CHESTER et al., 2013; GARRIDO-RAMOS 2015; LIM et al., 2000b; MCCLINTOCK, 1984).

Dentre as porções cromossômicas repetitivas mais susceptíveis às variações, as regiões subteloôméricas apresentam grande dinamismo genômico, consistindo em “*hotspots*” para rearranjos em eucariotos (TORRES et al., 2011; RICHARD et al., 2013). Associadas aos telômeros, as sequências satélites subterminais podem ser espécie-específicas ou até mesmo cromossomo-específicas, consistindo assim, em bons marcadores cromossômicos para estudos evolutivos (GARRIDO-RAMOS 2015; LOUIS e VERSHININ, 2005; RICHARD et al., 2013). Estudos indicam que o grande dinamismo observado nestas regiões se deve a eventuais trocas de material genético ocorridas entre as extremidades cromossômicas de cromossomos não homólogos, as quais atuam ampliando e expandindo as repetições (GARRIDO-RAMOS, 2015; LINARDOPOULOU et al., 2005; TORRES et al., 2011). Tais mecanismos são capazes de gerar consideráveis variações cromossômicas e

podem levar a diferenciação de cariótipos, inclusive em indivíduos de uma mesma espécie. Em *A. thaliana*, por exemplo, foram detectadas variações de DNA satélites nas extremidades cromossômicas de 35 acessos, confirmando a dinâmica das repetições subterminais entre os indivíduos (KUO, OLSEN e RICHARDS, 2006). Portanto, o mapeamento cromossômico de sequências repetitivas permite uma caracterização mais refinada dos cariótipos, bem como a detecção de variações intraespecíficas, as quais poderiam ser omitidas com o uso de marcadores universais (GARRIDO-RAMOS, 2015).

Em poliploides, a identificação de diferentes classes de DNA repetitivo tem auxiliado no entendimento da dinâmica dos processos moleculares envolvidos após a duplicação genômica (MAVRODIEV et al., 2015; GARRIDO-RAMOS, 2015). As informações contribuem para o esclarecimento da origem de poliploides e evolução cariotípica, sendo imprescindíveis em estudos evolutivos em diferentes linhagens de plantas (TORRES et al., 2011; GARRIDO-RAMOS, 2015).

No complexo poliploide *L. alba*, variações associadas às sequências repetitivas de DNA ribossomal 18S foram observadas (REIS et al., 2014). Os autores sugerem alterações cromossômicas numéricas e estruturais durante a evolução cromossômica da espécie, como os principais causadores de diferenciação cariotípica em *L. alba*. No entanto, até o momento, os estudos citogenéticos se restringiram a apenas um representante de cada citótipo, sendo necessária a expansão do número de acessos a serem investigados, bem como a utilização de novos marcadores cromossômicos (REIS et al., 2014). Assim, neste trabalho foi proposto o mapeamento físico de arranjos satélites subterminais específicos de *L. alba* (CL66 e CL98) em acessos abrangendo os cinco grupos cromossômicos encontrados na espécie. Esta caracterização mais refinada e direcionada à espécie possibilitou detectar e documentar rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução cromossômica do complexo e discutir importantes questões sobre a plasticidade e dinamismo genômico de em diploides e poliploides de *L. alba*.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo auxiliar no entendimento da plasticidade genômica e evolução cariotípica do complexo poliploide *L. alba*.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a distribuição e o número de sítios das repetições CL66 e CL98 em acessos de *L. alba* representantes dos cinco citótipos;
- Descrever as variações cariotípicas encontradas entre os citótipos e dentre os indivíduos com mesmo número cromossômico;
- Documentar a extensão das variações intraespecíficas e os processos envolvidos nas mudanças cariotípicas ocorridas ao longo da evolução cromossômica de *L. alba*.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os acessos investigados foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente no item 2.3.1.

3.3.2 MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO E HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *in situ*

A construção das sondas, confecção de lâminas e as subsequentes hibridizações fluorescente *in situ* foram realizadas de acordo com os itens 2.3.4, 2.3.5 e 2.3.7 do Capítulo 1. Para a identificação dos sítios de repetições, 33 acessos foram mapeados com a sonda CL98 e 47 acessos com a sonda CL66. Além disso, para os cromossomos que apresentaram sítio CL66 intersticial foi realizado o cálculo de heterogeneidade cromossômica (Ai) e razão entre os braços de acordo com o item 2.3.6.

3.4 RESULTADOS

O mapeamento cromossômico das repetições satélites CL66 e CL98 revelou diversos padrões cariótipos nos diferentes acessos do complexo *L. alba*. Esta ampla diversidade cariotípica pode ser ilustrada pela diferença numérica dos sítios e por suas respectivas dimensões nos diferentes cariótipos. Alguns sítios mostraram-se bastante extensos compostos por muitas cópias, enquanto outros foram menores, com sinais de hibridização inconspícuos. Além disso, as variações encontradas não se restringiram apenas entre os diferentes citótipos de *L. alba*, mas também ocorreram dentre os indivíduos que possuem o mesmo número cromossômico. Frequentemente, as sondas hibridizaram nas porções terminais dos cromossomos em regiões de heterocromatina DAPI⁺. Além disso, os resultados mostraram comportamentos diferentes das repetições CL66 e CL98 (como previamente relatado no Capítulo 1) (Figuras 8 e 9). A sequência CL66 revelou um padrão de distribuição amplamente variável (Figura 8, Tabela 4), enquanto o arranjo CL98 mostrou perfis cariotípicos mais uniformes nos diferentes acessos (Figura 9; Tabela 5).

As hibridizações da repetição satélite CL66 revelaram grandes diferenças cariotípicas entre os acessos, sobretudo entre os diploides. Neste grupo, as diferenças quanto ao número de cromossomos hibridizados variou de 10 a 18, consistindo no grupo com mais diversidade cariotípica (Figura 10). Dez acessos diploides apresentaram dez cromossomos contendo a repetição CL66 (Figura 10a); quatro apresentaram 11 e quatro acessos 12 cromossomos hibridizados (Figuras 10b, 10c). Apenas um indivíduo diploide apresentou 13 cromossomos compostos pela repetição CL66 (Figura 10d), um indivíduo apresentou 14 (Figura 10e) e outro acesso evidenciou 15 cromossomos marcados com a sequência CL66 (Figura 10f). Os cariótipos compostos por 16 cromossomos CL66⁺ foram observados em três representantes diploides. Por fim, apenas um acesso apresentou o número máximo de sítios CL66. As metáfases deste acesso revelaram 18 cromossomos CL66⁺ (Figura 10h).

O mapeamento dos acessos aneuploides (2n=38) revelaram consideráveis diferenças no padrão de hibridização e no número de sítios. Dos três indivíduos investigados, dois apresentaram 13 cromossomos hibridizados, enquanto o outro

revelou 18 cromossomos com fortes sinais CL66⁺ (Figura 11). No grupo dos acessos triploides (3x=45) oito indivíduos foram mapeados. O número de sítios encontrados para estes indivíduos variou de 16 a 24, correspondendo ao grupo com maior número de cromossomos contendo a sequência satélite CL66 (Figura 12). Dois acessos apresentaram 16 cromossomos contendo sítios CL66⁺; dois apresentaram 21 cromossomos marcados; outros dois indivíduos apresentaram 23 cromossomos hibridizados, e dois apresentaram 24 cromossomos marcados com a sonda CL66 (Figura 12a-d).

Dentre os acessos tetraploides (4x=60), dois indivíduos apresentaram apenas dez cromossomos contendo a repetição satélite CL66 (Figura 13a). Cinco acessos revelaram 18 cromossomos hibridizados (Figura 13b), e dois acessos mostraram 19 cromossomos CL66⁺ (Figura 13c). Neste grupo, apenas um indivíduo obteve 23 cromossomos marcados (Figura 13d). Por fim, o hexaploide (6x=90) apresentou 20 cromossomos portadores do arranjo CL66 (Figura 14).

Além da grande variação numérica de sítios CL66⁺, os mapeamentos com a sonda CL66 também evidenciaram algumas variações estruturais, inclusive entre indivíduos que possuem o mesmo número de marcas. Tais variações cariotípicas foram ilustradas em alguns cariogramas dos indivíduos diploides (Figuras 15-19). Para os acessos aneuploides e poliploides, cariogramas representativos dos sítios CL66 são ilustrados nas Figuras 20, 21 e 22.

Em geral, a maioria dos cariótipos apresentou uma marca intersticial bastante conspícua localizada, frequentemente, em braços longos de um cromossomo submetacêntrico. Esta marca foi comum a todos os acessos investigados, e tornou-se um importante marcador cromossômico para *L. alba*. Assim, as eventuais mudanças no padrão deste sítio possibilitou detectar possíveis rearranjos estruturais e discutir a dinâmica desta repetição satélite (Tabela 4; Figura 23). Nos acessos diploides BGEN-57 e BGEN-65, por exemplo, tais cromossomos apresentaram este sítio consideravelmente maior que os demais acessos (cariogramas das Figuras 17 e 18). Adicionalmente, no acesso 2x BGEN-57 as medidas morfométricas para este cromossomo sugerem uma deleção do braço longo de um dos homólogos. Além disso, os acessos BGEN-72 (2x) e BGEN-92 (4x) apresentaram este sítio em braços curtos. Esquemas representativos das possíveis deleções são ilustradas na Figura 24.

Embora grandes variações cariotípicas tenham sido detectadas com a repetição satélite CL66, o mapeamento da sequência repetitiva CL98 foi mais uniforme e constante nos diferentes indivíduos do complexo. Em geral, foi observado o mesmo número de cromossomos com marcação CL98⁺ no complemento monoploide de *L. alba* ($x=15$) independentemente do nível de ploidia do acesso. Na maioria dos casos, foram encontrados 2, 3, 4 e 6 cromossomos hibridizados em 2x, 3x, 4x e 6x. Alguns acessos diploides, entretanto, apresentaram sinais CL98⁺ adicionais que variaram de 2-4, além dos dois sítios principais encontrados em todos os indivíduos 2x (Figura 25).

Com relação aos indivíduos poliploides, todos os acessos 3x apresentaram 3 cromossomos marcados com a sonda CL98, no entanto, sítios adicionais inconspícuos também foram observados nas metáfases dos acessos BGEN-59, BGEN-49 e BGEN-62 (Figura 26). No grupo dos tetraploides foram encontrados quatro cromossomos com sinal, entretanto, os acessos BGEN-31 e BGEN-45 revelaram 3 e 5 cromossomos marcados com a repetição CL98, respectivamente (Figura 27). Por fim, as metáfases dos aneuploides e do hexaploide apresentaram 2 e 6 cromossomos marcados com a repetição CL98, respectivamente (Figura 28).

A uniformidade do arranjo CL98 também pode ser constatada pela estabilidade estrutural dos sítios, uma vez que poucas variações nos padrões de hibridização foram observadas. Na maioria das vezes, os sinais apresentaram brilho e tamanho similares. Ocasionalmente, alguns cariótipos exibiram cromossomos com ambas as extremidades hibridizadas. Além disso, a classificação dos braços cromossômicos dotados dos sítios CL98⁺ também variou nos diferentes acessos. As Tabelas 4 e 5 sumarizam o número de cromossomos contendo as repetições satélites CL66 e CL98 nos diferentes acessos do complexo *L. alba*.

Tabela 4: Número de acessos de *Lippia alba* mapeados com a repetição satélite CL66 em cinco níveis de ploidia e medidas morfométricas do cromossomo portador do sítio CL66 intersticial.

Número de acessos mapeados	Número de cromossomos CL66 ⁺	Classificação	Heterogeneidade cromossômica (Ai)	Número de acessos com heteromorfismo ^a	
Diploides (2n=30)	10 - 18	m - sm	0,04 - 0,44	1	
10	10	m - sm	0,04 - 0,41	1 (0,19 e 0,28)	
4	11	m - sm	0,13 - 0,44	-	
4	12	m - sm	0,08 - 0,32	-	
1	13	sm	0,35	-	
1	14	m	0,22	-	
1	15	m	0,20	-	
3	16	m - sm	0,07 - 0,31	-	
1	18	m	0,23	-	
Aneuploides (2n=38)	13 - 18	m - sm	0,15 - 0,30	-	
2	13	m - sm	0,15 - 0,30	-	
1	18	m	0,19	-	
Triploides (2n=45)	16-24	m - sm	0,08 - 0,32	-	
2	16	m	0,13 - 0,17	-	
2	21	m - sm	0,16 - 0,32	-	
2	23	m	0,08 - 0,14	-	
2	24	m	0,07 - 0,18	-	
Tetraploides (2n=60)	10 - 23	m - sm	0,04 - 0,47	2	
2	10	m - sm	0,07 - 0,34	1 (0,07 e 0,34)	
5	18	m	0,04 - 0,27	1 (0,04 e 0,22)	
2	19	m - sm	0,05 - 0,47	-	
1	23	m	0,15	-	
Hexaploide (2n=90)	20	m - sm	0,05 - 0,16 - 0,31	1 (0,05 - 0,16 - 0,31)	
1	20	m - sm	0,05 - 0,16 - 0,31	1 (0,05 - 0,16 - 0,31)	
Total	47	10 - 24	m - sm	0,04 - 0,47	4

^aNúmeros entre parênteses representam a variação de Ai do cromossomo portador do sítio intersticial em um mesmo indivíduo.

Tabela 5: Número de acessos de *Lippia alba* mapeados com repetição satélite CL98 em cinco níveis de ploidia

Nível de ploidia	Número de acessos	Número de cromossomos com sítios CL98 ⁺	Número de acessos com sítios CL98 ⁺ inconspícuos ^a
Diploide (2n=30)	15	2-4	5 (0-4)
Aneuploide (2n=38)	2	2	-
Triploide (2n=45)	9	3	5 (1-5)
Tetraploide (2n=60)	6	3-5	1 (0-3)
Hexaploide (2n=90)	1	6	-

^aNúmeros entre parênteses representam a variação de sítios CL98 inconspícuos.

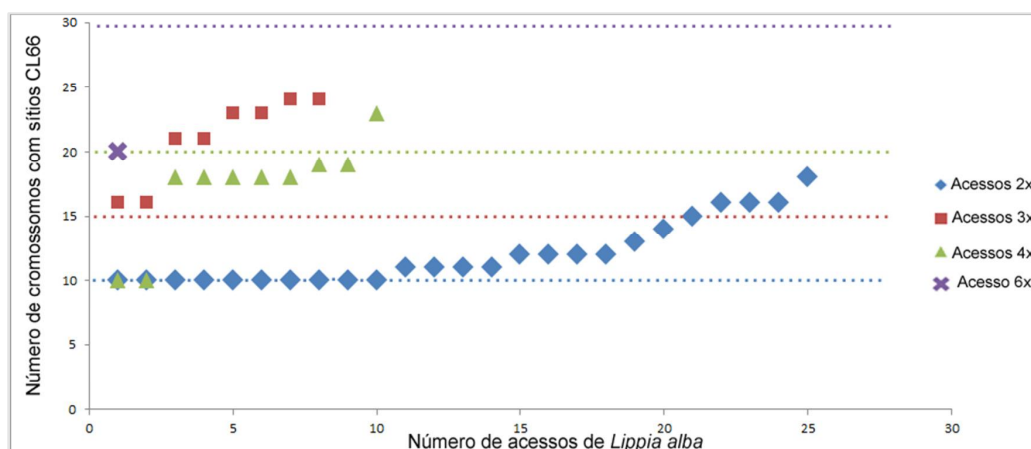


Figura 8: Número de cromossomos com sítios de repetição CL66 em 47 acessos de *Lippia alba*. Linhas pontilhadas representam o número mais frequente de cromossomos com sítios CL66 para cada nível de ploidia (10: diploide; 15: triploide; 20: tetraploide; 30: hexaploide), tendo como referência o número de cromossomos CL66⁺ mais frequente em diploides.

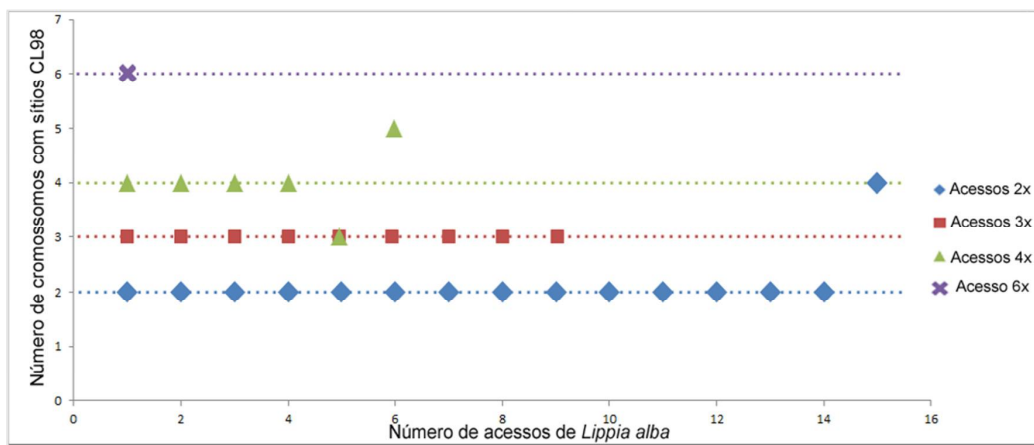


Figura 9: Número de cromossomos com sítios de repetição CL98 em 33 acessos de *Lippia alba*. Linhas pontilhadas representam o número mais frequente de cromossomos com sítios CL98 para cada nível de ploidia (2: diploide; 3: triploide; 4: tetraploide; 6: hexaploide), tendo como referência o número de cromossomos CL98⁺ mais frequente em diploides.

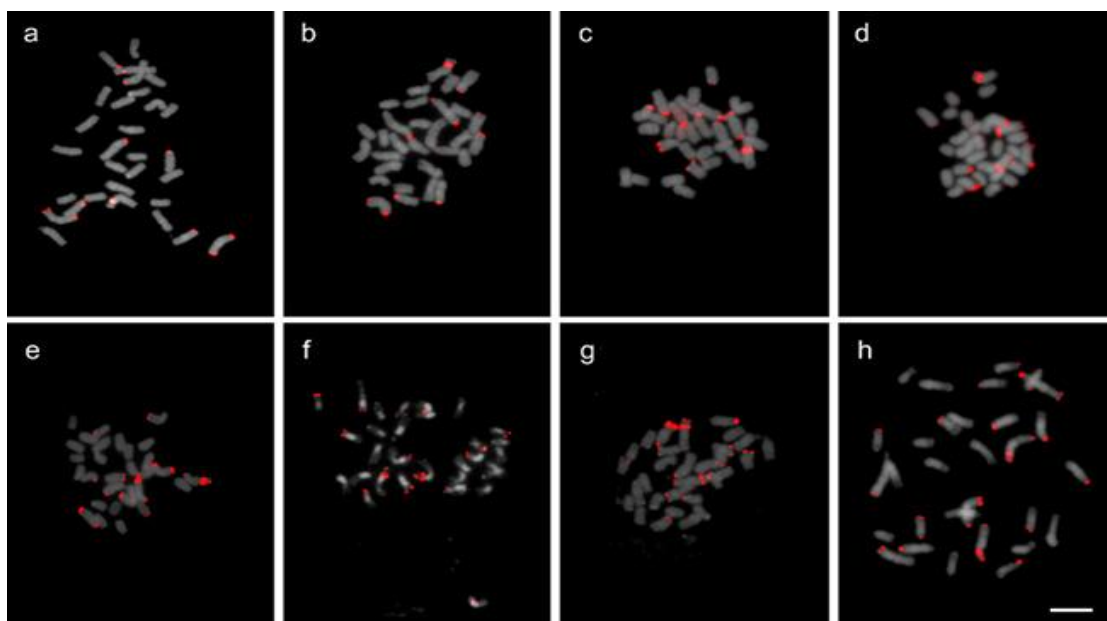


Figura 10: Perfis cariotípicos em acessos diploides de *Lippia alba* ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66. a) dez cromossomos CL66⁺; b) 11 cromossomos CL66⁺; c) 12 cromossomos CL66⁺; d) 13 cromossomos CL66⁺; e) 14 cromossomos CL66⁺; f) 15 cromossomos CL66⁺; g) 16 cromossomos CL66⁺ e 18 cromossomos CL66⁺. Barra = 5 μ m.

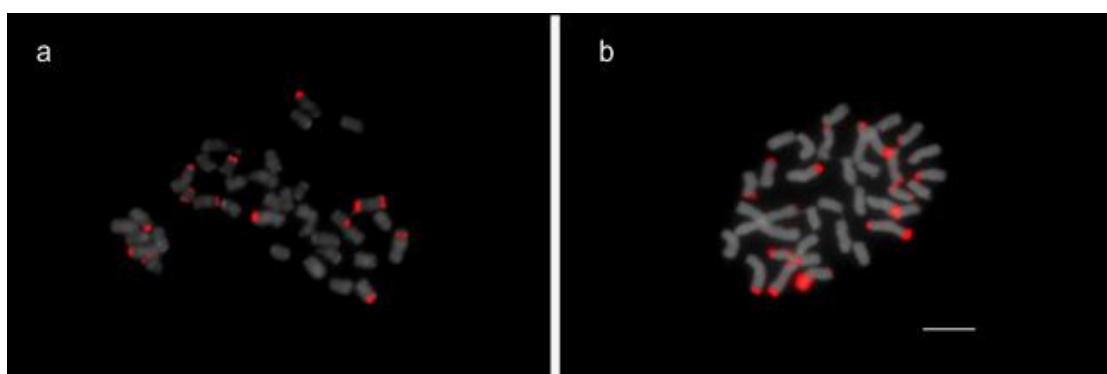


Figura 11: Perfis cariotípicos em acessos aneuploides de *Lippia alba* ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66. a) 13 cromossomos CL66⁺; b) 18 cromossomos CL66⁺. Barra = 5 μ m.

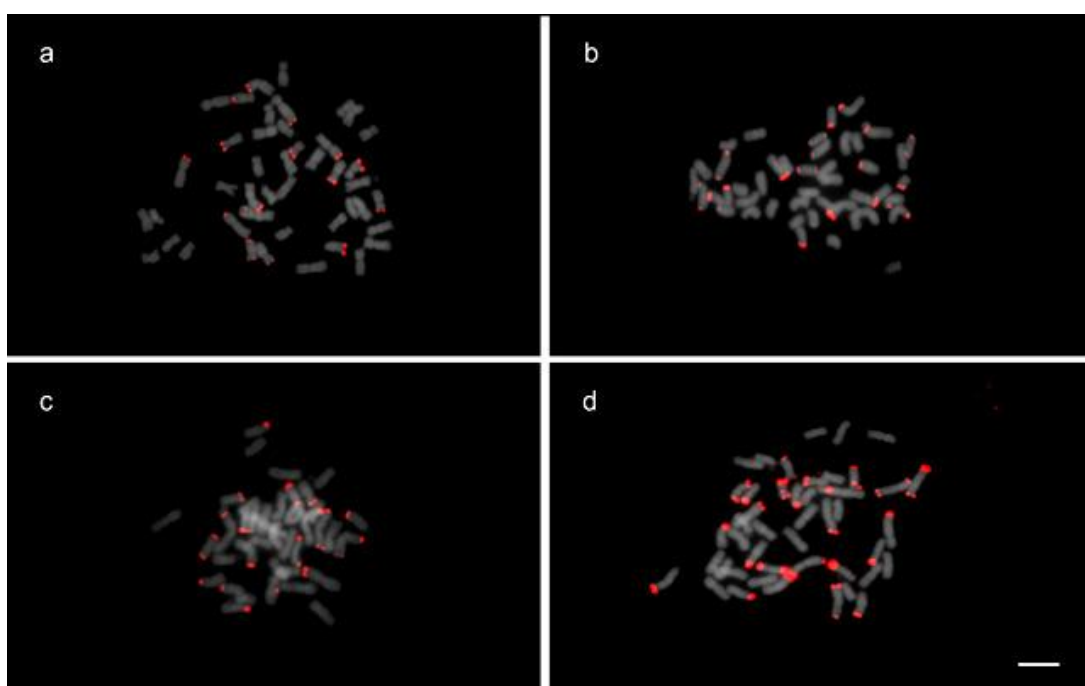


Figura 12: Perfis cariotípicos em acessos triploides de *Lippia alba* ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66. a) 16 cromossomos CL66⁺; b) 21 cromossomos CL66⁺; c) 23 cromossomos CL66⁺ e d) 24 cromossomos CL66⁺. Barra = 5µm.

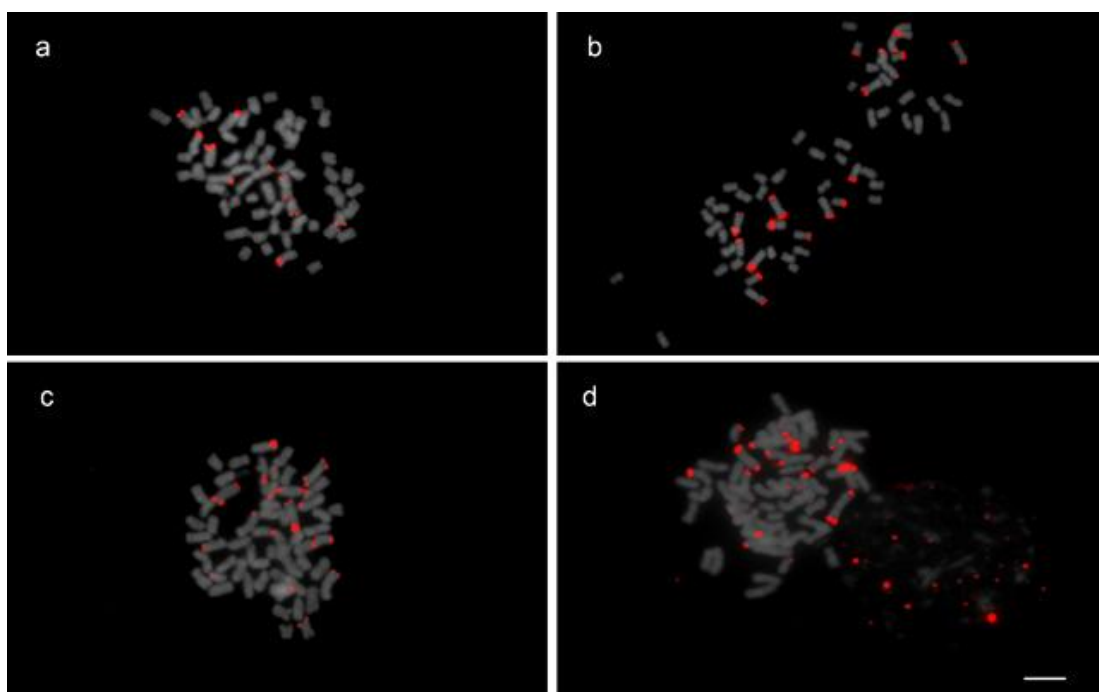


Figura 13: Perfis cariotípicos em acessos tetraploides de *Lippia alba* ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL66. a) dez cromossomos CL66⁺; b) 18 cromossomos CL66⁺; c) 19 cromossomos CL66⁺ e d) 23 cromossomos CL66⁺. Barra = 5 μ m.

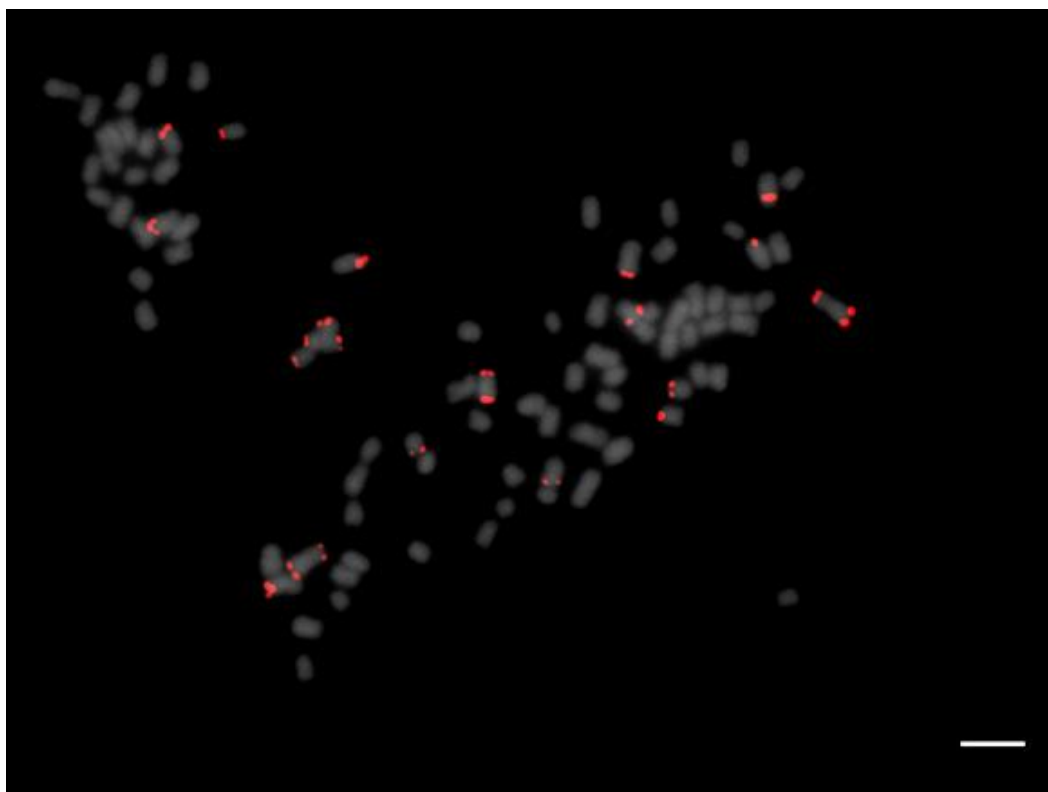


Figura 14: Perfil cariotípico do acesso hexaploide de *Lippia alba* ilustrando os 20 cromossomos CL66⁺. Barra = 5µm.

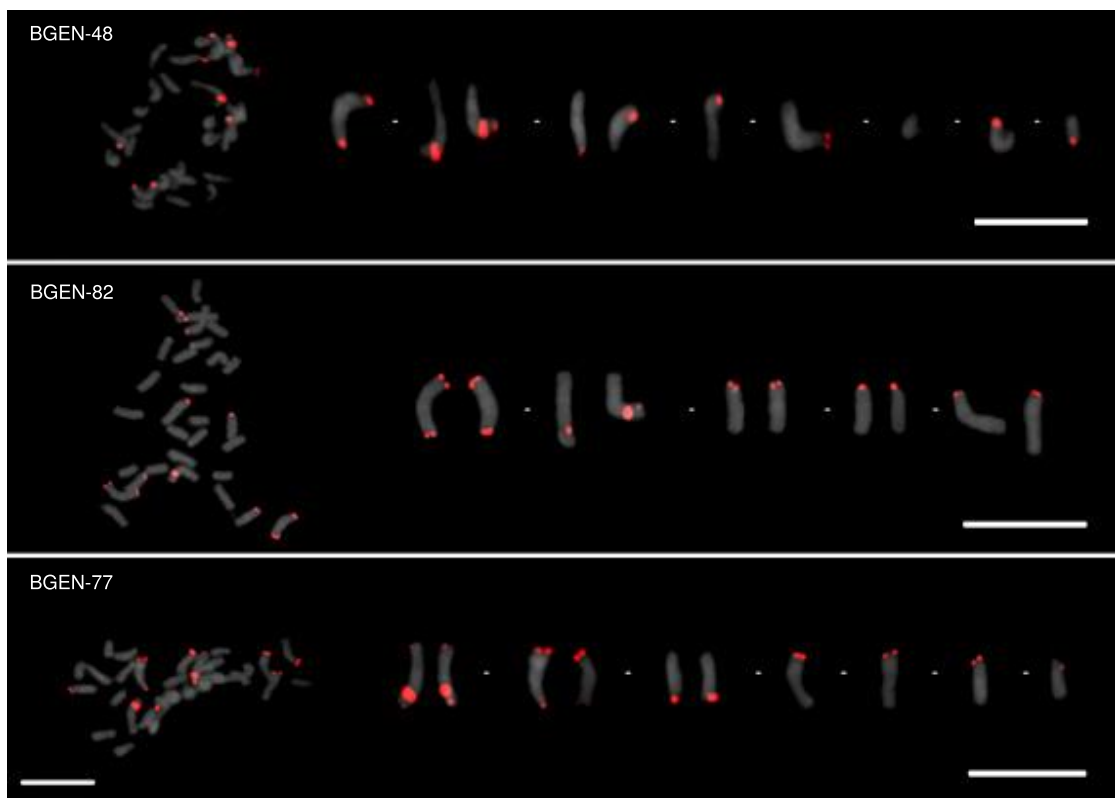


Figura 15: Metáfases e cariogramas representando dez cromossomos marcados com a sonda CL66 em três acessos diploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.

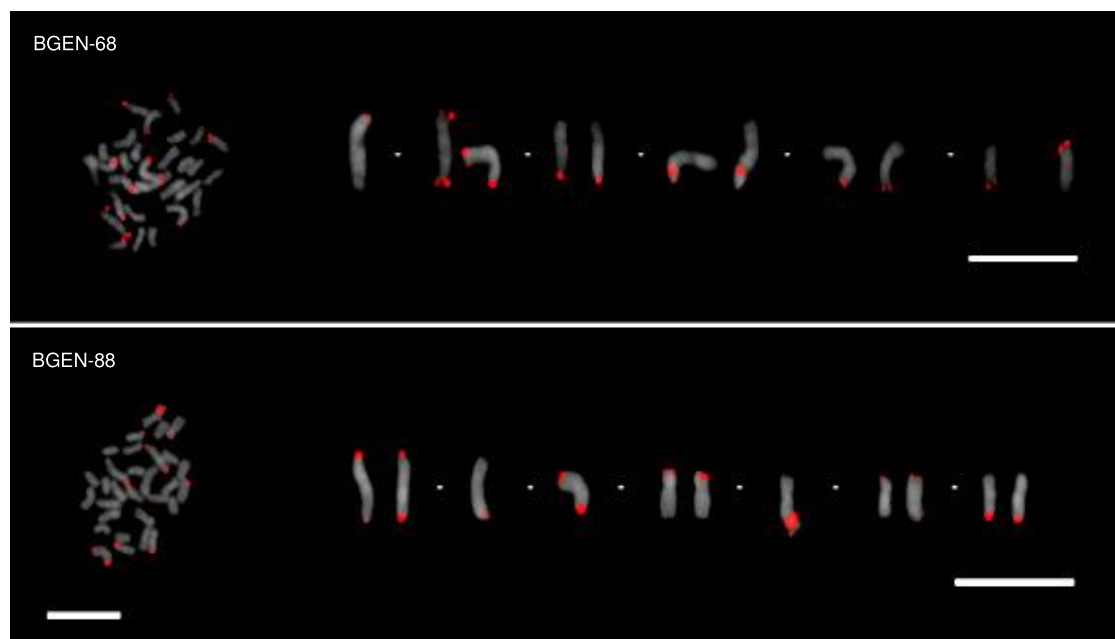


Figura 16: Metáfases e cariogramas representando 11 cromossomos marcados com a sonda CL6 em dois acessos diploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.

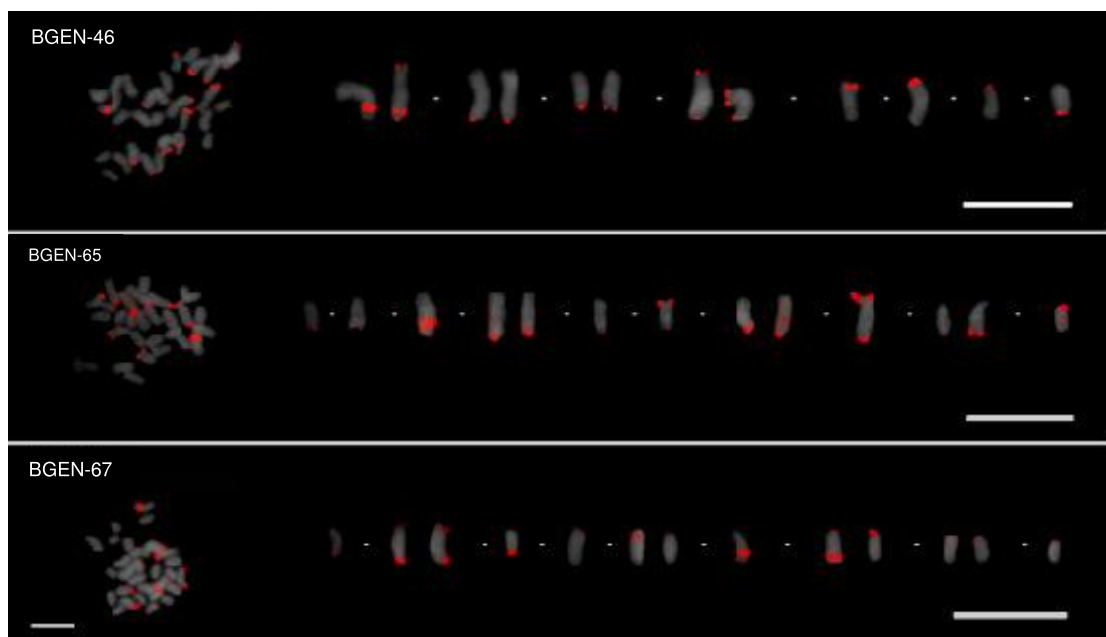


Figura 17: Metáfases e cariogramas representando 12, 12 e 13 cromossomos marcados, com a sonda CL66 em três acessos diploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.

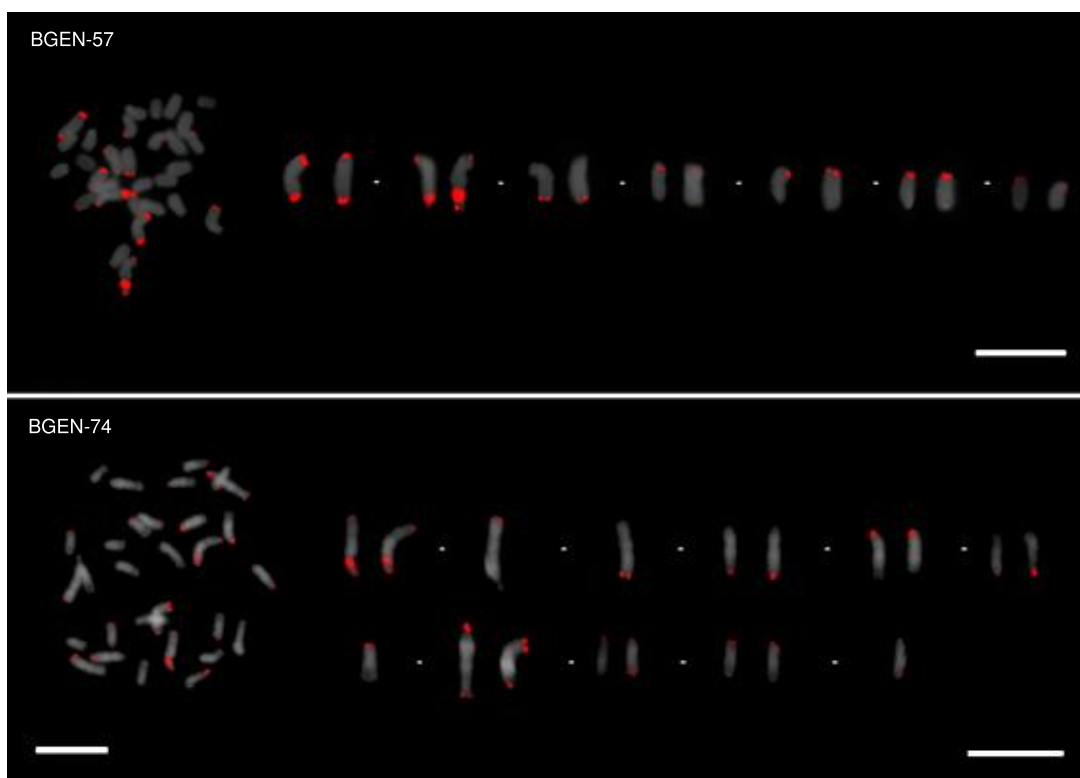


Figura 18: Metáfases e cariogramas representando 14 e 18 cromossomos marcados com a sonda CL66 em dois acessos diploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.

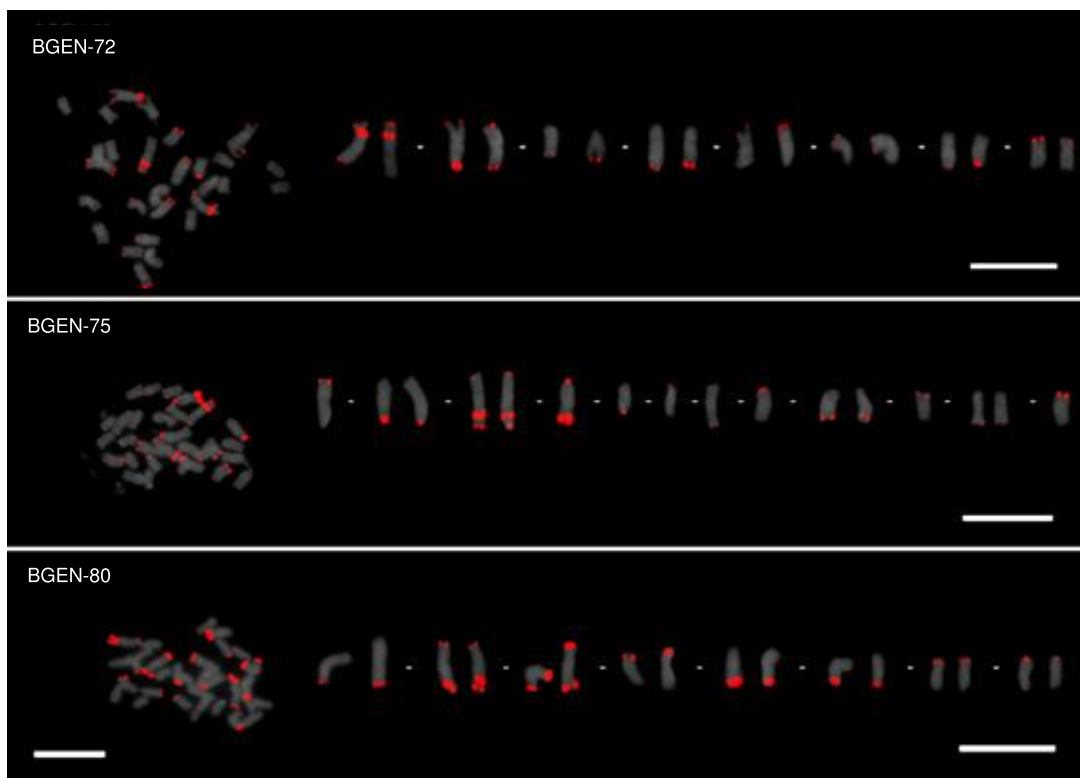


Figura 19: Metáfases e cariogramas representando 16 cromossomos marcados com a sonda CL66 em três acessos diploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.

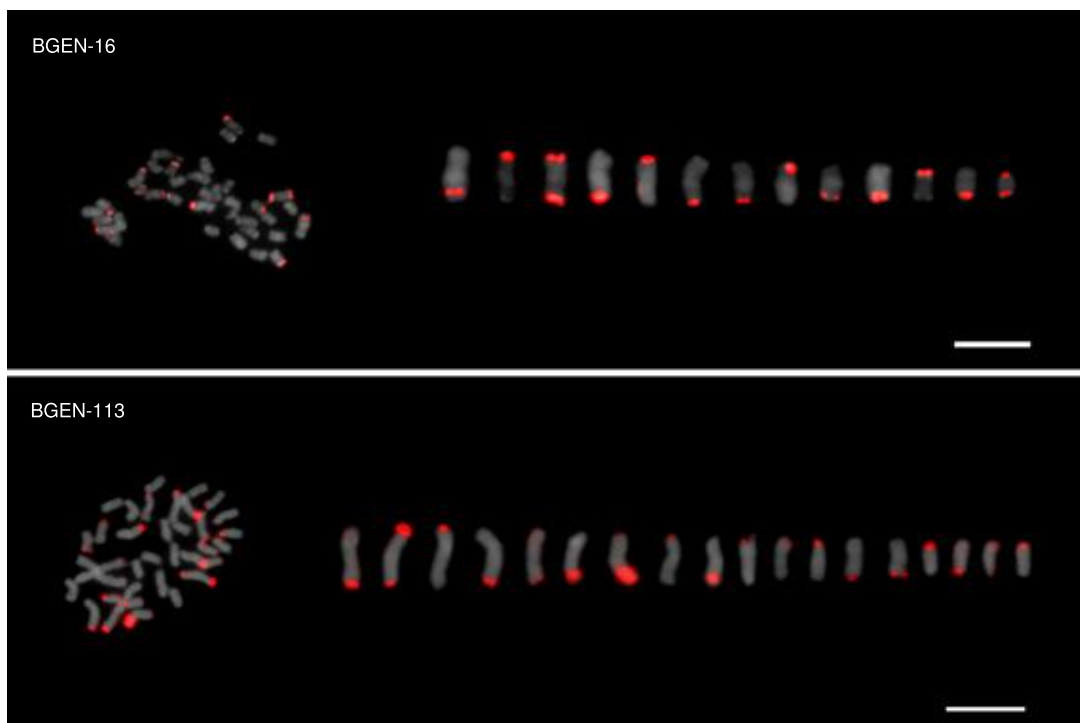


Figura 20: Metáfases e cariogramas representando 13 e 18 cromossomos marcados com a sonda CL66 em dois acessos aneuploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.

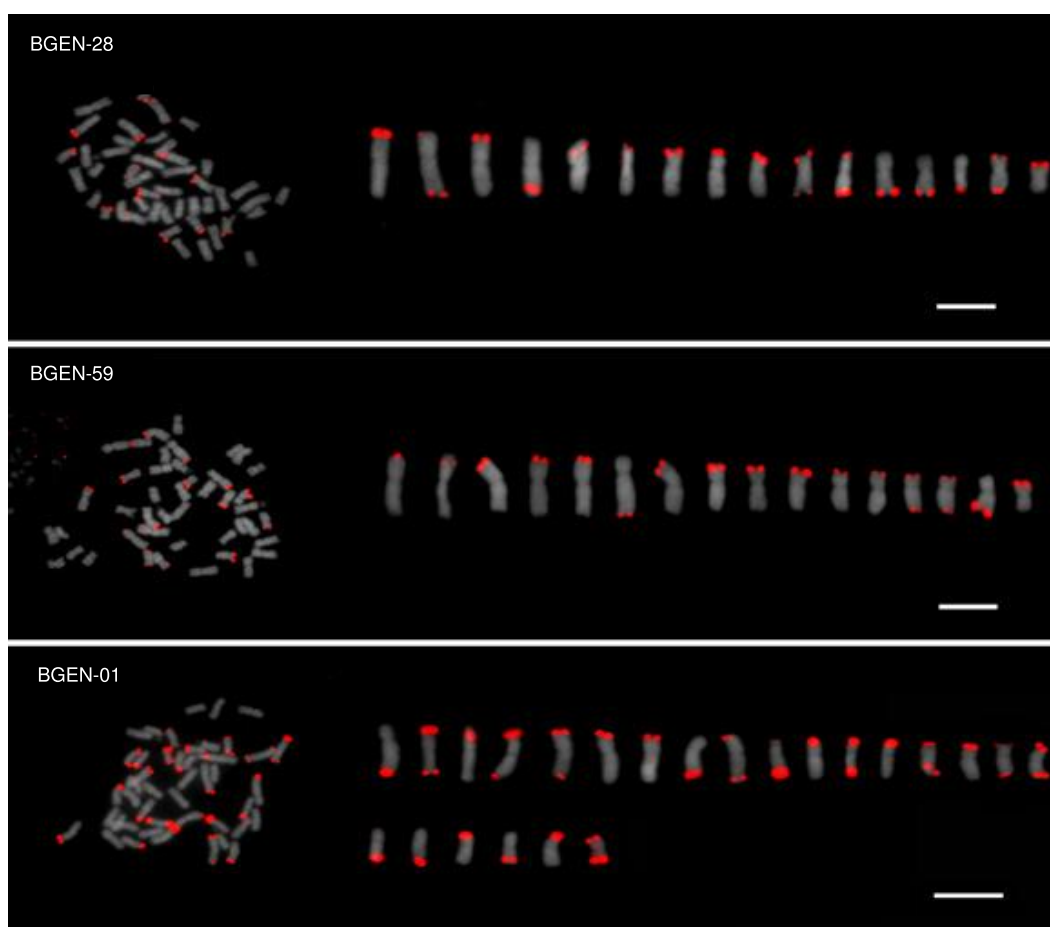


Figura 21: Metáfases e cariogramas representando 16, 16 e 23 cromossomos marcados com a sonda CL66 em três acessos triploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.

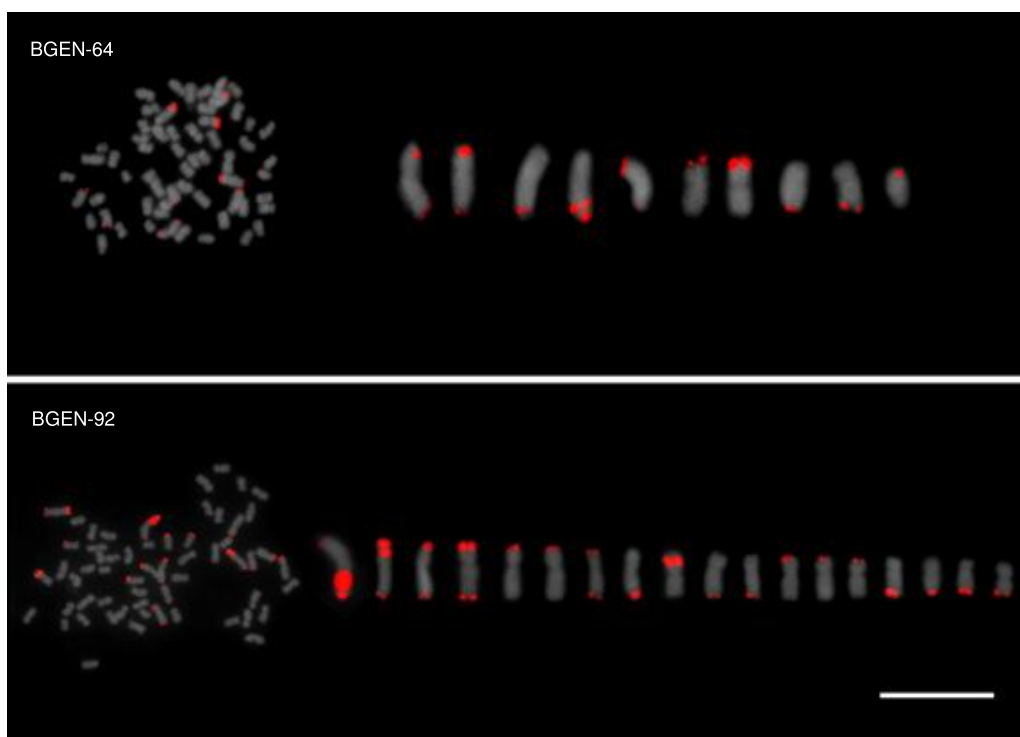


Figura 22: Metáfases e cariogramas representando dez e 18 cromossomos marcados com a sonda CL66 em dois acessos tetraploides de *Lippia alba*. Barra = 5 μ m.



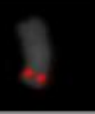





	Classificação: Submetacêntrico Número de sítios: 2 Localização: Braço longo		Classificação: Metacêntrico Número de sítios: 1 Localização: Braço curto Intensidade: Inconspícuo
	Classificação: Metacêntrico Número de sítios: 1 Localização: Braço longo		Classificação: Metacêntrico Número de sítios: 1 Localização: Braço curto Intensidade: Forte
	Classificação: Submetacêntrico Número de sítios: 3 Localização: Ambos os braços Intensidade: Forte		Classificação: Metacêntrico Número de sítios: 3 Localização: Ambos os braços Intensidade: Forte
	Classificação: Metacêntrico Número de sítios: 1 Localização: Braço curto		Classificação: Metacêntrico Número de sítios: 3 Localização: Ambos os braços

Figura 23: Diferentes perfis do cromossomo portador do sítio intersticial CL66 em acessos do complexo *Lippia alba*.

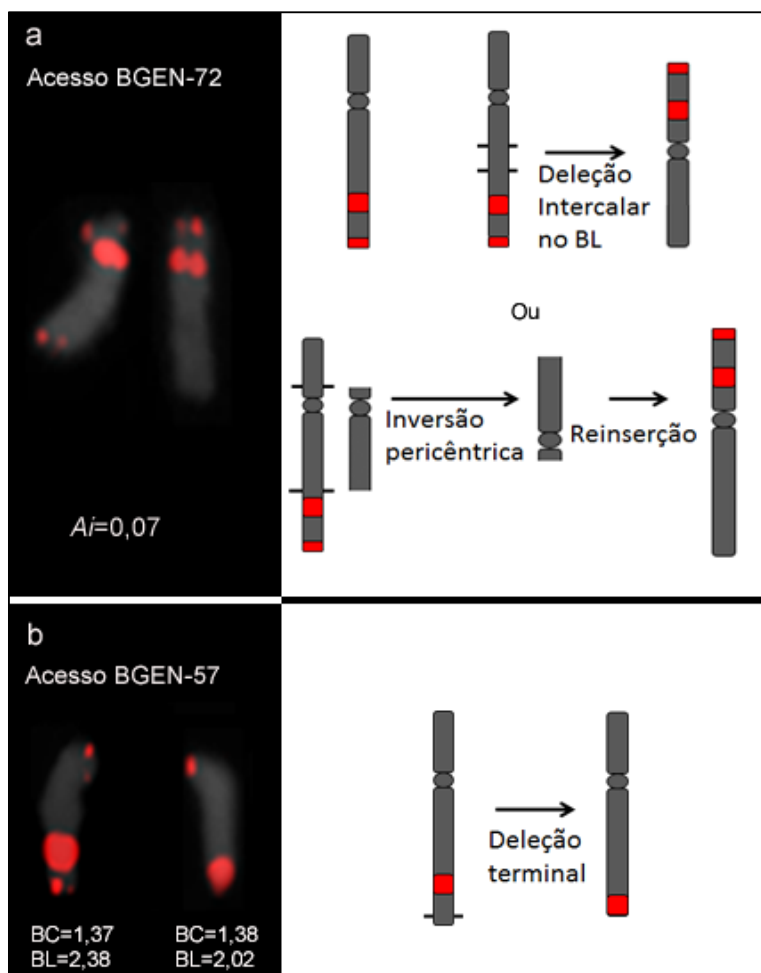


Figura 24: Esquema representativo de possíveis rearranjos cromossômicos propostos para explicar os diferentes perfis encontrados para o cromossomo portador do sítio intersticial CL66 em *Lippia alba*. a) índice de heterogeneidade cromossômica ($A_i=0,07$) sugere uma deleção intercalar ou uma inversão pericêntrica; b) medidas morfométricas dos braços cromossômicos sugerem deleção terminal.

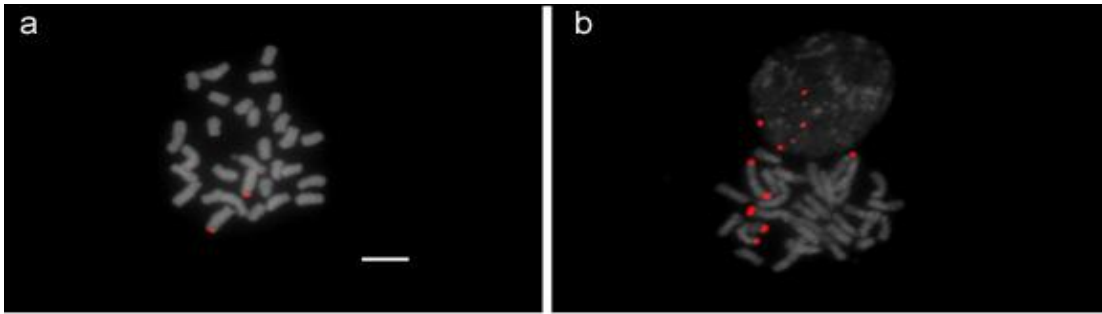


Figura 25: Perfis cariotípicos ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com sonda CL98 em acessos diploides de *Lippia alba*. a) dois cromossomos CL98⁺ e b) quatro cromossomos CL98⁺. Barra = 5µm.

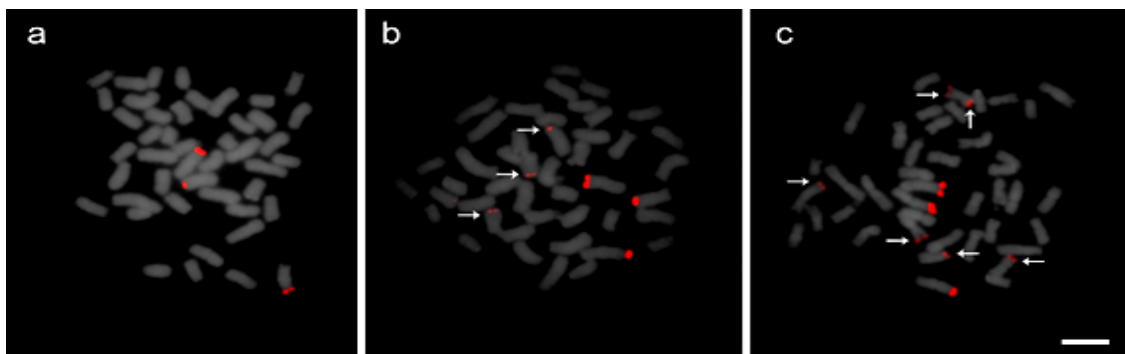


Figura 26: Perfis cariotípicos ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL98 em acessos triploides de *Lippia alba*. a) três cromossomos CL98⁺; b) seis cromossomos CL98⁺ e c) sete cromossomos CL98⁺. As setas indicam sítios adicionais inconspícuos. Barra = 5µm.

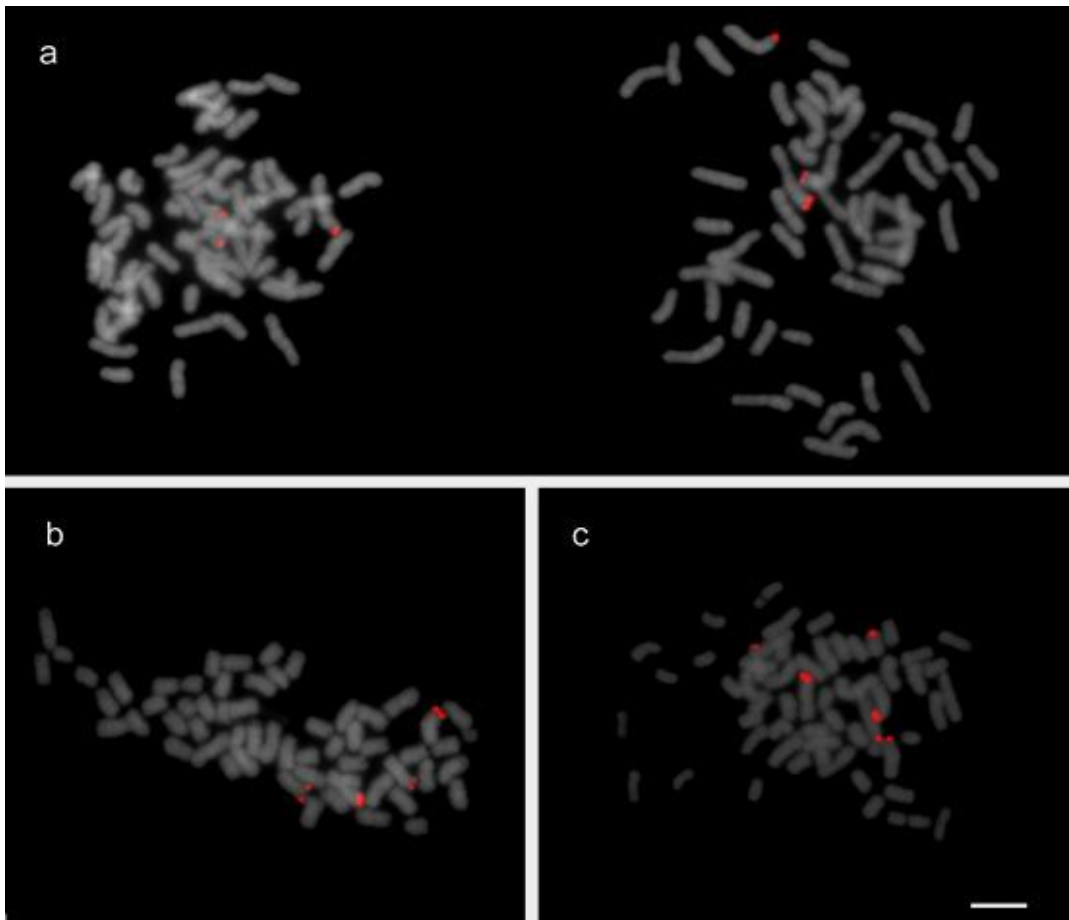


Figura 27: Perfis cariotípicos ilustrando a variação do número de cromossomos marcados com a sonda CL98 em acessos tetraploides de *Lippia alba*. a) três cromossomos CL98⁺; b) quatro cromossomos CL98⁺ e c) cinco cromossomos CL98⁺. Barra = 5µm.

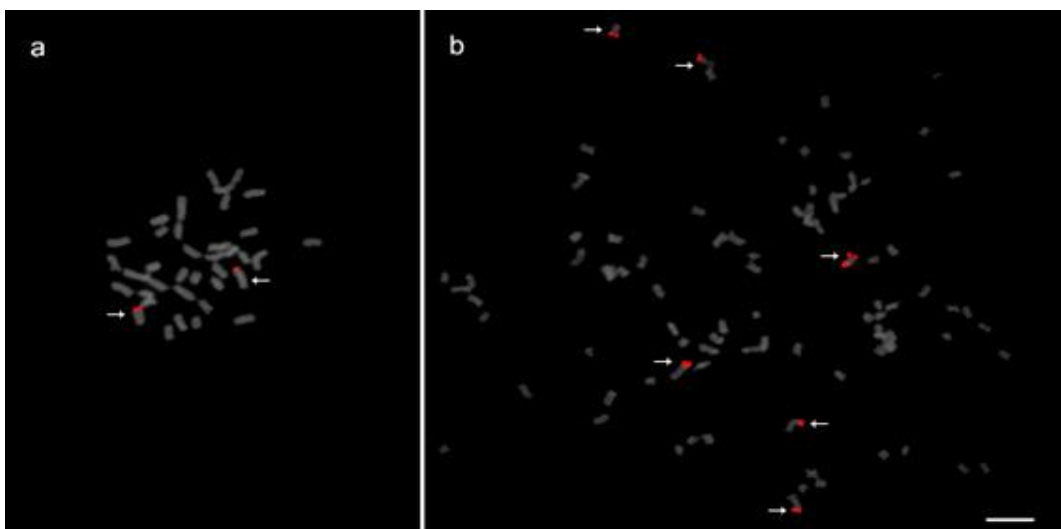


Figura 28: Perfis cariotípicos de acessos aneuploides e hexaploide de *Lippia alba* ilustrando o número de cromossomos marcados com a sonda CL98. a) dois cromossomos CL98⁺; b) seis cromossomos CL98⁺. Barra = 5µm.

CAPÍTULO 3

4 INSTABILIDADE MEIÓTICA EM CITÓTIPOS DE *L. alba*

4.1 INTRODUÇÃO

Poliploides são ubíquos na natureza e podem ser encontrados em diversas linhagens de plantas e em variados habitats do globo terrestre (CHAMALA et al., 2013; JIAO et al., 2011). Contudo, o sucesso no estabelecimento e perpetuação dos novos citótipos nas populações depende de sua reprodução (TAYALÉ e PARISOD 2013). Neste contexto, inúmeros trabalhos relacionados ao comportamento meiótico de poliploides vêm sendo realizados desde o início do século passado, e até hoje importantes aspectos sobre a reprodução sexuada em poliploides têm sido discutidos na comunidade científica (ERNEST, 1918; GRANT, 1956; GRANDONT, JENCZEWSKI e LLYOD, 2013; HE et al., 2010; MASON e PIRES 2015; STEBINS, 1950; 1957; TAYALÉ e PARISOD 2013; ZIELINSKI e SCHEID, 2012). Em poliploides, pelo fato dos indivíduos possuírem múltiplos conjuntos cromossômicos, mais de duas cópias de cromossomos homólogos (em autopoliploides) e ainda cromossomos homeólogos (em alopoliploides), a gametogênese torna-se comprometida (GRANDONT, JENCZEWSKI e LLYOD, 2013). Durante a formação dos gametas, ainda em estágio de prófase I, é necessário que o pareamento entre os cromossomos ocorra de forma correta e organizada. No entanto, em poliploides, as cópias extras de homólogos formam agrupamentos cromossômicos durante o processo de sinapse e impedem o pareamento correto, resultando na formação de multivalentes e univalentes (HAMANT, MA e CANDE, 2006). Assim, em decorrência das falhas em prófase I, os estágios subsequentes da divisão são afetados, culminado com segregações cromossômicas desiguais e formação de gametas desbalanceados e não reduzidos ao final da divisão (HAMANT, MA e CANDE, 2006). Na maioria das vezes, os pólenes resultantes de microsporogêneses anormais são inviáveis e incapazes de germinar, tornando a reprodução sexuada

comprometida e os indivíduos com baixa fertilidade (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; GRANDONT, JENCZEWSKI e LLYOD, 2013).

Contudo, apesar das falhas na produção dos gametas e da baixa fertilidade, os indivíduos poliploides apresentam um importante papel no incremento da diversidade vegetal (CHAMALA, et al., 2013). Estudos demonstram que tais irregularidades observadas na microsporogênese são os principais responsáveis pelo aumento da variação genética e formação de novos citótipos na natureza (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; RAMSEY, 2007; SOLTIS e SOLTIS, 2009). Por meio de cruzamentos unilateral e bilateral, indivíduos com diferentes níveis de ploidia podem ser formados e novos citótipos estabelecidos. Vários trabalhos demonstram a formação de citótipos poliploides por meio de pólenes não reduzidos, consistindo em um mecanismo chave para o processo de especiação e incremento de diversidade (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; RAMSEY, 2007; VERONESI, MARIANI, e BINGHAM, 1996; YAN et al., 1997).

No complexo *L. alba*, estudos recentes revelaram a presença de altos índices de irregularidades meióticas durante a microsporogênese de diferentes acessos poliploides (PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014; REIS; SOUSA e VICCINI, 2016 – apêndice A). Além disso, as alterações meióticas sugerem que pólenes desbalanceados e não reduzidos estariam envolvidos na origem dos cinco citótipos encontrados na espécie (REIS et al., 2014). No entanto, as investigações se restringem a poucos representantes de cada grupo cromossômico, sendo necessária a expansão das análises para um número superior de acessos. Assim, o presente trabalho visou quantificar 60 acessos de *L. alba* abrangendo os três níveis de ploidia mais frequentes (diploide, triploide e tetraploide) a fim de estudar a instabilidade meiótica da espécie frente as adversidades impostas pela duplicação genômica e obter uma visão global sobre a fertilidade dos indivíduos.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou avaliar a instabilidade meiótica e a produção de gametas masculinos aptos à fecundação, por meio de análises da microsporogênese e viabilidade polínica em acessos diploides, triploides e tetraploides de *L. alba*.

4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar e qualificar as irregularidades meióticas observadas nas fases de metáfase I; anáfase I; metáfase II; anáfase II e telófase II em 60 acessos de *L. alba*;
- Quantificar o índice de viabilidade polínica nos respectivos acessos que tiveram a meiose avaliada;
- Comparar as eventuais anormalidades entre e dentre os três citótipos de *L. alba*, a fim de se obter uma análise global sobre a reprodução sexuada na espécie.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os acessos investigados foram mantidos nas mesmas condições descritas no item 2.3.1.

4.3.2 CONFECÇÃO DE LÂMINAS PARA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO

Para a análise meiótica, botões florais de variados tamanhos foram coletados no período da manhã na Estação Experimental de Plantas da UFJF, fixados imediatamente em solução fixadora Carnoy (etanol e ácido acético 3:1) e armazenados a -20°C por pelo menos 24 horas. As lâminas foram confeccionadas de acordo com a técnica de esmagamento. Após o procedimento de fixação, os botões umedecidos com ácido acético 45%, foram abertos para a retirada das anteras, com auxílio de microscópio estereoscópico e agulhas. As anteras foram maceradas para a expulsão dos meiócitos. Em seguida, foi adicionada uma gota deorceína acética 5% e o material foi esmagado entre lâmina e lamínula.

Para a quantificação das irregularidades meióticas, aproximadamente 100 meiócitos foram analisados nos estágios de metáfase I; anáfase I; metáfase II; e anáfase II em conjunto com telófase II para cada acesso, totalizando cerca de 400 células analisadas para cada indivíduo. Para os acessos que apresentaram irregularidades em zigótenos (prófase I), 100 meiócitos foram quantificados.

Além da coloração convencional comorceína acética, a técnica de FISH foi empregada a fim de ilustrar a distribuição da repetição satélite CL66 durante a formação dos gametas. Para isso, lâminas contendo meiócitos em diferentes estágios da divisão foram hibridizadas de acordo com o item 2.3.7.

Figuras representativas de cada irregularidade foram fotografadas por meio de uma câmera Olympus DP72 de vídeo acoplada ao microscópio, e digitalizadas por meio do software *Image Pro-Plus 4.5* (Media Cybernetics).

4.3.3 TESTE DE VIABILIDADE POLÍNICA

Para a avaliação de viabilidade polínica pelo teste de diacetato de fluoresceína (FDA) (HESLOP HARRISON e HESLOP HARRISON, 1970), flores maduras coletadas no período matinal foram abertas com agulhas para a retirada das anteras e estas foram dissecadas para a liberação dos pólenes. Em seguida, uma gota de solução de fluoresceína diacetato dissolvida em acetona 2mg/mL combinada com sacarose 10% foi adicionada aos grãos. O material biológico foi comprimido entre lâmina e lamínula e selado com esmalte incolor. Após 15 minutos ao abrigo de luz, os grãos foram analisados em microscopia de epifluorescência (Olympus BX 51). Aproximadamente 1000 pólenes foram analisados para cada acesso investigado. Pólenes contendo fluorescência intensa foram considerados viáveis, enquanto os grãos que não fluoresceram foram considerados estéreis.

4.4. RESULTADOS

4.4.1 COMPORTAMENTO MEIÓTICO

Os resultados do comportamento meiótico revelaram índices de irregularidades bastante heterogêneos entre os acessos, sendo que os indivíduos poliploides apresentaram os maiores valores de meiócitos anormais (Tabelas 6 e 7; Figura 29). Adicionalmente às diferenças no comportamento meiótico observadas entre os citótipos, também foram encontrados índices discrepantes de irregularidades dentre os indivíduos com o mesmo número cromossômico, sobretudo em diploides. As análises revelaram que, embora o grupo dos indivíduos diploides apresente, em média, o menor índice de meiócitos anormais (23,85%), os diploides correspondem ao grupo com maior variação no comportamento meiótico, com valores bastante heterogêneos, quando comparado aos demais grupos. Os acessos BGEN-19 e BGEN-68 correspondem aos indivíduos mais regulares, com apenas 7% e 8% de irregularidade, respectivamente, considerando todas as fases da divisão. Por outro lado, no acesso BGEN-81, os índices de irregularidade durante a meiose I e a meiose II superam os valores observados em indivíduos tetraploides e equivalem aos índices encontrados em acessos triploides de *L. alba* (Tabelas 6 e 7). Neste indivíduo, cerca de 70% dos meiócitos contêm algum tipo de irregularidade (Tabela 6). Altos índices de irregularidade (superior a 40%) também podem ser vistos nos acessos BGEN-74, BGEN-66 e BGEN-21. Além disso, foi possível observar que nos indivíduos com 30 cromossomos, os erros são mais frequentes durante a meiose II (58% em média). Com relação às análises de pareamento cromossômico, embora o estágio de diacinese não tenha sido quantificado, foi possível observar a ocorrência de univalentes e associação de homólogos em alguns indivíduos diploides (BGEN-81, BGEN-80, BGEN-65, BGEN-73, e BGEN-48).

Os triploides apresentaram, aproximadamente, 70% de irregularidade. O indivíduo BGEN-37, entretanto se destaca, revelando aproximadamente 90% de meiócitos com irregularidades (Tabela 7). O grupo dos indivíduos tetraploides também mostrou altos índices de falha durante a microsporogênese. Os acessos

BGEN-92, BGEN-45, BGEN-86 e BGEN-87 apresentaram índices de irregularidade próximos de 70% (valores similares aos encontrados em acessos 3x). Os menores percentuais (cerca de 40%) foram observados nos acessos BGEN-03, BGEN-35 e BGEN-64. Adicionalmente as quantificações realizadas com o corante orceína acética, a técnica de FISH também evidenciou irregularidades meióticas durante e microsporogênese dos acessos. As hibridizações fluorescentes *in situ* revelaram distribuição desigual dos cromossomos portadores de sítios CL66 o que, conseqüentemente, resultou em uma segregação aleatória dos sítios com desbalanço numérico de sequências específicas nos gametas formados (Figura 30).

Além as anormalidades meióticas já descritas em trabalhos anteriores com *L. alba*, o processo de citomixia, foi registrado aqui pela primeira vez. O indivíduo tetraploide BGEN-92, em especial, apresentou um elevado índice de citomixia em prófase I (Apêndice – B “High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba*”). Neste acesso, houve troca de material genético entre meiócitos adjacentes em 81% das células em zigóteno (em 167 células analisadas). As análises revelaram meiócitos contendo micronúcleos picnóticos e a presença de cromatina desorganizada, além de células com excesso de material genético e outras com déficit de DNA. Os dados das quantificações do comportamento meiótico para este indivíduo foram reportados no Apêndice - B.

Dentre as irregularidades meióticas observadas, em geral, podemos citar: assincronia entre estágios adjacentes da divisão; migração precoce de cromossomos em metáfases I e II; presença de cromossomos retardados em anáfases I e II; ponte cromossômica; falhas do fuso meiótico; segregação cromossômica desigual e formação de díades, tríades e políades em telófase II. Algumas alterações do comportamento meiótico são ilustradas nas Figuras 29 e 30.

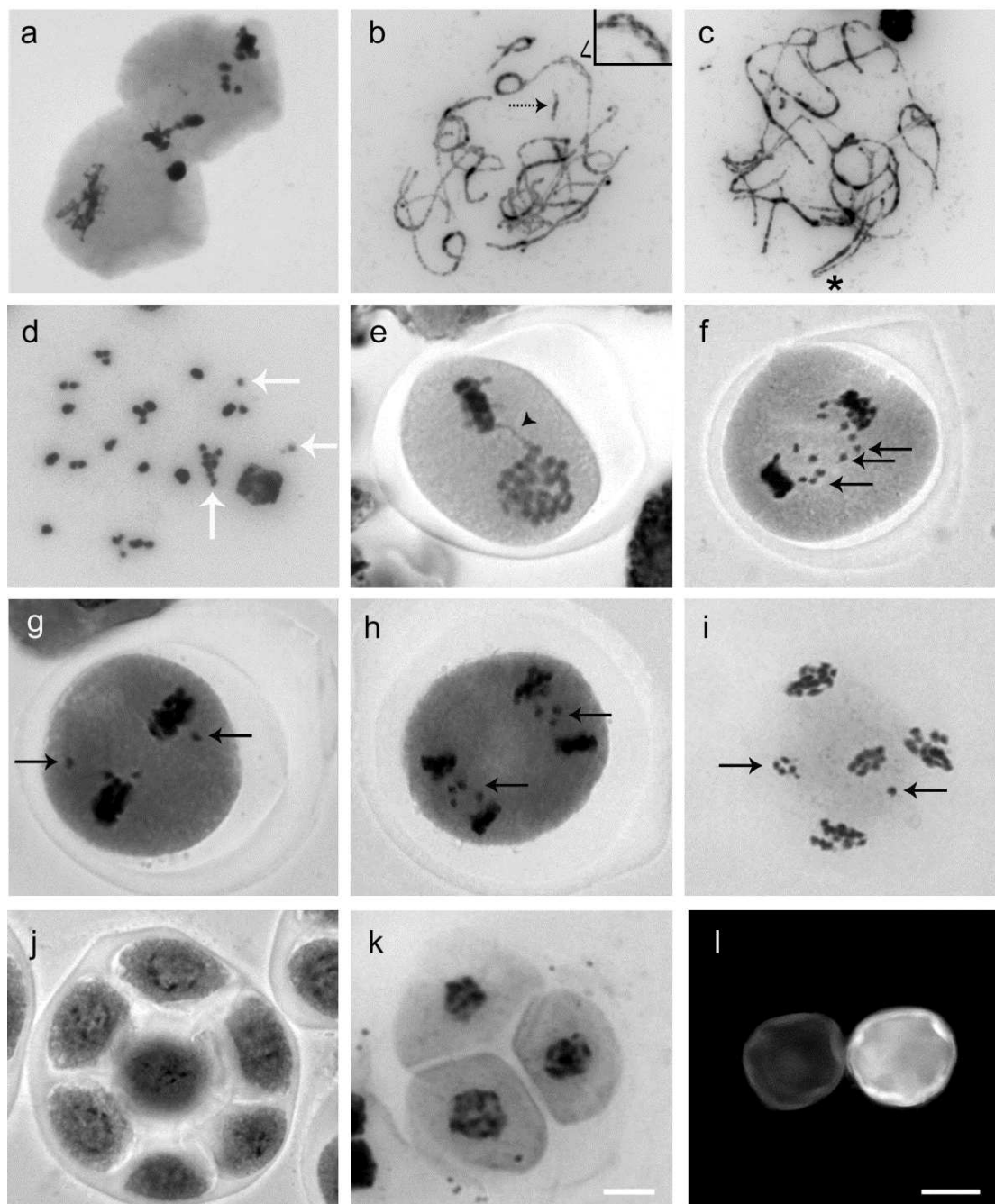


Figura 29: Meiócitos representando algumas das irregularidades observadas durante a microsporogênese de *Lippia alba*. a) citomixia entre meiócitos adjacentes em prófase I; b) paquíteno evidenciando fragmento cromossômico e crossing-over (em detalhe); c) paquíteno evidenciando possível associação entre dois bivalentes (*); d) diacinese com univalentes e multivalentes; e) assincronia entre os estágios de metáfase I e anáfase I; f) anáfase I com segregação cromossômica tardia; (g) metáfase II com cromossomos perdidos; h-i) anáfase II com segregação cromossômica tardia e perdas cromossômicas; j) políade; k) tríade; (l) pólen viável (fluorescente) e inviável (não fluorescente). Seta pontilhada indica fragmento cromossômico; setas brancas univalentes e multivalentes; setas pretas indicam cromossomos perdidos; cabeça de seta indica ponte cromossômica. Barra = 5 μ m (a-k). Barra = 10 μ m (l).

Tabela 6: Comportamento meiótico em 36 acessos diploides de *Lippia alba*. Número de células normais (N), anormais (A) e percentual de anormalidades (% A).

Acessos	METÁFASE I			ANÁFASE I			METÁFASE II			ANÁFASE II TELÓFASE II			TOTAL	IRREGULARIDADES (%)
	N	A	A (%)	N	A	A (%)	N	A	A (%)	N	A	A (%)		
BGEN-02	71	29	29,00	73	27	27,00	59	41	41,00	72	28	28,00	400	31,25
BGEN-05	96	8	7,69	87	15	14,71	19	88	82,24	90	17	15,89	420	30,48
BGEN-09	66	34	34,00	79	21	21,00	38	69	64,49	69	31	31,00	407	38,08
BGEN-13	86	14	14,00	84	15	15,15	56	44	44,00	78	22	22,00	399	23,81
BGEN-19	109	3	2,68	101	4	3,81	91	29	24,17	103	1	0,96	441	8,39
BGEN-20	87	13	13,00	90	17	15,89	48	55	53,40	90	11	10,89	411	23,36
BGEN-21	24	78	76,47	55	54	49,54	56	44	44,00	68	46	40,35	425	52,24
BGEN-29	102	11	9,73	100	8	7,41	41	61	59,80	91	18	16,51	432	22,69
BGEN-40	70	30	30,00	79	21	21,00	68	32	32,00	90	12	11,76	402	23,63
BGEN-44	95	5	5,00	97	9	8,49	72	10	12,20	79	21	21,00	388	11,60
BGEN-46	92	16	14,81	94	11	10,48	93	9	8,82	97	43	30,71	455	17,36
BGEN-48	87	13	13,00	90	14	13,46	80	21	20,79	80	20	20,00	405	16,79
BGEN-53	83	17	17,00	95	5	5,00	78	22	22,00	90	10	10,00	400	13,50
BGEN-56	90	11	10,89	97	5	4,90	72	36	33,33	92	9	8,91	412	14,81
BGEN-58	102	7	6,42	67	17	20,24	83	12	12,63	86	16	15,69	390	13,33
BGEN-65	89	13	12,75	94	9	8,74	66	53	44,54	83	24	22,43	431	22,97
BGEN-66	82	19	18,81	89	12	11,88	37	67	64,42	0	100	100,00	406	48,77
BGEN-67	85	15	15,00	92	11	10,68	74	30	28,85	83	20	19,42	410	18,54
BGEN-68	95	05	5,00	97	9	8,49	72	10	12,20	79	21	21,00	388	11,59
BGEN-71	78	24	23,53	89	11	11,00	76	24	24,00	101	3	2,88	406	15,27
BGEN-72	96	2	2,04	97	5	4,90	25	130	83,87	160	15	8,57	530	28,68
BGEN-73	94	22	18,97	104	3	2,80	72	32	30,77	96	15	13,51	438	16,44
BGEN-74	72	36	33,33	72	30	29,41	10	91	90,10	90	15	14,29	416	41,35
BGEN-75	101	6	5,61	130	11	7,80	125	12	8,76	84	26	23,64	495	11,11
BGEN-77	86	17	16,50	82	12	12,77	70	22	23,91	86	23	21,10	398	18,59
BGEN-78	90	12	11,76	96	34	26,15	96	9	8,57	72	30	29,41	439	19,36
BGEN-80	94	7	6,93	101	23	18,55	108	2	1,82	71	30	29,70	436	14,22

Continuação Tabela 6: Comportamento meiótico em 36 acessos diploides de *Lippia alba*.

BGEN-81	40	67	62,62	24	81	77,14	17	84	83,17	27	82	75,23	422	74,41
BGEN-88	113	37	24,67	139	18	11,46	86	52	37,68	108	4	3,57	557	19,93
BGEN-89	87	15	14,71	90	12	11,76	82	18	18,00	95	5	5,00	404	12,38
BGEN-90	90	21	18,92	96	7	6,80	78	24	23,53	84	19	18,45	419	16,95
BGEN-96	104	12	10,34	94	06	6,0	92	09	8,91	104	04	3,7	425	7,29
BGEN-98	75	30	28,57	114	10	8,06	74	26	26,00	95	8	7,77	432	17,13
BGEN-100	75	35	31,82	66	34	34,00	56	45	44,55	65	45	40,91	421	37,77
BGEN-107	76	26	25,49	78	18	18,75	66	36	35,29	83	18	17,82	401	24,44
BGEN-111	72	28	28,00	76	40	34,48	64	36	36,00	60	40	40,00	416	34,62

Tabela 7: Comportamento meiótico em 24 acessos poliploides de *Lippia alba*. Número de células normais (N), anormais (A) e percentual de anormalidades (% A).

Acessos 3x	Metáfase I			Anáfase I			Metáfase II			Anáfase II Telófase II			Total	Irregularidades (%)
	N	A	A (%)	N	A	A (%)	N	A	A (%)	N	A	A (%)		
BGEN-01	84	16	16,00	26	78	75,00	32	72	69,23	66	36	35,29	410	49,27
BGEN-10	31	74	70,48	5	103	95,37	3	101	97,12	64	49	43,36	430	76,05
BGEN-23	24	78	76,47	14	91	86,67	13	89	87,25	30	89	74,79	428	81,07
BGEN-24	26	62	70,45	34	66	66,00	23	77	77,00	46	66	58,93	400	67,75
BGEN-25	21	79	79,00	19	84	81,55	9	91	91,00	19	92	82,88	414	83,57
BGEN-27	61	41	40,20	34	66	66,00	2	98	98,00	28	72	72,00	402	68,91
BGEN-28	42	58	58,00	48	56	53,85	54	42	43,75	63	40	38,83	403	48,64
BGEN-37	7	92	92,93	13	90	87,38	6	96	94,12	16	92	85,19	412	89,81
BGEN-49	18	84	82,35	42	58	58,00	1	95	98,96	56	44	44,00	398	70,60
BGEN-59	14	87	86,14	30	70	70,00	21	79	79,00	23	78	77,23	402	78,11
BGEN-60	34	71	67,62	18	87	82,86	27	73	73,00	35	82	70,09	427	73,30
BGEN-109	23	87	79,09	16	84	84,00	14	86	86,00	41	63	60,58	414	77,29
Acessos 4x														
BGEN-03	44	61	58,10	63	47	42,73	43	60	58,25	71	32	31,07	421	47,51
BGEN-31	66	34	34,00	78	22	22,00	48	54	52,94	40	60	60,00	402	42,29
BGEN-35	19	84	81,55	84	18	17,65	72	28	28,00	54	48	47,06	407	43,73
BGEN-45	43	57	57,00	45	72	61,54	26	76	74,51	20	80	80,00	419	68,02
BGEN-47	57	45	44,12	19	82	81,19	72	30	29,41	72	31	30,10	408	46,08
BGEN-61	21	79	79,00	61	46	42,99	36	64	64,00	88	12	12,00	407	49,39
BGEN-64	54	57	51,35	77	52	40,31	47	51	52,04	199	46	18,77	583	35,33
BGEN-70	37	63	63,00	64	42	39,62	49	51	51,00	48	54	52,94	408	51,47
BGEN-76	34	66	66,00	66	40	37,74	24	76	76,00	59	41	41,00	406	54,93
BGEN-86	32	68	68,00	42	75	64,10	32	68	68,00	52	106	67,09	475	66,74
BGEN-87	20	84	80,77	42	65	60,75	38	66	63,46	36	67	65,05	418	67,46
BGEN-92	29	80	73,39	68	53	43,80	0	100	100,00	37	186	83,41	553	75,77

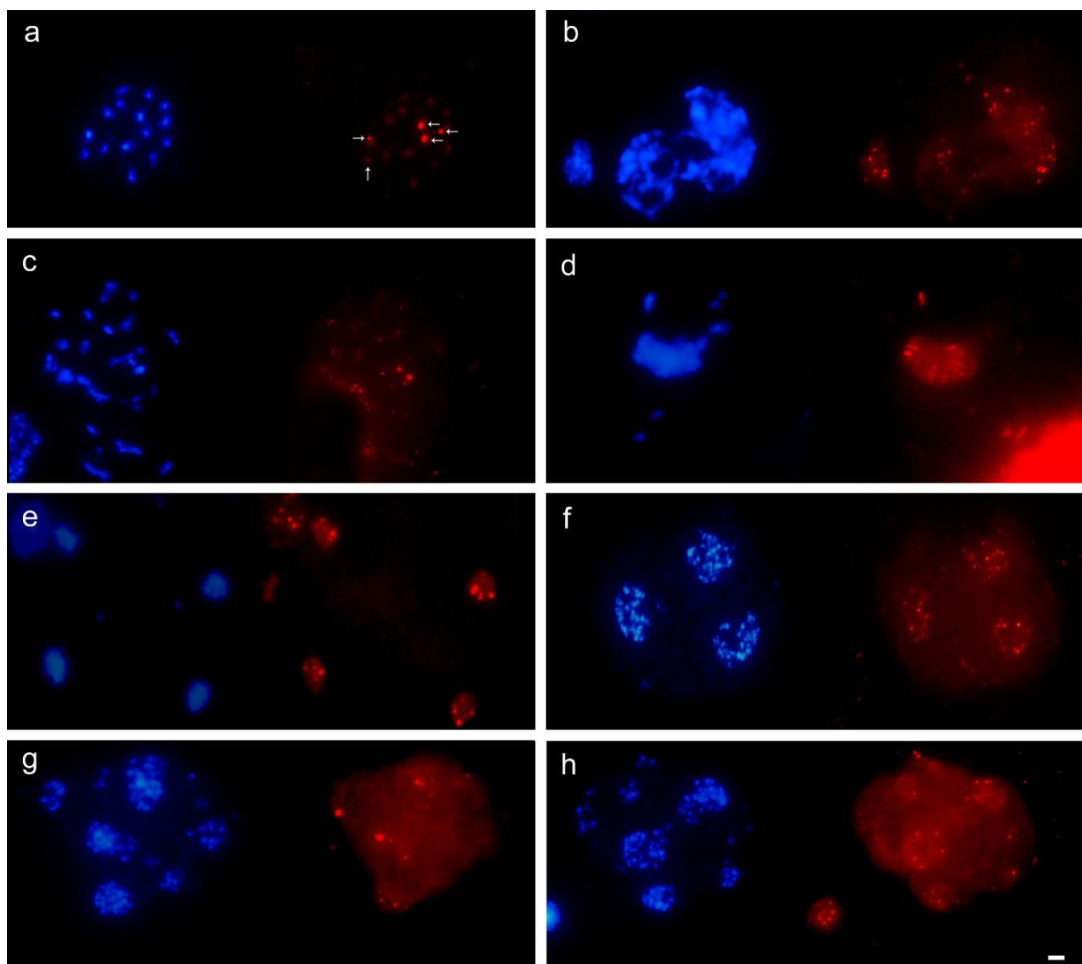


Figura 30: Figuras representativas de meiócitos em diferentes estágios da microsporogênese em *Lippia alba*. À esquerda, coloração com DAPI e à direita cromossomos submetidos à hibridização com a sequência CL66. (a) micrósporo haploide representando o início da formação do grão de pólen com 15 cromossomos; (b) processo de citomixia entre meiócitos adjacentes com distribuição desigual dos sítios CL66; (c) diacinese com configurações de multivalentes em um acesso tetraploide de *L. alba*; (d) metáfase I com perda cromossômica; (e) telófase II com perda cromossômica e distribuição desigual de sítios CL66; (f) tríade originando micrósporos com números desbalanceados de sítios CL66; (g,h) políades com perdas cromossômicas e distribuição desigual de sítios CL66 ao final da divisão. Barra = 5µm.

4.4.2 VIABILIDADE POLÍNICA

Os resultados obtidos a partir da coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) revelaram consideráveis índices de inviabilidade polínica nos três níveis de ploidia investigados. Dentre os indivíduos com 30 cromossomos, os maiores percentuais de inviabilidade polínica podem ser observados nas plantas BGEN-21, BGEN-78 e BGEN-81 (Tabela 8). Por outro lado, os acessos BGEN-19, BGEN-29 e BGEN-65 apresentaram altos níveis de pólen aptos à germinação. Em média, os acessos diploides apresentaram 34,20% de inviabilidade polínica. Já os acessos triploides, mostraram os maiores valores de pólen inviáveis, em média, acima de 60% dos grãos foram considerados mortos ou sem conteúdo celular. Elevados índices de inviabilidade no grupo dos triploides podem ser observados nos acessos BGEN-27 (77,36%) e BGEN-59 (74,75%).

Os tetraploides, por sua vez, revelaram uma ampla heterogeneidade com relação ao teste de viabilidade polínica (Tabela 9). Neste grupo, alguns acessos apresentaram percentuais baixos, equivalentes aos índices documentados em indivíduos diploides, enquanto, outros acessos revelaram percentuais comparáveis à inviabilidade de triploides de *L. alba*, como pode ser observado no acesso BGEN-92, por exemplo. Em contrapartida, os indivíduos BGEN-76, BGEN-45 e BGEN-64 estão entre os acessos que possuem melhores chances de germinação de pólen. Em média, metade da produção dos grãos nos acessos tetraploides (51,65%) foi considerada adequada e apta à germinação do tubo polínico.

A Figura 31 ilustra os percentuais de irregularidades meióticas e inviabilidade polínica nos 60 acessos investigados.

Tabela 8: Parâmetros de viabilidade polínica em acessos diploides de *Lippia alba* pelo teste de Diacetato de Fluoresceína (FDA).

Acessos	Número de pólenes viáveis	Número de pólenes inviáveis	Inviabilidade polínica (%)	Número total de grãos de pólen
BGEN-02	723	277	27,70	1000
BGEN-05	751	249	24,90	1000
BGEN-09	770	307	28,51	1077
BGEN-13	640	360	36,00	1000
BGEN-19	811	189	18,90	1000
BGEN-20	731	271	27,05	1002
BGEN-21	421	579	57,90	1000
BGEN-29	782	218	21,80	1000
BGEN-40	493	520	51,33	1013
BGEN-44	662	338	33,80	1000
BGEN-46	742	258	25,80	1000
BGEN-48	724	276	27,60	1000
BGEN-53	759	260	25,52	1019
BGEN-56	722	278	27,80	1000
BGEN-58	751	270	26,44	1021
BGEN-65	842	158	15,80	1000
BGEN-66	733	300	29,04	1033
BGEN-67	672	328	32,80	1000
BGEN-68	688	450	39,54	1138
BGEN-71	722	318	30,58	1040
BGEN-72	578	363	38,58	941
BGEN-73	733	300	29,04	1033
BGEN-74	781	219	21,90	1000
BGEN-75	572	428	42,80	1000
BGEN-77	452	448	49,78	900
BGEN-78	330	707	68,18	1037
BGEN-80	757	243	24,30	1000
BGEN-81	404	726	64,25	1130
BGEN-88	550	457	45,38	1007
BGEN-89	807	218	21,27	1025
BGEN-90	547	453	45,30	1000
BGEN-96	673	327	32,70	1000
BGEN-98	732	350	32,35	1082
BGEN-100	527	473	47,30	1000
BGEN-107	798	202	20,20	1000
BGEN-111	661	423	39,02	1084

Tabela 9: Parâmetro de viabilidade polínica em acessos triploides e tetraploides de *Lippia alba* pelo teste de Diacetato de Fluoresceína (FDA)

Acessos	Número de pólenes viáveis	Número de pólenes inviáveis	Inviabilidade polínica (%)	Número total de grãos de pólen
Acessos 3x				
BGEN-01	471	529	52,90	1000
BGEN-10	478	532	52,67	1010
BGEN-23	291	709	70,90	1000
BGEN-24	484	547	53,06	1031
BGEN-25	380	680	64,15	1060
BGEN-27	233	796	77,36	1029
BGEN-28	372	632	62,95	1004
BGEN-37	616	384	38,40	1000
BGEN-49	393	662	62,75	1055
BGEN-59	255	755	74,75	1010
BGEN-60	359	646	64,28	1005
BGEN-109	561	672	54,50	1233
Acessos 4x				
BGEN-03	584	416	41,60	1000
BGEN-31	600	433	41,92	1033
BGEN-35	343	733	68,12	1076
BGEN-45	791	209	20,90	1000
BGEN-47	550	457	45,38	1007
BGEN-61	551	403	42,24	954
BGEN-64	675	350	34,14	1025
BGEN-70	419	629	60,02	1048
BGEN-76	578	320	35,63	898
BGEN-86	506	494	49,40	1000
BGEN-87	427	573	57,30	1000
BGEN-92	139	930	87,00	1069

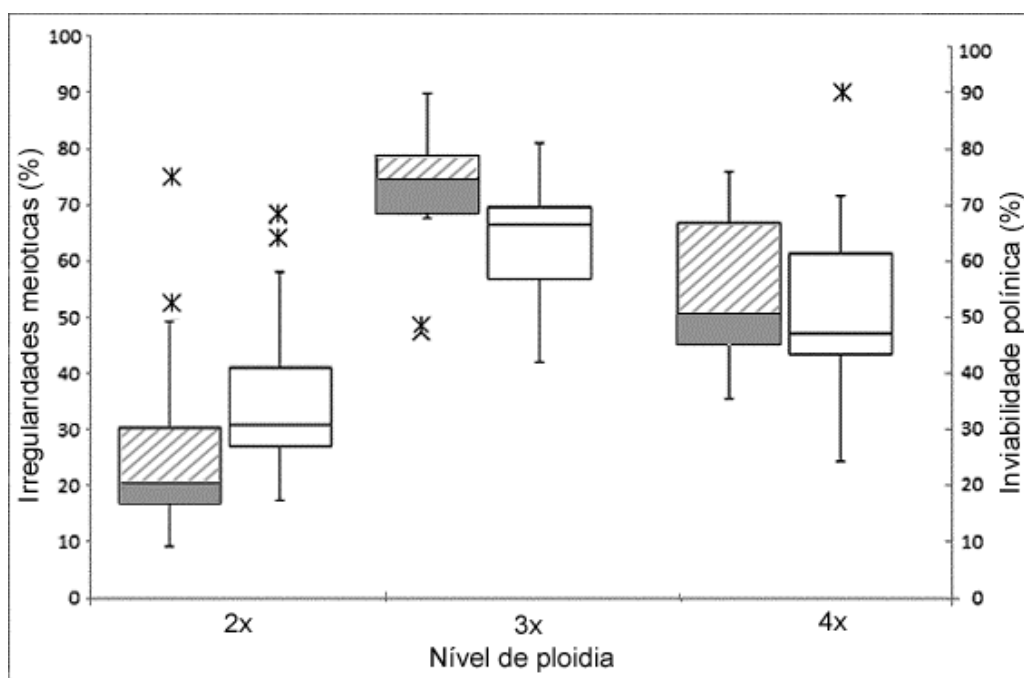


Figura 31: Variação do percentual de irregularidade meiótica (caixas em tons de cinza) e variação do percentual de inviabilidade polínica (caixas brancas) em acessos diploides, triploides e tetraploides de *Lippia alba*.

5 DISCUSSÃO

5.1 SEQUÊNCIAS REPETITIVAS NO GENOMA DE *L. alba*

Em *L. alba* as informações sobre mapeamentos cromossômicos de sequências repetitivas se limitam aos marcadores cromossômicos universais (como as sondas de DNAr) e pouco foi explorado sobre outras classes de repetição (REIS et al., 2014). No presente trabalho, as análises oriundas do sequenciamento genômico proporcionaram uma visão global sobre as diferentes classes de sequências repetitivas que constituem o genoma da espécie, e permitiu a identificação de arranjos repetitivos até então desconhecidos, e, portanto, ainda inexplorados. Os dados revelaram que o genoma de *L. alba* é composto por 44,4% de diferentes classes de sequências repetitivas. Em plantas, estudos de mapeamento de sequências satélites têm viabilizado caracterizações cariotípicas mais refinadas, auxiliando na detecção de importantes passos evolutivos, sobretudo em poliploides (BUGGS et al., 2012; RENNY-BYFIELD et al., 2012; CHESTER et al., 2013).

Em *L. alba*, nenhuma descrição sobre famílias de DNA satélite foi relatada até o momento. Este trabalho corresponde ao primeiro estudo sobre a identificação e o mapeamento cromossômico de repetições satélite específicas para a espécie, e visou contribuir com novas informações cariotípicas para a espécie e para o gênero *Lippia*. A princípio, cinco grandes arranjos de repetições foram explorados, a fim da obtenção de marcadores cromossômicos. Destes, quatro sequências apresentaram êxito no processo de hibridização fluorescente *in situ*, e dois arranjos (CL66 e CL98) tornaram-se bons marcadores citogenéticos e contribuíram para um melhor conhecimento do genoma. Os resultados também validaram a obtenção de marcadores por meio do sequenciamento paralelo em massa seguido pela técnica de FISH em uma espécie silvestre, viabilizando estudos genômicos futuros em mais espécies do gênero e da família.

Além disso, os mapas citogenéticos revelaram que, embora as repetições apresentassem uma distribuição específica nos cromossomos (ambas localizadas preferencialmente nas extremidades cromossômicas), o comportamento das repetições foi distinto. A repetição CL66, por exemplo, apresentou um padrão bastante variável nos diferentes indivíduos, enquanto a sequência CL98 mostrou um perfil de hibridização uniforme nos diversos cariótipos. Este fato possibilitou discutir alguns aspectos importantes sobre o comportamento de diferentes repetições satélites no genoma de *L. alba* e o dinamismo genômico da espécie. Entretanto, a fim de entender a plasticidade genômica e documentar os eventuais rearranjos cromossômicos ocorridos durante a formação do complexo, as análises de mapeamento cromossômico foram ampliadas para mais acessos (Capítulo 2), como discutido em seguida.

5.2 MAPEAMENTO DA REPETIÇÃO CL98 REFORÇA A HIPÓTESE INICIAL DE AUTOPOLIPLOIDIA EM *L. alba*

Famílias de DNA satélites são consideradas partes dinâmicas de genomas eucariotos e sujeitas a muitas variações ao longo do tempo (PLOHL et al., 2008; UGARKOVIC e PLOHL, 2002). Dentre as diversas famílias de DNA satélites encontradas nos genomas, os arranjos localizados nas porções terminais dos cromossomos, em especial, constituem os sítios mais susceptíveis às alterações estruturais, uma vez que esta região é considerada um *hotspot* para rearranjos cromossômicos (HEITKAM et al., 2015; RICHARD et al., 2013; TORRES et al., 2011). Entretanto, apesar da maioria das repetições satélites serem propícias a muitas variações, alguns arranjos são menos dinâmicos e permanecem com a mesma organização por longo tempo (BISCOTTI et al., 2015; CAFASSO e CHINALI, 2014; MEHROTRA et al., 2014a; QUESADA DEL BOSQUE et al., 2013, 2014). Arranjos como estes constituem partes importantes dos genomas e podem desempenhar papéis funcionais, sendo conservados ao decorrer das gerações.

Embora o significado evolutivo dessas famílias de DNA satélite tenha sido debatido a longo tempo (LAPITAN, GANAL e TANKSLEY, 1989; PICH et al., 1996;

MEHROTRA et al., 2014A; 2014B; GARRIDO-RAMOS, 2015), suas funções nos genomas ainda não são claras (PICH et al., 1996; GARRIDO-RAMOS, 2015) e crescentes esforços voltados à elucidação do potencial dessas sequências nos genomas têm sido realizados. Nos últimos anos, a era pós genômica tem viabilizado a identificação e a caracterização de diversas famílias de DNA satélites, e os mapas citogenéticos disponibilizam importantes informações sobre a origem e evolução dessas sequências (BUGGS et al., 2012; CHESTER et al., 2013; RENNY-BYFIELD et al., 2012; HEITKAM et al., 2015). Os estudos apontam que tais famílias podem estar relacionadas à (1) manutenção e formação da heterocromatina; (2) à organização do cinetócoro e dos centrômeros; (3) ao pareamento cromossômico e segregação dos homólogos na meiose e (4) ao controle da expressão gênica, por meio da síntese de pequenos RNAs interferentes (HAMMOND et al., 2001; MARTIENSSEN 2003; PLOHL et al., 2008; MEHROTRA e GOYAL 2014; BISCOTTI et al., 2015; GARRIDO-RAMOS 2015). Sequências como estas seriam conservadas nos genomas e poucas variações ocorreriam ao longo do tempo.

Em *L. alba*, o mapeamento da repetição CL98 revelou que este arranjo consiste em uma sequência menos dinâmica e submetida à pouca alteração. O mapeamento desta repetição revelou um padrão de hibridização similar nos diferentes acessos do complexo. Todos os sítios foram localizados nas extremidades cromossômicas e apresentaram intensidade de brilho semelhante. Isto indica que o número de cópias de repetição integrando o arranjo CL98 é aproximadamente o mesmo nos diferentes sítios. Estudos indicam que sequências repetitivas com baixo número de cópias são mais homogêneas e evoluem lentamente, ao passo que, repetições com elevado número de cópias possuem altas taxas de mutação (GARRIDO-RAMOS, 2015; MEHROTRA e GOYAL, 2014). É possível que o arranjo CL98 corresponda a uma sequência com grande homogeneidade e/ou consista em uma porção funcionalmente importante do cromossomo, mantendo sua organização estável nos diferentes acessos ao longo do tempo.

Além da estabilidade na dimensão e posição dos sítios, o número de sinais CL98⁺ também se manteve constante e proporcional aos níveis de ploidia nos diferentes acessos. Em geral, apenas um sítio CL98⁺ foi encontrado no complemento monoploide de *L. alba* ($x=15$). A maioria dos acessos diploides apresentaram dois cromossomos contendo o sítio CL98, enquanto os triploides,

tetraploides e hexaploide exibiram 3, 4 e 6 cromossomos contendo o arranjo CL98⁺, respectivamente. Alguns acessos (principalmente triploides) apresentaram sítios CL98⁺ adicionais, distribuídos próximos aos telômeros de outros cromossomos do complemento. Entretanto, os sítios mostraram-se inconspícuos com fracos sinais de hibridização. Isto pode ser devido a mecanismos recentes de amplificação do DNA satélite CL98, os quais originaram novos sítios em posições correspondentes em outros cromossomos do complemento. De acordo com Schweizer e Loidl (1987) porções de heterocromatina terminais podem ser amplificadas em regiões correspondentes em cromossomos não homólogos (conceito de “equilocality of heterochromatin”) e os sítios recém-formados exibem pouca intensidade de brilho devido à extensão reduzida das repetições. Por outro lado, foi possível observar redução do número de sítios, como no caso do tetraploide BNGEN-31, que revelou de forma única, apenas três sinais CL98⁺. Este número inferior pode ser devido a eliminações de sequências repetitivas, ocorridas após a duplicação genômica. Amplificação e contração de famílias de DNA satélites correspondem a processos comuns durante a evolução das sequências e revelam, muitas vezes, o dinamismo das repetições e a capacidade de reestruturação dos genomas (GARRIDO-RAMOS, 2015; MEHROTRA e GOYAL, 2014).

No entanto, embora pequenas diferenças no perfil de distribuição da repetição satélite CL98 tenham sido observadas entre os acessos, a uniformidade dos resultados reforça a hipótese de autoploidia na formação do complexo poliploide *L. alba*. Considerando que apenas um sítio CL98⁺ foi observado no complemento monoploide de *L. alba* ($x=15$) e este padrão foi o mesmo para a maioria dos indivíduos do complexo (independente do nível de ploidia), provavelmente as duplicações cromossômicas ocorridas não interferiram na estrutura e na organização deste arranjo. Assim, os poliploides mantiveram o mesmo perfil dos parentais diploides. Em aloploidos de *Nicotiana* poucas modificações na distribuição de repetições satélites foram constatadas após a poliploidização, revelando a estabilidade de famílias satélites após a duplicação genômica (LIM et al., 2005; 2006). Em *L. alba*, um estudo anterior relatou a presença de *clusters* uniformes integrando o genoma da espécie (REIS et al., 2014). Os autores evidenciaram a estabilidade no número e a posição dos genes ribossomais 5S entre os cinco citótipos, indicando que partes específicas do genoma podem permanecer inalteradas após a poliploidia. Todos os genes ribossomais 5S foram mapeados na

posição subterminal, embora diferenças na morfometria cromossômica tenham sido relatadas, como observado aqui para o arranjo CL98. Isto indica a presença de alterações estruturais em outras porções cromossômicas.

Em adição, a uniformidade do arranjo CL98 nos diferentes cariótipos de *L. alba* também pode ser explicada pela origem recente desta repetição satélite ou ainda, pelo fato de *L. alba* se tratar de um complexo poliploide recém-formado, como proposto para tetraploides de *Curcubita*, *Tragopogon* e *Nicotiana* (LIM et al., 2000; PIRES et al., 2004; LIM et al., 2008). Deste modo, os indivíduos poliploides compartilhariam o mesmo perfil de sítios CL98 observado em parentais diploides de *L. alba*.

5.3 PLASTICIDADE GENÔMICA EM *L. alba* EVIDENCIADA PELA REPETIÇÃO SATÉLITE CL66

O genoma de *L. alba* tem sido caracterizado como plástico e bastante dinâmico (SOUSA et al., 2009; PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014; VICCINI et al., 2014; REIS, SOUSA e VICCINI, 2016). Os estudos ressaltam diferenças no conteúdo de DNA, nas descrições cariotípicas e no comportamento meiótico. Entretanto, as análises se restringiram a poucos acessos do complexo e a extensão das variações cariotípicas entre os indivíduos com mesmo número cromossômico foi pouco explorada. No presente trabalho, as análises citogenéticas da repetição CL66 corroboraram esta grande variação cariotípica, previamente mencionada, e ressaltaram uma nova perspectiva sobre a dinâmica do genoma nos diferentes acessos do complexo.

O mapeamento da sequência satélite CL66 revelou diferentes perfis cariotípicos para a espécie, com variações no número de sítios e na dimensão dos arranjos CL66. Tais polimorfismos têm sido relatados para repetições satélites em várias espécies vegetais (RICHARD et al., 2013; HEITKAM et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). No complexo *L. alba*, alguns indivíduos apresentaram 10 cromossomos marcados, enquanto outros, possuíram um número máximo de 24 cromossomos portadores do sítio CL66⁺. Além disso, os resultados indicaram diferenças

cariotípicas entre os acessos com o mesmo nível de ploidia, revelando que as variações não se restringem apenas aos diferentes citótipos, mas também a indivíduos com o mesmo número cromossômico. Isto reflete o comportamento dinâmico desta sequência repetitiva e revela que grandes rearranjos estruturais também são fontes de variação em *L. alba*, sugerindo que o genoma da espécie possa ser mais plástico do que se pensava anteriormente. Alterações estruturais em regiões de DNA satélites são frequentes em híbridos e poliploides e subsidiam importantes questões sobre a reorganização genômica pós-poliploidização (PIRES et al., 2004; BUGGS et al., 2012; CHESTER et al., 2013).

Em geral, os resultados mostraram que os acessos com nível de ploidia superior (4x e 6x) exibiram menor número de sítios CL66⁺ que o esperado, assumindo o nível diploide como referência o qual apresentou mais frequentemente cinco cromossomos marcados no complemento monoploide (x=15). O indivíduo hexaploide, por exemplo, apresentou apenas 20 cromossomos marcados com a sonda CL66 e alguns tetraploides apresentaram a mesma quantidade de sítios observada em acessos diploides (10 sítios CL66⁺). Esta inferioridade numérica pode ser devida a eliminações de DNA repetitivo ocorridas após a duplicação genômica. Dados similares já foram descritos para os genes ribossomais 18S em *L. alba* e ratificam os resultados aqui obtidos (REIS et al., 2014). Os citótipos 4x e 6x exibiram quantidade menor de *loci* ribossomais 18S, comparado ao citótipo 2x, indicando que perdas de sítios de DNA repetitivo e eliminação de sequências são eventos recorrentes em genomas poliploides de *L. alba*. A literatura mostra que em indivíduos com altos níveis de ploidia, o DNA genômico em excesso pode ser dispensável e, portanto, eliminado do núcleo ao longo do tempo, caracterizando o fenômeno conhecido como “genome downsizing” (GRANT, 1969; BOYKO et al., 1984; RAINA et al., 1994; OZKAN, TUNA, e ARUMUGANATHAN, 2003; LEITCH e BENNETT, 2004; HAN et al., 2005; KOH, SOLTIS e SOLTIS, 2010). Aproximadamente 10-15% do genoma pode ser reduzido após a duplicação, sendo as porções não codificantes, principalmente as sequências de DNA satélites, as repetições mais susceptíveis às eliminações (OZKAN et al., 2001; HEMLEBEN et al., 2007; RENNY-BYFIEL et al., 2011). Em tetraploides e hexaploides de trigo, por exemplo, a família subtelomérica de DNA satélites *Spelt 1* foi consideravelmente reduzida após a poliploidização (PESTSOVA, GONCHAROV e SALINA, 1998). Híbridos e aloploides do complexo *Aegilops-Triticum* também apresentaram

redução de 5-14% de DNA satélite (OZKAN et al., 2001). Em *L. alba*, os dados obtidos a partir do mapeamento cromossômico da repetição CL66 sugerem a ocorrência de deleções de sítios nos citótipos tetraploide e hexaploide. De fato, análises sobre estimativas do conteúdo de DNA e morfometria cromossômica confirmam a redução na quantidade de DNA total e do comprimento dos cromossomos em acessos com nível de ploidia superior (REIS et al., 2014). Isto sugere que as eliminações sejam mais acentuadas nos citótipos 4x e 6x, e a que sequência satélite CL66 corresponda a um arranjo susceptível à eliminação após a duplicação genômica.

Além das eliminações de sequências, o polimorfismo dos sítios CL66 pode ser ocasionado por alterações cromossômicas estruturais, capazes de amplificar e expandir as repetições para outros cromossomos do complemento. Dentre os mecanismos em potencial capazes de incrementar o número de cópias de repetição podemos citar: 1) crossing over desigual; 2) duplicação de segmentos por meio de anelamento desigual da dupla-fita de DNA; 3) “*slippage*” da DNA polimerase; 4) recombinação entre extremidades cromossômicas não homólogas (recombinação ilegítima) e 5) replicação em círculo rolante, no qual há a excisão da sequência e a circularização, com a subsequente replicação e reinserção da repetição no genoma (mecanismo menos comum) (MEHROTRA e GOYAL 2014). Todos estes mecanismos possibilitam aumentar o número de cópias de repetição dentro do mesmo arranjo e/ou expandir o número de sítios de repetições para outras partes do genoma (MEHROTRA e GOYAL 2014). O incremento de unidades de repetição no mesmo arranjo pode ser evidenciado pela intensidade do brilho dos sinais da FISH e/ou pela dimensão das marcas. Assim, em *L. alba*, as diferenças de brilho nos sinais CL66 observadas entre os cromossomos podem ser consequência de ampliações inter-*locus* e intra-*locus*, as quais são capazes de aumentar o número de cópias de repetição e originar “landmarks” próprios para cada cariótipo. É possível que mecanismos como estes estejam atuando, de maneira independente e múltiplas vezes, nos diferentes cariótipos de *L. alba*. Isso, conseqüentemente, acentuaria as diferenças entre os conjuntos cromossômicos e originaria os diversos perfis cariotípicos observados do complexo.

Além de gerar diferenças entre os conjuntos cromossômicos, tais mecanismos, muitas vezes, causam diferenças entre os homólogos do mesmo complemento. Em *Phaseolus vulgaris*, mecanismos de recombinação envolvendo

regiões subteloméricas de cromossomos não homólogos resultaram na amplificação de sítios e na divergência de cromossomos homólogos (RICHARD et al., 2013). Em cromossomos de *Arabidopsis thaliana*, mecanismos de recombinação ilegítima também foram responsáveis por resultar em variação entre os homólogos (WANG et al., 2010). Em *L. alba*, as diferenças observadas entre os cromossomos sugerem que mecanismos de amplificação/deleção tenham ocorrido de maneira desigual entre os homólogos, acentuando as diferenças entre eles. Isto resulta em heteromorfismos (como observado para alguns cromossomos dos cariótipos dos acessos diploides).

Alternativamente, a presença de apenas um cromossomo do par de homólogos em alguns cariótipos, associada ao número reduzido de sinais CL66⁺ também podem ser interpretados como evidência de aneuploidia compensada. Nestes casos, embora o cariótipo apresente o número somático esperado, a constituição cariotípica é desbalanceada, ou seja, com cópias extras de certos homólogos e ausência de outros (CHESTER et al., 2011), o que pode comprometer o pareamento regular na meiose, como registrado em populações aloploides de *Tragopogon miscellus*. A aneuploidia compensada pode interferir na herança de caracteres associados aos cromossomos univalentes ou extras e na fixação alélica, e assim, influenciar na evolução de neopoliploides (CHESTER et al., 2011). Esta característica singular no cariótipo de alguns espécimes de *L. alba* foi apresentada como hipótese pela primeira vez neste trabalho, e pode ser consequência de cruzamentos envolvendo gametas desbalanceados.

5.4 O SÍTIO INTERSTICIAL CL66: UM MARCADOR CROMOSSÔMICO PARA *L. alba*

Adicionalmente aos sítios terminais encontrados no complexo *L. alba*, o mapeamento da repetição CL66 revelou uma marca intersticial bastante evidente, localizada em um dos maiores cromossomos do conjunto. Este sítio foi comum a todos os acessos investigados, e tornou-se um bom marcador citogenético para a detecção de rearranjos estruturais em diversos indivíduos. Na maioria dos cariótipos,

o sítio intersticial foi localizado na posição distal em braços cromossômicos longos. No entanto, os dados de morfometria cromossômica evidenciaram diferenças nas medidas e morfologia do cromossomo portador deste sítio, e vários perfis para este cromossomo foram encontrados. Em alguns casos, além da marca intersticial, pequenos sítios terminais também foram observados, às vezes, em ambos os braços, sugerindo a amplificação dos arranjos em posições terminais. Além disso, frequentemente o sítio intersticial foi mapeado em braços curtos, indicando rearranjos estruturais em outras porções cromossômicas, capazes de alterar o comprimento dos braços. Isto pode ser constatado quando comparamos o índice de heterogeneidade cromossômica entre os acessos.

Além das alterações na posição do sítio, a intensidade e o comprimento das marcas também variaram consideravelmente, sugerindo a amplificação e a redução na unidade de cópias de repetição CL66. Contudo, as variações não se restringiram apenas aos diferentes cariótipos, mas diferenças entre os homólogos do mesmo conjunto cromossômico também foram notificadas, independentemente do nível de ploidia (como pode ser visto nos acessos BGEN-64, BGEN-92 e BGEN 59, entre outros). Estes dados, mais uma vez, são indicativos de mecanismos que atuam de maneira desigual entre os homólogos, processos frequentemente observado em genomas de neopoliploides e que contribuem, em longo prazo, para a diploidização genômica (DODSWORTH, CHASE e LEITCH 2015). Além disso, todas estas variações indicam que a reorganização do genoma (mediante a poliploidia) e a evolução cromossômica de *L. alba* envolvem grandes alterações cromossômicas estruturais, além das alterações numéricas já constatadas (REIS et al., 2014). Tais mecanismos têm contribuído para o surgimento de perfis cariotípicos próprios e para o aumento dos polimorfismos entre os indivíduos, como foi proposto para *Tragopogon miscellus* (SOLTIS e SOLTIS 2009).

Relatos anteriores revelaram que muitas famílias de DNA satélite possuem forte conexão com as extremidades cromossômicas, consistindo em sequências associadas à região telomérica (KENTON et al., 1993; BRANDES, RODER e GANAL, 1995; VERSHININ, SCHWARZACHER e HESLOP-HARRISON, 1995; CHENG et al., 2001). Dentre as espécies que apresentam famílias satélites associadas aos telômeros estão *Oryza sativa* (CHENG et al., 2001), *Zea mays* (LI et al., 2009), *Nicotiana tabacum* (KENTON et al., 1993), *Hordeum vulgare* (BRANDES et al., 1995), *Secale cereale* (Vershinin et al., 1995), *Silene latifolia* (BŮZEK et al.,

1997), *Beta vulgaris* (DECHYEVA e SCHMIDT, 2006), *Solanum lycopersicum* (LAPITAN, GANAL e TANKSLEY, 1989; ZHONG et al., 1998) e *Solanum tuberosum* (TANG et al., 2014; TORRES et al., 2011) entre outras. Geralmente, tais sequências estão presentes em todos os braços cromossômicos, mas algumas repetições podem estar associadas às extremidades cromossômicas específicas, como acontece em *Nicotiana plumbaginifolia* (CHEN et al., 1997). No presente trabalho, embora não possamos afirmar que a repetição CL66 tenha associação com os telômeros, o mapeamento cromossômico indica que este arranjo localiza-se nas extremidades cromossômicas e, como consequência, qualquer alteração na posição desta marca sugere rearranjos.

Assim, visto que o arranjo CL66 é predominantemente localizado em porções cromossômicas terminais, a presença de sítios CL66⁺ intersticiais pode indicar a ocorrência de: 1) uma inversão terminal que realocou o arranjo para a posição intersticial ou 2) uma translocação, a qual moveu o arranjo da posição terminal para a parte intercalar de outro cromossomo. Provavelmente, esta alteração aconteceu em um cariótipo basal de *L. alba*, e corresponde a uma característica plesiomórfica, comum a todos os indivíduos do complexo, independente do número cromossômico. Entretanto, a fim de esclarecer a origem deste sítio, mais indivíduos de *L. alba* e espécies próximas devem ser mapeados quanto à repetição CL66.

5.5 VARIAÇÃO CARIOTÍPICA EM DIPLOIDES DE *L. alba*

Embora a plasticidade genômica de *L. alba* já tenha sido documentada, nossas análises citogenéticas revelaram que as variações cariotípicas são mais amplas, e não se limitam apenas aos diferentes grupos cromossômicos do complexo. Esta enorme plasticidade pode ser comprovada através das variações existentes entre os acessos com mesmo nível de ploidia. Diferenças entre populações poliploides são esperadas, já que múltiplos eventos de duplicação genômica podem ocorrer de maneira independente e podem originar diferentes linhagens poliploides (SOLTIS e SOLTIS, 2009; SOLTIS et al., 2009; MAVRODIEV et al., 2015). Além disso, os variados processos envolvidos na reestruturação

genômica após a poliploidia também podem gerar diferenças cariotípicas entre os poliploides e determinar perfis cariotípicos próprios (como foi observado aqui para os acessos com 38, 45 e 60 cromossomos). Todavia, quando indivíduos referidos como diploides apresentam polimorfismos cromossômicos podemos presumir que os rearranjos estruturais não se restringem aos eventos de duplicação genômica, mas constituem mecanismos comuns na reestruturação do genoma de *L. alba*. As análises cariotípicas dos acessos diploides destacaram intrigantes aspectos sobre a organização e a estabilidade genômica da espécie e revelaram que *L. alba* possui o genoma bastante dinâmico e plástico, inclusive em indivíduos para os quais se esperaria um comportamento cromossômico estável, comparativamente aos poliploides. Estas variações indicam que, possivelmente, alguns acessos considerados diploides correspondam, na verdade, a indivíduos poliploides, os quais ainda estão em processo de diploidização genômica, o que justificaria os diferentes perfis cariotípicos encontrados entre os acessos com trinta cromossomos.

As descrições cariotípicas dos acessos 2x mostraram consideráveis diferenças quanto ao número e dimensão de sítios CL66. Alguns acessos apresentaram 10 cromossomos marcados com a repetição CL66, enquanto outros evidenciaram 16 e 18 cromossomos com sítios CL66⁺. Contudo, a maioria dos acessos investigados exibiu cerca de 10 a 12 sítios, indicando que o número inferior de sítios seja mais comum em diploides. Assim, os cariótipos compostos por mais de 12 cromossomos marcados poderiam ser resultado de ampliações de sequências satélites. Em contrapartida, se assumirmos que o número superior de sítios corresponde a uma característica plesiomórfica, as deleções de sítios CL66 deveriam ocorrer em diploides e em poliploides de *L. alba*, sendo as eliminações ainda mais acentuadas em indivíduos com maior nível de ploidia (4x e 6x). Entretanto, quando analisamos os resultados do mapeamento cromossômico da repetição CL98, a fim de auxiliar no entendimento sobre a dinâmica de famílias satélites no genoma de *L. alba*, os resultados corroboram a hipótese de que sequências repetitivas foram ampliadas no genoma. Dessa forma, os sítios “adicionais” corresponderiam a um carácter sinapomórfico em diploides. O mapeamento do arranjo CL98 mostrou que, embora esta repetição tenha o comportamento estável, em alguns casos, há o incremento de sítios CL98 em cariótipos diploides. Isto reforça a hipótese de aumento de sequências satélites em alguns acessos 2x, consistindo em caracteres genômicos mais recentes.

Ainda com relação ao mapeamento da sonda CL66, o sítio intersticial também possibilitou inferir a ocorrência de alterações cromossômicas em acessos com $2n=30$. O indivíduo BGEN-57, por exemplo, revelou uma proeminente marca no braço longo em dois cromossomos homólogos (mais conspícua dentre todos os diploides). Todavia, os sítios foram localizados em posições distintas: em um homólogo o sítio foi mapeado na extremidade cromossômica, enquanto no outro, a marca CL66 foi encontrada na porção original (região intersticial do cromossomo). As medidas morfométricas sugerem heteromorfismo, originada por uma possível perda da porção terminal do braço longo em apenas um cromossomo do par.

Alguns indivíduos $2x$ também apresentaram o sítio intercalar nos braços curtos, como observado para alguns poliploides. Os índices de heterogeneidade cromossômica confirmam a presença de rearranjos. O acesso BGEN-53, por exemplo, apresentou menor valor de A_i dentre todos os diploides ($A_i=0,04$), o que caracteriza um padrão mais simétrico para este cromossomo, ou seja, com o centrômero localizando-se na porção mediana. Em contrapartida, este mesmo cromossomo no acesso BGEN-68 foi caracterizado como submetacêntrico com alto índice de heterogeneidade ($A_i=0,44$), comparativamente ao observado no acesso BGEN-53. Estas variações evidenciam a presença de rearranjos estruturais em outras partes cromossômicas, capazes de gerar consideráveis alterações na morfologia dos cromossomos.

Outra característica intrigante observada em alguns diploides de *L. alba* foi a falta de similaridade entre os pares cromossômicos do complemento. Em alguns acessos, embora as células somáticas apresentassem $2n=30$, não foi possível estabelecer uma correspondência de sítios CL66 em alguns cromossomos do cariótipo (principalmente o cromossomo portador do sítio intersticial). Esta peculiaridade pode ser explicada pela ocorrência de rearranjos estruturais, os quais são capazes de modificar toda a morfologia cromossômica ou, alternativamente, devido a eventos de aneuploidia compensada. Embora cruzamentos envolvendo gametas desbalanceados sejam incomuns em indivíduos meioticamente estáveis (como diploides), alguns espécimes $2x$ podem produzir gametas aneuploides e originar descendentes com a constituição cromossômica desbalanceada (LYRENE, VORSA e BALLINGTON, 2003; LAVIA et al., 2011). Nossos resultados sobre a microsporogênese sugerem a formação de grãos de pólen desbalanceados em alguns acessos diploides. Embora tais acessos apresentem a viabilidade dos grãos

de pólen reduzida, a ocorrência de aneuploidia compensada na origem de indivíduos 2x não pode ser descartada. São poucos os relatos de aneuploidia compensada na formação de citótipos, principalmente em diploides. A maioria dos relatos se restringe a aloploidos (trissômicos e nulissômicos) que apresentam cromossomos homeólogos (CHESTER et al., 2011; XIONG, GAETA e PIRES 2011). Todavia, devido à dificuldade de detecção, este evento pode estar subestimado ou ser omitido durante a evolução das diferentes linhagens de plantas, sobretudo em plantas autopoliploides.

As análises citogenéticas também revelaram que apesar de alguns indivíduos possuírem o mesmo número de sítios CL66, os padrões cariotípicos são distintos. Este fato sugere a presença de rearranjos estruturais em outras porções do genoma. Todos estes dados revelam que os rearranjos estruturais são frequentes no genoma de *L. alba* e ocorrem independentemente de duplicações cromossômicas recentes. Os kariogramas evidenciam os diversos perfis cariotípicos em indivíduos 2x e ressaltam a natureza plástica do genoma. Além disso, sugerem que espécimes considerados diploides, possam ainda estar em processo de reestruturação genômica e restauração da dissomia.

Por fim, os dados indicam que possivelmente o genoma de *L. alba* possa adotar comportamentos diferentes, dependendo do nível de ploidia do citótipo. Em diploides e triploides, o incremento de famílias satélites pode ser um mecanismo frequente, enquanto em poliploides, com níveis mais altos de ploidia, as deleções de sequências repetitivas constituem o processo mais comum, como proposto para os genes ribossomais 18S (REIS et al., 2014).

5.6 DISTRIBUIÇÃO DE DNA SATÉLITE NO COMPLEXO POLIPLOIDE *L. alba*

Além de revelar a plasticidade do genoma em relação a repetições satélite, a variação no número de sítios CL66 sugere possíveis explicações para a formação dos poliploides de *L. alba*. Assumindo que os diploides constituem a base para o surgimento dos demais citótipos, e tomando como referência que o número de cromossomos portadores do sítio CL66 no complemento monoploide de *L. alba*

($x=15$) é 5, os acessos tetraploides apresentariam números próximos de 20 a 24 cromossomos marcados com a repetição CL66. Números próximos ao esperado foram observados nos acessos 4x (8 acessos apresentaram entre 18 a 23 cromossomos marcados) sugerindo que, embora muitas alterações tenham ocorrido, o conjunto cromossômico dos indivíduos tetraploides parece compartilhar semelhanças com os cariótipos de origem (diploides).

Além disso, o número de sítios observado entre os tetraploides pode indicar uma possível ordem de surgimento dos acessos 4x. Em geral, neopoliploides apresentam o cariótipo mais semelhante ao parental 2x (HEGARTY et al., 2013). Assim, os conjuntos cromossômicos mais similares ao cariótipo parental teriam sido originados mais recentemente, ao passo que, os cariótipos mais divergentes teriam uma origem precedente. Trabalhos envolvendo indução de poliploidia e estudos utilizando poliploides sintéticos relataram a ocorrência de alterações no conjunto cromossômico ao decorrer das gerações (JACKSON e CHEN, 2010). Em *L. alba*, apesar do tempo de origem de cada indivíduo poliploide ser desconhecido, se adotarmos os perfis cariotípicos da maioria dos indivíduos tetraploides, podemos inferir que os padrões observados são próximos aos mapeamentos obtidos para a maioria dos acessos diploides (cinco cromossomos marcados no complemento monoploide). Estes acessos 4x, que possuem cariótipos semelhantes aos cariótipos diploides, teriam uma origem mais recente, comparado aos acessos tetraploides BGEN-64 e BGEN-87, os quais apresentaram grandes discrepâncias cariotípicas (apenas dez cromossomos CL66⁺). Tais diferenças podem ser justificadas por rearranjos cromossômicos estruturais após a poliploidização, na tentativa de ajuste e reestruturação do genoma recém-duplicado (DODSWORTH, CHASE e LEITCH, 2015). Estas modificações pós-poliploidização podem gerar particularidades cariotípicas e originar conjuntos cromossômicos que compartilham caracteres plesiomórficos (SOLTIS e SOLTIS, 2009).

Com relação aos indivíduos triploides, a maioria dos acessos exibiu cariótipos com aproximadamente 22 cromossomos portadores da repetição CL66, número próximo ao encontrado em tetraploides, e maior que o estimado para indivíduos com três conjuntos cromossômicos (cerca de 15-18 cromossomos CL66⁺). Estimativas de conteúdo de DNA nuclear revelaram que a quantidade de DNA dos acessos triploides é pouco maior do que a esperada, assumindo os diploides como referência para o processo de autoploidização (REIS et al., 2014). Estes dados corroboram

os resultados do mapeamento cromossômico das repetições satélites, os quais revelaram um número superior de sítios de DNA satélites CL66 e sítios adicionais da repetição CL98 em acessos com 45 cromossomos. Famílias de DNA satélites podem ser amplificadas e incrementar grande parte dos genomas vegetais, como ocorre em *Fritillaria*, *Camellia* e alotetraploides de *Gossypium* (ZHAO et al., 1998; AMBROZOVÁ et al., 2011; HEITKAM et al., 2015; GARRIDO-RAMOS 2015). Em triploides de *L. alba*, talvez o aumento de DNA satélite seja um mecanismo frequente após a poliploidia. Alternativamente, o número elevado de sítios CL66 observado na maioria dos acessos 3x também pode ser devido a cruzamentos envolvendo apenas parentais diploides que possuem elevado número de sítios CL66 ou por meio de cruzamento entre diploides e tetraploides contendo muitos sítios de DNA satélite CL66. Assim, o citótipo 3x teria uma origem posterior aos tetraploides.

Considerações similares podem ser feitas com relação aos indivíduos aneuploides de *L. alba*. Os diferentes perfis cariotípicos podem ser consequências de aumento de sítios após a formação do citótipo (amplificação), ou devido a cruzamento entre parentais portadores de muitas marcas CL66.

Entretanto, estabelecer o conjunto monoploide que teria originado os diferentes citótipos e sua respectiva ordem de surgimento torna-se uma questão de difícil esclarecimento, uma vez que a repetição CL66 mostra-se bastante variável, inclusive dentre os indivíduos diploides. Além disso, considerando que o complexo tenha surgido a partir de várias origens, e as duplicações genômicas tenham ocorrido de maneira independente, muitas variações entre as populações de poliploides são esperadas. Em populações de *Tragopogon miscellus* e *T. mirus*, por exemplo, características cariotípicas distintas podem ser vistas nas diferentes populações, ressaltando os atributos de cada população e o curso evolutivo que cada linhagem poliploide seguiu (LIM et al., 2008). Em *L. alba*, a existência de variados perfis cariotípicos pode ser devido ao dinamismo do genoma e/ou aos cruzamentos entre indivíduos com constituição cromossômica diferente. Tendo em vista que a espécie é preferencialmente alógama, a união de gametas originados por espécimes com diferentes perfis cariotípicos torna-se um evento possível.

5.7 GAMETAS DESBALANCEADOS E NÃO REDUZIDOS: FONTE DE VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA NO COMPLEXO *L. alba*

Além das descrições cariotípicas, estudos sobre a fertilidade e o comportamento meiótico em acessos de *L. alba* também têm sido realizados nos últimos anos (SOUSA et al., 2009; PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014; REIS, SOUSA e VICCINI, 2016) e corroboram os resultados obtidos no presente estudo. As análises revelaram alto índice de irregularidades na microsporogênese, principalmente em citótipos poliploides de *L. alba*, somando indícios sobre o dinamismo e a plasticidade do genoma, também evidenciados pelas análises cariotípicas. Além disso, as investigações sobre a microsporogênese possibilitaram uma visão global sobre o comportamento meiótico e a reprodução sexual da espécie, abrindo nova perspectiva com relação à instabilidade genômica e à formação de gametas desbalanceados em acessos diploides de *L. alba*.

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que muitos indivíduos diploides possuem comportamento meiótico regular, com poucas anormalidades. Entretanto, alguns acessos (BGEN-74 e BGEN-81) revelaram índices consideráveis de irregularidades, com a ocorrência de desinapses em prófase I e anormalidades na segregação cromossômica nas meioses I e II, alterações estas, com potencial de gerar gametas desbalanceados e não reduzidos (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998). O acesso BGEN-81, por exemplo, apresentou o maior índice de meiócitos anormais dentre todos os acessos diploides, com apenas 27% das células meióticas aptas à formação de pólenes reduzidos. Estes dados são semelhantes aos resultados encontrados em triploides de *L. alba*, indivíduos caracterizados por apresentarem drásticas anormalidades meióticas, e considerados, muitas vezes, estéreis (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; TAYALÉ e PARISOD, 2013).

Além de revelar instabilidade meiótica em acessos diploides, as análises da microsporogênese também permitiram reforçar as discussões acerca da formação de pólenes não reduzidos e desbalanceados oriundos desses acessos. Embora já houvesse indícios de acessos diploides com meiose irregular, apenas um acesso com essa característica foi previamente reportado (REIS et al., 2014). Além disso, as alterações na gametogênese encontradas neste acesso se limitavam à segunda

divisão meiótica (mais especificamente na fase de telófase II) com a presença de díades e tríades. Portanto, a existência de mais indivíduos 2x com meiose instável, sugere que a formação de gametas desbalanceados não seja um evento isolado dentre os indivíduos diploides de *L. alba*, sendo capaz de contribuir para a origem dos demais citótipos. Em *Arachis pintoi* (LAVIA et al., 2011); *Vaccinium* (LYRENE, VORSA e BALLINGTON, 2003); *Medicago sativa* (McCOY, 1982) e em espécies de *Solanum* (VEILLEUX, MCHALE e LAUER, 1982) por exemplo, indivíduos com diferentes níveis de ploidia foram originados por união de gametas não reduzidos provindos de parentais diploides. Embora diploides sejam considerados meioticamente estáveis com formação de bivalentes, alguns indivíduos podem apresentar irregularidades e eventualmente formar gametas desbalanceados e/ou não reduzidos (LAVIA et al., 2011).

Contudo, apesar de fatores ambientais impulsionarem a formação de gametas não reduzidos (RAMSEY e SCHEMSKE 1998; SMARDA e BURES 2010; SOLTIS et al., 2010; KURSCHNER et al., 2013; DE STORME e GEELEN, 2014; MADLUNG 2014; VANNESTE et al., 2014; MASON e PIRES 2015), a constituição genotípica também tem grande influência na gametogênese (TAYALÉ e PARISOD, 2013). Em espécies de *Solanum*, *Vaccinium* e em *Medicago sativa*, por exemplo, variações genotípicas espécie-específicas influenciaram na frequência de óvulos e pólenes 2n produzidos (TAVOLETTI, MARIANI e VERONES, 1991; WERNER e PELOQUIN, 1991; LYRENE, VORSA e BALLINGTON, 2003). Estudos relatam que a produção de gametas não reduzidos pode ser herdável, sendo controlada por poucos genes (PARISOD, HOLDEREGGER e BROCHMANN, 2010; TAYALÉ e PARISOD, 2013). No complexo *L. alba*, pelo fato dos acessos serem cultivados nas mesmas condições ambientais, os variados índices de irregularidades meióticas em diploides pode ser devido a fatores intrínsecos de cada acesso. Embora todos apresentem 30 cromossomos, a constituição genética dos acessos diploides é diferente, o que pode resultar em índices variados de irregularidades entre os acessos e como consequência influenciar na frequência da produção de gametas não reduzidos. De fato, o mapeamento cromossômico das sequências satélites reforça a grande diversidade cariotípica em diploides de *L. alba*.

Embora as vias moleculares específicas que controlam a divisão meiótica sejam desconhecidas, estudos sugerem que uma das principais causas de formação de gametas não reduzidos se deve a falhas no funcionamento de proteínas

envolvidas no fuso meiótico (DE STORME e GEELEN, 2013). Em meiócitos, erros durante a biogênese e orientação do fuso podem resultar em 1) atraso da divisão; 2) assincronia entre estágios subsequentes da meiose e 3) não disjunção cromossômica (PÉCRIX, et al., 2011; LARROSA et al., 2012; DE STORME e GEELEN, 2013; 2014). Todas estas anormalidades têm sido associadas à formação de gametas desbalanceados. Além disso, falhas durante a citocinese (ou citocinese prematura) também constituem um importante fator citológico capaz de ocasionar a não redução meiótica e a formação de gametas não reduzidos (CARPUTO, FRUSCIANTE e PELOQUIN, 2003). A presença de díades, tríades e políades, frequentes em *L. alba*, e observadas ao final da meiose são indícios de erros durante o processo de divisão, e podem originar gametas desbalanceados e não reduzido (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; DE STORME e GEELEN, 2013; 2014; MASON e PIRES, 2015).

Dentre os processos mais importantes que asseguram a segregação cromossômica correta, o pareamento dos cromossomos na prófase I constitui um evento de suma relevância. No entanto, quando ocorrem erros durante o reconhecimento de homólogos, como assinapse (quando não há pareamento cromossômico) ou desinapse (quando a associação dos homólogos não perdura até a anáfase I) a microsporogênese pode ser comprometida. Tais erros resultam em univalentes e multivalentes que podem gerar gametas aneuploides. Em *L. alba*, univalentes podem ser vistos em alguns acessos diploides e o não-pareamento cromossômico pode estar relacionado a eventos de aneuploidia compensada. Os resultados de mapeamento cromossômico em *L. alba* sugerem eventos de aneuploidia compensada em acessos 2x, o que poderia resultar em erros durante a prófase I em alguns acessos diploides.

Com relação à meiose de indivíduos poliploides, consideráveis índices de irregularidades têm sido relatados (PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014; REIS, SOUSA e VICCINI, 2016) reiterando a hipótese de autopoliploidia na formação do complexo. Nossos resultados revelaram que os indivíduos triploides apresentaram índices de irregularidades meióticas superiores aos relatos anteriores (acima de 70%). Nestes indivíduos, toda a microsporogênese mostrou-se afetada, deste a prófase I até a telófase II, comprometendo a fertilidade das plantas. Na literatura, são frequentes os relatos de alto índice de esterilidade em triploides, devido, principalmente, às falhas de pareamento cromossômico na meiose e ao aborto de

sementes causado pelo desequilíbrio do EBN (“endosperm balance number”) (SATO, 1993; RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; OTTO e WHITTON, 2000). Segundo o conceito do EBN, as sementes triploides se desenvolvem quando há a proporção de dois genomas maternos para um genoma paterno (2m:1p). Assim, o indivíduo formado deve ser originado de um cruzamento unilateral, em que o gameta não reduzido corresponda ao gameta feminino (LEVIN, 2002). Contudo, estudos indicam que algumas sementes triploides são viáveis mesmo quando não há a proporção 2m:1p do endosperma e alguns indivíduos 3x são capazes de sobreviver (BRETAGNOLLE e THOMPSON, 1995; LEVIN, 2002; KOHLER, et al., 2010).

Eventualmente, os indivíduos triploides podem originar citótipos com números cromossômicos diferentes, processo conhecido como ponte triploide (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; KOHLER, et al., 2010). Na formação do complexo *L. alba*, foi proposta uma hipótese na qual os triploides atuariam como um citótipo intermediário para o surgimento de indivíduos com os diferentes níveis de ploidia. Os triploides estariam envolvidos na formação de tetraploides, hexaploide e de aneuploides, por meio de cruzamentos com pólenes desbalanceados, sendo o único citótipo capaz de gerar todos os poliploides do complexo (REIS et al., 2014). Os indivíduos 3x poderiam originar tetraploides a partir de cruzamento unilateral com diploides ($n=45 + n=15$), hexaploides por meio de cruzamento bilateral envolvendo ambos os parentais triploides com gametas não reduzidos ($n=45 + n=45$) e ainda, indivíduos aneuploides a partir da fecundação de gametas desbalanceados com $n=23$ cromossomos com gametas reduzidos provindos de diploides ($n=15$). Assim, apesar das análises revelarem altos percentuais de grãos inviáveis, não é possível descartar a proposta inicial de surgimento dos citótipos com $2n= 38, 60$ e 90 cromossomos no complexo *L. alba* com a participação de espécimes 3x.

O comportamento meiótico dos acessos tetraploides, por sua vez, confirma as informações prévias de herança polissômica. Nestes indivíduos, o comportamento meiótico revelou anormalidades cromossômicas típicas de organismos autotetraploides, como trivalentes, univalentes e tetravalentes. Além disso, alguns acessos apresentaram altos percentuais de irregularidade (cerca de 70%), enquanto em outros, as alterações foram menos drásticas (aproximadamente 40%). Outros autores relataram que o índice de anormalidade na meiose pode refletir o tempo de origem do citótipo (SANTOS et al., 2003; GRANDONT, JENCZEWSKI e LLOYD, 2013). Em autopoliploides, a associação de vários homólogos no complexo

sinaptonêmico, por exemplo, indica uma origem recente de poliploidização (GRANDONT, JENCZEWSKI e LLOYD 2013) ao passo que, poliploides formados há mais tempo, possuem o comportamento meiótico mais regular. Isso ocorre porque poliploides já estabelecidos sofreram complexos rearranjos cromossômicos estruturais e passaram por grandes modificações genômicas, passos importantes para a diferenciação de homólogos e a restauração da condição dissômica (MÁNDAKOVÁ et al., 2012; DODSWORTH, CHASE e LEITCH, 2015). Em *L. alba*, embora as alterações meióticas e as descrições cariotípicas sugiram processos de diferenciação de homólogos, nenhum acesso 4x evidenciou eventos de sinapse regular (com 30 bivalentes) ou possível processo de diploidização. Isto sugere que os processos de duplicação cromossômica na espécie tenham ocorrido recentemente, e que mais rearranjos são necessários para a recuperação da dissomia em tetraploides de *L. alba*.

Os resultados também indicaram a ocorrência de uma alteração meiótica ainda não documentada para *L. alba*. Além das anormalidades citadas em estágios de metáfases, anáfases e telófases, o acesso BGEN-92 (4x) apresentou considerável índice de zigótenos alterados. Neste indivíduo, houve troca de material genético entre as células adjacentes em aproximadamente 80% dos meiócitos neste estágio, correspondendo ao primeiro relato de citomixia para a espécie. Neste acesso (BGEN-92) o processo ocorre apenas em prófase I, acarretando em graves alterações nos estágios posteriores. Dentre as anormalidades encontradas, podemos citar: segregação cromossômica desigual; meiócitos com excesso e déficit de material genético; micronúcleos picnóticos e cromatina desorganizada (REIS, SOUSA e VICCINI, 2016).

Os estudos sobre citomixia demonstram que geralmente, os indivíduos citomíticos correspondem a organismos com algum grau de instabilidade, seja fisiológico, bioquímico ou genômico, ocorrendo mais frequentemente em plantas aneuploides, triploides, híbridas e apomíticas (DE NETTANCOURT e GRANT, 1964; GOTTSCHALK, 1970; MANTU e SHARMA, 1983). No entanto, apesar da transferência de cromatina provocar diversas alterações na gametogênese, a citomixia tem grande importância na evolução (BELL, 1964; LATTOO et al., 2006).

Inúmeros trabalhos relatam que o mecanismo de citomixia em células mãe de grãos de pólen (CMP) pode resultar na formação de gametas desbalanceados e não reduzidos, matéria-prima para a origem de novos citótipos (BELLUCCI, ROSCINI e

MARIANI, 2003; SINGHAL e KUMAR, 2008; KUMAR et al., 2010). No presente trabalho, foi observado que em alguns casos, a transferência de DNA entre meiócitos resultou em células vazias e outras com, aparentemente, o dobro da quantidade de DNA. Estes dados indicam uma possível produção de pólenes $2n$ ao final da microsporogênese, os quais, são o principal mecanismo de formação de citótipos em *L. alba*. Assim, a detecção de citomixia sugere um mecanismo genético adicional na formação dos citótipos no complexo.

Com relação aos gametas formados, os testes de viabilidade polínica ratificam as análises do comportamento meiótico. Em geral, altos índices de inviabilidade de pólenes foram encontrados em poliploides de *L. alba*, enquanto os acessos diploides apresentaram a maioria dos grãos aptos à fecundação. Além disso, as análises revelaram que alguns acessos que apresentaram comportamento meiótico regular mostraram alto índice de inviabilidade dos grãos de pólen, sugerindo que mecanismos pós-meiócitos também são determinantes no desenvolvimento dos grãos de pólen em *L. alba* (BLACKMORE et al., 2007; GOMEZ, TALLE e WILSON, et al., 2015). Os resultados também evidenciaram a ocorrência de pólenes viáveis em acessos que apresentaram meiose irregular, reiterando que diploides de *L. alba* também podem contribuir para a formação dos demais citótipos do complexo.

Apesar de altos percentuais de irregularidade meiótica e inviabilidade polínica, sobretudo em poliploides, *L. alba* não aparenta possuir desvantagens na propagação e no estabelecimento de novas plântulas, uma vez que na área experimental são observados indivíduos jovens originados por meio de reprodução assexuada e sexuada (VICCINI, comunicação pessoal). Além disso, considerada preferencialmente alógama, a espécie exibe flores com atrativos à visitação de variados insetos (VENÂNCIO et al., 2016), tornando eventuais cruzamentos entre os citótipos possíveis. A espécie apresenta a propagação vegetativa como uma importância estratégia reprodutiva, permitindo assim a manutenção dos citótipos instáveis cromossomicamente. Além disso, não se pode descartar a ocorrência de reprodução assexual via apomixia como estratégia para a produção de sementes, o que contribuiria para a perpetuação dos poliploides do complexo.

5.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O genoma de *L. alba* tem sido caracterizado como bastante variável e dinâmico. Esta plasticidade pode ser comprovada por meio dos diferentes números cromossômicos encontrados na espécie e a partir das diversas fórmulas cariotípicas propostas (SOUSA et al., 2009; PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014). Estas variações têm sido recentemente discutidas e os estudos sugerem múltiplos e complexos rearranjos cromossômicos durante a evolução cariotípica da espécie.

Os resultados obtidos a partir do mapeamento de regiões satélite somam informações sobre a plasticidade genômica e contribuem com uma nova perspectiva sobre a variação genética em indivíduos com mesmo nível de ploidia, principalmente em acessos diploides. Dentre os mecanismos propostos para explicar os diferentes padrões cariotípicos, eliminações e ampliações de sequências correspondem às alterações mais prováveis. Além disso, as análises cariotípicas sugerem múltiplos e independentes eventos de poliploidia na origem dos citótipos, o que incrementa a variação intraespecífica no complexo. Adicionalmente, os resultados da microsporogênese e da viabilidade polínica ratificam a instabilidade genômica e indicam uma origem recente de poliploidização em *L. alba*.

Os altos índices de irregularidades no comportamento meiótico permitem considerar a origem dos citótipos via cruzamentos unilateral e bilateral e abrem uma nova perspectiva sobre a produção de gametas desbalanceados e não reduzidos em acessos com trinta cromossomos (diploides). Além disso, as irregularidades meióticas observadas em alguns acessos com $2n=30$ sugerem que os diploides de *L. alba* correspondam a indivíduos paleopoliploides. Em paleopoliploides, a condição dissômica pode atuar em diferentes graus, existindo um *continuum* de variação do estado dissômico, no qual alguns indivíduos considerados diploides ainda apresentam resquícios de herança polissômica (HUSBAND, BALDWIN, e SUDA 2013). Portanto, considerando o número básico de *Lippia* como $x=7$ (SANDERS, 2001), os indivíduos de *L. alba* com 30 cromossomos corresponderiam a poliploides que sofreram dispoloidia ascendente ou aneuploidias e ainda se encontram em processo de restauração o comportamento dissômico, apresentando, em alguns casos, erros durante a microsporogênese.

Contudo, embora a meiose de *L. alba* apresente muitas e drásticas irregularidades, os dados de viabilidade polínica sugerem que a espécie seja capaz de formar gametas viáveis e se reproduzir sexuadamente. Isso, conseqüentemente, origina novos e diferentes perfis cariotípicos e incrementa a diversidade intraespecífica podendo resultar na diferenciação dos citótipos e no surgimento de espécies crípticas, em longo prazo (SOLTIS e SOLTIS, 2009). Todos estes dados reforçam a instabilidade e o dinamismo genômico de *L. alba* e refletem o cenário atual que o cariótipo da espécie está passando. Apesar a reprodução assexuada por meio de mecanismos como apomixia seja possível como estratégia para a manutenção de citótipos cromossomicamente instáveis e a espécie apresente grande eficiência na propagação vegetativa, a reprodução sexuada não pode ser descartada em *L. alba* viabilizando os cruzamentos entre e dentre citótipos, e dessa forma, contribuindo para o incremento da variação cariotípica intraespecífica, e para manter os citótipos poliploides na população.

O caráter singular dos dados obtidos, com a revelação de particularidades cariotípicas de um complexo com cinco números cromossômicos, coloca *L. alba* como um interessante modelo de estudo, que pode contribuir para o entendimento da dinâmica e do processo de formação e manutenção de poliploides naturais. Os múltiplos eventos de poliploidia, a grande variação intraespecífica, somados à facilidade de obtenção de material biológico para estudos citogenéticos, possibilitam esclarecer relevantes questões sobre o estabelecimento, manutenção e formação de citótipos autopoliploides nos trópicos, embasando hipóteses sobre a origem do complexo e permitindo traçar possíveis trajetórias evolutivas pelas quais a espécie tenha passado.

6 CONCLUSÃO

- O desenvolvimento de marcadores cromossômicos específicos para *L. alba* mostrou-se eficiente para se conhecer a distribuição de sequências repetitivas no genoma da espécie;
- A localização das sequências repetitivas possibilitaram evidenciar comportamentos distintos de sequências similares tanto em constituição quanto em localização nos cromossomos, revelando o dinamismo do genoma de *L. alba*;
- Múltiplos e independentes eventos de duplicação genômica aliados aos complexos rearranjos cromossômicos originaram a ampla variação cariotípica de *L. alba*;
- A ocorrência de microsporogênese irregular em diploides, associada à viabilidade polínica, sugere que os mesmos sejam elementos importantes na formação do complexo poliploide;
- A microsporogênese irregular em um grande número de poliploides reforça a hipótese de um complexo autopoliploide.
- A ocorrência de variação cariotípica, inclusive dentro de um mesmo nível de ploidia, sugere que *L. alba* encontra-se em processo de estabilização do seu genoma.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, R. J.; LOWE, A. J. Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 82, n. 4, p. 467-474, 2004.

ADAMS, S. P.; LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D.; CHASE, M. W.; LEITCH, A. R. Ribosomal DNA evolution and phylogeny in aloe (Asphodelaceae). *American Journal of Botany*, v. 87, n. 11, p. 1578-1583, 2000.

AHUJA, M. R. Polyploidy in gymnosperms: revisited. *Silvae Genetica* v. 54, n. 2, p. 59-69, 2005.

AINOUCHE, M. L.; BAUMEL, A.; SALMON, A. *Spartina anglica* CE Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 82, n. 4, p. 475-484, 2004.

AINSWORTH, C. C.; PARKER, J.S.; HORTON, D. M. Chromosome variation and evolution in *Scilla autumnalis*. In: BRANDHAM, P.E. BENNETT, M. D. (Orgs.). *Kew chromosome conference II*. London: George Allen and Unwin, 1983. cap., p. 261-268.

ALLABY, R. G.; BROWN, T. A. Network analysis provides insights into evolution of 5S rDNA arrays in *Triticum* and *Aegilops*. *Genetics*, v. 157, n. 3, p. 1331-1341, 2001.

ALFENITO, M. R.; BIRCHLER, J. A. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics*, v. 135, n. 2, p. 589-597, 1993.

AMBROZOVA, K.; MANDAKOVA, T.; BURES, P.; NEUMANN, P.; LEITCH, I. J.; KOBLIZKOVA, A.; MACAS, J.; LYSAK, M. A. Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria* lilies. *Annals of Botany*, v. 107, n. 2, p. 255-268, 2011.

ANANIEV, E. V.; PHILLIPS, R. L.; RINES, H. W. Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 22, p. 13073-13078, 1998.

APPELS, R.; DRISCOLL, C.; PEACOCK, W. J. Heterochromatin and highly repeated DNA sequences in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, v. 70, n. 1, p. 67-89. 1978.

BAACK, E. J. To succeed globally, disperse locally: effects of local pollen and seed dispersal on tetraploid establishment. *Heredity*, v. 94, n. 5, p. 538-546, 2005.

- BADAEVA, E. D.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome*, v. 39, n. 2, p. 293-306, 1996.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.
- BAKER, S. M. Karyotype and genome evolution in pteridophytes. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 15, p. 245-253.
- BAKER, M. S.; ARRIGO, N.; BANIAGA, A. E.; LI, Z.; LEVIN, D. A. On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytologist*, v. 210, n. 2, p. 391-398, 2016.
- BAROW, M.; MEISTER, A. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. *Cytometry*, v. 47, n.1, p. 1-7, 2002.
- BARTON, D. W. Pachytene morphology of the tomato chromosome complement. *American Journal of Botany*, v. 37, n. 8, p. 639-643, 1950.
- BAWA, K. S. Mating systems, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. *Biotropica*, v. 24, n. 2, p. 250-255, 1992.
- BEAULIEU, J. M.; MOLES, A.T.; LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D.; DICKIE, J.B.; KNIGHT, C. A. Correlated evolution of genome size and seed mass. *New Phytologist*, v. 173, n. 2, p. 422-437, 2007.
- BELL, C. R. Cytomixis in *Tauschia nudicaulis* Schlecht (Apiaceae). *Cytologia*, v. 29, n. 4, p. 369-398, 1964.
- BELLUCCI, M.; ROSCINI, C.; MARIANI, A. Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. *Journal of Heredity*, v. 94, n. 6, p. 512-516, 2003.
- BENNETT, M. D. Plant genome values: how much do we know? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 5, p. 2011-2016, 1998.
- BENNETZEN, J. L.; MA, J.; DEVOS, K. M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of botany*, v. 95, n. 1, p. 127-132, 2005.
- BEVAN, M. Objective: the complete sequence of a plant genome. *The Plant Cell*, v. 9, n. 4, p. 476-478, 1997.
- BISCOTTI, M. A.; CANAPA, A.; FORCONI, M.; OLMO, E.; BARUCCA, M. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. *Chromosome Research*, v. 23, n. 3, p. 463-477, 2015.

BLACKMORE, S.; WORTLEY, A. H.; SKVARLA, J. J.; ROWLEY, J. R. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist*, v. 174, n. 3, p. 483-498, 2007.

BOGUNIC, F.; MURATOVIC, E.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Chromosomal differentiation between *Pinus heldreichii* and *Pinus nigra*. *Annals of forest science*, v. 63, n. 3, p. 267-274, 2006.

BOSE, R. B.; CHOUDHURY, J. J. Cytological studies in *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. *Botanical Bulletin Society Bengal*, v. 14, p. 71-72, 1960.

BOWERS, J. E.; CHAPMAN, B. A.; RONG, J.; PATERSON, A.H. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature*, v. 422, n. 6930, p. 433-438, 2003.

BOYKO, E. V.; BADAEV, N. S.; MAXIMOV, N. G.; ZELENIN, A. V. Does DNA content change in the course of *Triticale* breeding? *Cereal Research Communications*, v. 12, n.1-2, 99-100, 1984.

BRANDHAM, P. E. Evolution in stable chromosome system. In: BRANDHAM, P.E. BENNETT, M. D. (Orgs.) *Kew chromosome conference II*. London: George Allen and Unwin, 1983. cap., p. 251-260.

BRANDES, A.; RODER, M. S.; GANAL, M. W. Barley telomeres are associated with 2 different types of satellite DNA sequences. *Chromosome Research*, v. 3, n. 5, p. 315-320, 1995.

BRETAGNOLLE, F.; THOMPSON, J. D. Gametes with somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*, v. 129, n. 1, p. 1-22, 1995.

BROCHMANN, C.; BRYSTING, A. K.; ALSOS, I. G.; BORGES, L.; GRUNDT, H. H.; SCHEEN, A. C.; ELVEN, R. Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 82, n. 4, p. 521-536, 2004.

BROWNSEY, P. J.; LOVIS, J. D. Chromosome numbers of the New Zealand species of *Psilotum* and *Tmesipteris*, and the phylogenetic relationships of the Psilotales. *New Zealand Journal of Botany*, v. 25, n. 3, p. 439-454, 1987.

BRYSTING, A. K.; FAY, M. F.; LEITCH, I. J.; AIKEN, S. G. One or more species in the arctic grass genus *Dupontia* R. Br. (Poaceae)? A contribution to the Panarctic Flora project. *Taxon*, v. 53, n. 3, p. 365-365, 2004.

BUGGS, R. J. A.; RENNY-BYFIELD, S.; CHESTER, M.; JORDON-THADEN, I. E.; VICCINI, L. F.; CHAMALA, S.; LEITCH, A. R.; SCHNABLE, P. S.; BARBAZUK, W. B.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Next-generation sequencing and genome evolution in allopolyploids. *American Journal of Botany*, v. 99, n. 2, p. 372-382, 2012.

BURGE, D. O.; JUI, G.; KEMBEL, S. S.; ZHUKOVSKY, K. Microsatellite markers from *Ceanothus roderickii* (Rhamnaceae) using next-generation sequencing technology. *American journal of Botany*, v. 99, n. 3, p. 127-30, 2012.

BURTON, T. L.; HUSBAND, B. C. Population cytotype structure in the polyploid *Galax urceolata* (Diapensiaceae). *Heredity*, v. 82, n. 4, p. 38-390, 1999.

BŮŽEK, J.; KOUTNÍKOVÁ, H.; HOUBEN, A.; ŘÍHA, K.; JANOUSŠEK, B.; ŠIROKÝ, J.; VYSKOT, B. Isolation and characterization of X chromosome-derived DNA sequences from a dioecious plant *Melandrium album*. *Chromosome Research*, v. 5, n. 1, p. 57-65, 1997.

CAFASSO, D.; CHINALI, G. An ancient satellite DNA has maintained repetitive units of the original structure in most species of the living fossil plant genus *Zamia*. *Genome*, v. 57, n. 3, p. 125-135, 2014.

CAMPOS, J. M. S.; SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; PINHEIRO, L. C.; SAMPAIO, F.; VICCINI, L. F. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution*, n. 291: p. 133–140. 2011.

CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 61, n.1, p. 51-94, 1997.

CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L.; PELOQUIN, S. J. The Role of 2n Gametes and Endosperm Balance Number in the Origin and Evolution of Polyploids in the Tuber-Bearing Solanums. *Genetics*, v.163, p. 287–294, 2003

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A New Heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. *Heredity*, v. 70, n. 4, p. 515-519, 1993.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. High-resolution HKG- banding in maize mitotic chromosomes. *Journal of Plant Research*, v. 110, n. 5, p. 417-420, 1997.

CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G. E.; KUDYNOWSKI, J.; MODEST, E. J.; SIMONSSON, E.; WAGH, U.; ZECH, L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, v. 49, n. 1, p. 219-222, 1968.

CHAMALA, S.; CHANDERBALI, A. S.; DER, J. P.; LAN, T.; WALTS, B.; ALBERT, V. A.; DEPAMPHILIS, C. W.; LEEBENS-MACK, J.; ROUNSLEY, S.; STEPHAN, C.; SCHUSTER, S. C.; WING, R. A.; XIAO, N.; MOORE, R.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; BARBAZUK, W. B. Assembly and validation of the genome of the nonmodel basal angiosperm *Amborella*. *Science*, v. 342, n. 6165, p. 1516-1517, 2013.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.

CHEN, C. M.; WANG, C. T.; WANG, C. J.; HO, C. H.; KAO, Y. Y.; CHEN, C. C. Two tandemly repeated telomere-associated sequences in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Chromosome Research*, v. 5, n. 8, p. 561-568, 1997.

CHENG, Z. K.; STUPAR, R. M.; GU, M. H.; JIANG, J. M. A tandemly repeated DNA sequence is associated with both knob-like heterochromatin and a highly decondensed structure in the meiotic pachytene chromosomes of rice. *Chromosoma*, v. 110, n. 1, p. 24-31, 2001.

CHENG, Z.; DONG, F.; LANGDON, T.; OUYANG, S.; BUELL, C. R.; GU, M.; BLATTNER, F. R.; JIANG, J. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell*, v. 14, n. 8, p. 1691-1704, 2002.

CHESTER, M.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes*, v. 1, n.:166–192, 2010.

CHESTER, M.; GALLAGHER, J. P.; SYMONDS, V. V.; DA SILVA, A. V. C.; MAVRODIEV, E. V.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 4, p. 1176-1181, 2012.

CHESTER, M.; LIPMAN, L. J.; GALLAGHER, J. P.; SOLTIS S. P.; SOLTIS, D. E. An assessment of karyotype restructuring in the neopolyploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Chromosome Research*, v. 21, n. 1, p. 75-85, 2013.

CHEN, M.; SHAOLEI, L. V.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. *Development Growth & Differentiation*, v. 52, n. 7, p. 555-566, 2010.

CHEUNG, P.; TANNER, K. G.; CHEUNG, W. L.; SASSONE-CORSI, P.; DENU, J. M.; ALLIS, C. D. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular cell*, v. 5, n. 6, p. 905-915, 2000.

CHUANG, T. I.; HU, W. W. Study of *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v. 4, n. 1, p. 10-14, 1963.

CLANCY, S. DNA damage e repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education*, v. 1, n. 1, p. 103, 2008.

CLARKSON, J. J.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; LEITCH, A. R. Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). *New Phytologist*, v. 168, n. 1, p. 241-252, 2005.

- COATE, J. E.; DOYLE, J. J. Quantifying whole transcriptome size, a prerequisite for understanding transcriptome evolution across species: an example from a plant allopolyploid. *Genome Biology and Evolution*, v. 2, p. 534-546, 2010.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 11, p. 836-846, 2005.
- CONANT, G. C.; WOLFE, K. H. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Molecular Systems Biology*, v. 3, n. 1, p. 129, 2007.
- CONTENTO, A.; HESLOP-HARRISON J. S.; SCHWARZACHER T. Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid *Triticeae*. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 109, n. 1-3, p. 34-42, 2005.
- CREMONINI, R. Low chromosome number angiosperms. *Caryologia*, v. 58, n. 4, p. 403-409, 2005.
- CROW, K. D.; WAGNER, G. P. What is the role of genome duplication in the evolution of complexity and diversity? *Molecular Biology and Evolution*, v. 23, n. 5, p. 887-892, 2006.
- DAVIES, B. J.; O'BRIEN, I. E. W.; MURRAY, B. G. Karyotypes, chromosome bands and genome size variation in New Zealand endemic gymnosperms. *Plant Systematics and Evolution*, v. 208, n. 3, p. 169-185, 1997.
- DE BODT, S.; MAERE, S.; VAN DE PEER, Y. Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 20, n. 11, p. 591-597, 2005.
- DE BOER, J. G.; YAZAWA, R.; DAVIDSON, W. S.; KOOP, B. F. Bursts and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids. *BMC Genomics*, v. 8, n. 1, p. 422, 2007.
- DE NITTANCOURT, D.; GRANT, W. F. La cytogenetique de *Lotus* (Leguminosae) III. Un cas de cytomixie dans un hybride interspecific. *Cytologia*, v. 29, n. 2, p. 191-195, 1964.
- DE STORME, N.; GEELEN, D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant, Cell & Environment*, v. 37, n. 1, p. 1-18, 2014.
- DE STORME, N.; GEELEN, D. Sexual polyploidization in plants – cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist*, v. 198, n. 3, p. 670-684, 2013.
- DECHYEVA, D.; AND SCHMIDT, T. Molecular organization of terminal repetitive DNA in *Beta* species. *Chromosome Research*, v. 14, n. 8, p. 881-897, 2006.

DEUMLING, B.; GREILHUBER, J. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma*, v. 84, n. 4, p. 535-555, 1982.

DIMITROVA, D.; GREILHUBER, J. C-banding patterns and quantitative karyotype characteristics of Bulgarian species of *Crepis* (Asteraceae). *Plant Biology*, v. 3, n. 01, p. 88-97, 2001.

DODSWORTH, S.; CHASE, M. W.; LEITCH A. R. Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms? *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 180, n. 1, p. 1-5, 2016.

DOLEŽEL, J.; GOHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melium album* and *M. rubum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*, v. 19, n. 2, p.103-106, 1995.

DONG, F.; MILLER, J. T.; JACKSON, S. A.; WANG, G-L.; RONALD, P. C.; JIANG, J. Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 14, p. 8135-8140, 1998.

DOVER, G. A. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. *Nature*, v. 299, n. 5879, p. 111-117, 1982.

DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in Genetics*, v. 2, n. 6, p. 159-165, 1986.

DOYLE, J. J.; FLAGEL, L. E.; PATERSON, A. H.; RAPP, R. A.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; WENDEL, J. F. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics*, v. 42, p. 443-461, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 1-15, 1990.

DVORACKOVA, M.; FOJTOVAL, M; FAJKUS, J. Chromatin dynamics of plant telomeres and ribosomal genes. *The Plant Journal*, v. 83, n. 1, p. 18-37, 2015.

ÉDER-SILVA, E.; FELIX, L. P.; BRUNO, R. L. A. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 1, p. 110-114, 2007.

EHRENDORFER, F. Cytologie, taxonomie und evolution bei samenpflanzen. *Vistas in Botany*, v. 4, p. 99-186, 1964.

EHRENDORFER, F. Polyploidy and distribution. In: LEWIS, W. H. (Org.) *Polyploidy: biological relevance*. New York/London: Plenum Press, 1980, p. 45-59.

EMADZADE, K.; JANG, T.; MACAS, J.; KOVAŘÍK, A.; NOVÁK, P.; PARKER, J.; WEISS-SCHNEEWEISS, H. Differential amplification of satellite PaB6 in

chromosomally hypervariable *Prospero autumnale* complex (Hyacinthaceae) *Annals of Botany*, v. 114, n. 8, p. 1597-1608, 2014.

ERNST, A. Bastardierung als ursache der apogamie im pflanzenreich. Germany: Fischer, Jena, 1918.

FAJKUS, J.; KOVARIK, A.; KRALOVICS, R.; BEZDEK, M. Organization of telomeric and subtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 247, n. 5, p. 633-638, 1995.

FAJKUS, P.; VRATISLAV PEŠKA, V.; SITO VÁ, Z.; FULNEČKOVÁ, J.; DVOŘÁČKOVÁ, M.; GOGELA, R.; SÝKOROVÁ, E.; HAPALA, J.; FAJKUS, J. *Allium* telomeres unmasked: the unusual telomeric sequence (CTCGGTTATGGG)_n is synthesized by telomerase. *The Plant Journal*, v. 85, n. 3, p. 337-347, 2016.

FAWCETT, J. A.; MAERE, S.; VAN DE PEER, Y. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 14, p. 5737-5742, 2009.

FAWCETT, J. A.; VAN DE PEER, Y.; MAERE S. Significance and biological consequences of polyploidization in land plants. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 17, p. 277-293.

FIELD, T. S.; ARENS, N. C. The ecophysiology of early angiosperms. *Plant, Cell & Environment*, v. 30, n. 3, p. 291-309, 2007.

FEITOZA, L.; GUERRA, M. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica*, v. 139, n. 3, p. 305-314, 2011.

FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Genome evolution in allopolyploid wheat - a revolutionary reprogramming followed by gradual changes," *Journal of Genetics and Genomics*, v. 36, n. 9, p. 511-518, 2009.

FELINER, G. N.; ROSSELLO, J. A. Concerted evolution of multigene families and homoeologous recombination. In: WENDEL, J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LEITCH, I. J. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 1: Plants genomes, their residents, their evolutionary dynamics*. Wien/New York: Springer, 2012. cap. 12, p. 171-193.

FERNANDES, T.; YUYAMA, P. M.; MORAES, A. P.; VANZELA, A. L. L. An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. *Genome*, v. 51, n. 9, p. 772-777, 2008.

FINIGAN, P.; TANURDZIC, M.; MARTIENSSEN, R. A. Origins of novel phenotypic variation in polyploids. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS D. E. (Orgs.). Polyploidy and genome evolution. New York: Springer, 2012. Cap. 4, p. 57-76.

FLAGEL, L. E.; BLACKMAN, B. K. The first ten years of plant genome sequencing and prospects for the next decade. In: WENDEL, J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LEITCH, I. J. (Orgs.). Plant genome diversity volume 1: Plants genomes, their residents, their evolutionary dynamics. Wien/New York: Springer, 2012. cap. 1, p. 1-15.

FLEISCHMANN, A.; MICHAEL, T. P.; RIVADAVIA, F.; SOUSA, A.; WANG, W.; TEMSCH, E. M.; GREILHUBER, J.; MÜLLER, K. F.; HEUBL, G. Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. *Annals of botany*, v. 114, n. 8, p. 1651-63, 2014.

FRANKS, T. K.; HOUBEN, A.; LEACH, C. R.; TIMMIS, J. N. The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma*, v. 105, n. 4, p. 223-230, 1996.

FRANSZ, P. F.; ALONSO-BLANCO, C.; LIHARSKA, T. B.; PEETERS, A. J. M.; ZABEL, P.; DE JONG, J. H. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibres. *The Plant Journal*, v. 9, n. 3, p. 421-430, 1996.

FUCHS, J.; BRANDES, A.; SCHUBERT, I. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Systematics and Evolution*, v.196, n. 3, p. 227-241, 1995.

GAETA, R. T.; PIRES, J. C.; INIGUEZ-LUY, F.; LEON, E.; OSBORN, T. C. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *The Plant Cell*, v. 19, n. 11, p. 3403-3417, 2007.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection RNA– DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 63, n. 2, p. 378-383, 1969).

GARCIA, S.; PANERO, J. L.; SIROKY, J.; KOVARIK, A. Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology*, v. 10, n. 1, p. 176, 2010.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *Cytogenetics and Genome Research*, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.

GAZDOVA, B.; SIROKY, J.; FAJKUS, J.; BRZOBOHATY, B.; KENTON, A.; PAROKONNY, A.; HESLOP-HARRISON, J. S.; PALME, K.; BEZDEK, M. Characterization of a new family of tobacco highly repetitive DNA, GRS, specific for

the *Nicotiana tomentosiformis* genomic component. *Chromosome Research*, v. 3, n. 4, p. 245-254, 1995.

GINDULLIS, F.; DESEL, C.; GALASSO, I.; SCHMIDT, T. The large-scale organization of the centromeric region in *Beta* species. *Genome Research*, v. 11, n. 2, p. 253-265, 2001.

GODELLE, B.; CARTIER, D.; MARIE, D.; BROWN, S.C.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry*, v. 14, n. 6, p. 618-626, 1993.

GOMEZ, J. F.; TALLE B.; WILSON Z. E. Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 57, n. 11, p. 876-891, 2015.

GONG, Z.; WU, Y.; KOBLÍŽKOVÁ, A.; TORRES, G. A.; WANG, K.; IOVENE, M.; NEUMANN, P.; ZHANG, W.; NOVÁK, P.; BUELL, C. R.; MACAS, J.; JIANG J. Repeatless and repeat-based centromeres in potato: implications for centromere evolution. *The Plant Cell*, v. 24, n. 9, p. 3559-3574, 2012.

GONZÁLEZ-GARCÍA, M.; CUACOS, M.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; PUERTAS, M. J.; VEJA, J. M. Painting the rye genome with genome-specific sequences. *Genome*, v. 54, n. 7, p. 555-564, 2011.

GOODSPEED, T. H.; CLAUSEN, R. E. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. VIII. The *sylvestris-tomentose-tabacum* hybrid triangle and its bearing on the origin of *tabacum*. *University of California Publications in Botany*, v. 2, p. 245-256, 1928.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E.; HSU, T. C.; ARRIGHI, F. E. Human nucleolus organizers: the satellites or the stalks? *American Journal of Human Genetics*, v. 28, n. 6, p. 559-566, 1976.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, v. 53, n.1, p. 37-50, 1975.

GOTTSCHALK, W. Chromosome and nucleus migration during microsporogenesis of *Pisum sativum*. *Nucleus*, v. 13, n. 1, p. 1-9, 1970.

GRANDONT, L.; JENCZEWSKI, E.; LLOYD, A. Meiosis and its deviations in polyploid plants. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 140, n. 2-4, p. 171-184, 2013.

GRANT, V. The influence of breeding habit on the outcome of natural hybridization in plants. *The American Naturalist*, v. 90, n. 854, p. 319-322, 1956.

GRANT V. The origin of adaptations. New York: Columbia University Press, 1963.

GRANT W. F. Decreased DNA content of birch (*Betula*) chromosomes at high ploidy as determined by cytophotometry. *Chromosoma*, v. 26, n. 3, p. 326-336, 1969.

GRANT, V. Plant speciation. New York: Columbia University Press, 1981.

GREENLEE, J. K.; RAI, K. S.; FLOYD, A. D. Intraspecific variation in nuclear DNA content in *Collinsia verna* Nutt. (Scrophulariaceae). *Heredity*, v. 52, n. 2, p. 235-242, 1984.

GREIDER, C. W. Telomerase biochemistry and regulation. Cold Spring Harbor Monograph Archive, v. 29, p. 35-68, 1995.

GREILHUBER, J.; LEITCH, I. J. Genome size and the phenotype. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes. Vienna: Springer, 2013. cap. 20, p. 323-344.

GRIF, V. G. Some aspects of plant karyology and karyosystematics. *International Review of Cytology*, v. 196, p. 131-175, 2000.

GROVER, C.; WENDEL, J. F. Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. *Journal of Botany*, v. 2010, p. 1-8, 2010.

GROVER, C. E.; SALMON, A.; WENDEL, J. F. Targeted sequence capture as a powerful tool for evolutionary analysis. *American Journal of Botany*, v. 99, n. 2, p. 312-319, 2012.

GU, Z.; XIÃO, H. Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent in situ hybridization (FISH) in *Camellia reticulata* polyploid complex (Theaceae). *Plant Science*, v. 164, n. 2, p. 279-285, 2003.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae III. Heterochromatin patterns. *Caryologia*, v. 38, n. 3-4, p. 335-346, 1985.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, v. 71, p. 234-234, 1993.

GUERRA, M. 2004. Hibridização *in situ*. In: _____. (Org.). FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: SBG, 2004. cap. , p. 1-32.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.

GUSTAFSSON, A. Apomixis in higher plants. Michigan: C. W. K. Gleerup, 1947.

HA, M.; LI, W.-H.; CHEN, Z. J. External factors accelerate expression divergence between duplicate genes. *Trends in Genetics*, v. 23, n. 4, p. 162-166, 2007.

- HAGERUP, O. Über Polyploidie in Beziehung zu Klima, Ökologie und phylogenetische Chro, 1932.
- HAGERUP, O. Studies on polyploid ecotypes in *Vaccinium uliginosum* L. Hereditas, v. 18, n. 1-2, p. 122-128, 1933.
- HALL, K. J.; PARKER, J. S. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. Chromosome Research, v. 3, n. 7, p. 417-422, 1995.
- HALVERSON, K.; HEARD, S. B.; NASON, J. D.; STIREMAN, J. O. Origins, distribution, and local co-occurrence of polyploid cytotypes in *Solidago altissima* (Asteraceae). American Journal of Botany, v.95, n. 1, p. 50-58, 2008.
- HAMANT, O.; MA, H.; CANDE, W.Z. Genetics of meiotic prophase I in plants. The Annual Review of Plant Biology, v. 57, n. 1, p. 267-302, 2006.
- HAMMOND, S. M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A. A.; KOBAYASI, R.; HANNON, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science, v. 293, n. 5532, p. 1146-1150, 2001.
- HAN, F.; FEDAK, G.; GUO, W.; LIU, B. Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids. Genetics, v. 170, n. 3, p. 1239-1245, 2005.
- HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; ARMANDO, C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. Systematic Botany, v. 31, n. 1, p. 138-150, 2006.
- HANSON, L.; MCMAHON, K. A.; JOHNSON, M. A. T.; BENNETT, M. D. First nuclear DNA C-values for 25 angiosperm families. Annals of Botany, v. 88, n. 5, p. 851-858, 2001.
- HARDY O. J.; VANDERHOEVEN S.; DE LOOSE M.; MEERTS P. Ecological, morphological and allozymic differentiation between diploid and tetraploid knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. New Phytologist, v. 146, n. 2, p. 281-290, 2000.
- HAVANANDA, T.; BRUMMER, E. C.; DOYLE, J. J. Complex patterns of autopolyploid evolution in alfalfa and allies (*Medicago sativa*; leguminosae). American Journal of Botany, v. 98, n. 10, p. 1633-1646, 2011.
- HE, J-H.; SHAHID, M. Q.; CHEN, Z-X.; CHEN, X-A.; LIU, X-D.; LU, Y-G. Abnormal PMC microtubule distribution pattern and chromosome behavior resulted in low pollen fertility of an intersubspecific autotetraploid rice hybrid. Plant Systematics and Evolution, v. 291, n. 3-4, p. 257-265, 2010.

HEDBERG, I. Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. III. Investigations of Swiss and Austrian population samples. Svensk Botanisk Tidskrift, v. 63, p. 233-250, 1969.

HEGARTY, M.; HISCOCK, S. Polyploidy: Doubling up for evolutionary success. Current Biology, v. 17, n. 21, p. R927-R929, 2007.

HEGARTY, M. J.; HISCOCK, S. J. (2008) Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. Current Biology, v. 18, n. 10, p. R435-R444, 2008.

HEGARTY, M. J.; BARKER, G. L.; BRENNAN, A. C.; EDWARDS, K. J.; ABBOTT, R. J.; HISCOCK, S. J. Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants: further insights from transcriptomic studies in Senecio. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 363, n. 1506, p. 3055-3069, 2008.

HEGARTY, M.; COATE, J.; SHERMAN-BROYLES, S.; ABBOTT, R.; HISCOCK, S.; DOYLE, J. Lessons from natural and artificial polyploids in higher plants. Cytogenetic and genome research, v. 140, n. 2-4, p. 204-225, 2013.

HEITZ, E. Das heterochromatin der moose. Jahrb Wiss Botanik, v. 69, p. 762-818, 1928.

HEITKAM, T.; PETRASCH S.; ZAKRZEWSKI, F.; KÖGLER, A.; WENKE, T.; WANKE, S.; SCHMIDT, T. Next-generation sequencing reveals differentially amplified tandem repeats as a major genome component of Northern Europe's oldest *Camellia japonica*. Chromosome Research, v. 23, n. 4, p. 791-806, 2015.

HEMLEBEN, V.; KOVARIK, A.; TORRES-RUIZ, R. A.; VOLKOV, R. A.; BERIDZE, T. Plant highly repeated satelliteDNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. Systematics and Biodiversity, v. 5, n. 3, p. 277-289, 2007.

HENEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. The Plant Cell, v. 12, n. 5, p. 617-635, 2000.

HESLOP-HARRISON, J. S.; MURATA, M.; OGURA, Y.; SCHWARZACHER, T.; MOTOYOSHI, F. Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes. The Plant Cell, v. 11, n. 1, p. 31-42, 1999.

HIRSCH, C. D.; JIANG, J. Centromere sequences, structure, and biology. In: WENDEL, J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LEITCH, I. J. (Eds.). Plant genome diversity volume 1: Plants genomes, their residents, their evolutionary dynamics. Wien/New York: Springer, 2012. cap. 3, p. 59-70.

HIZUME, M.; ABE, K. K.; TANAKA, A. Fluorescent chromosome banding in the Taxodiaceae. *La Kromosomo*, v. 11, n. 50, p. 1609-1619, 1988.

HIZUME, M. Chromosomes of *Ginkgo biloba*. In: HORI, T.; RIDGE, R. W.; TULECKE, W.; DEL TREDICI, P.; TRÉMOUILLAUX-GUILLEL, J.; TOBE, H. *Ginkgo biloba*-a global treasure. Tokyo: Springer, 1997. cap. 9, p. 109-118.

HIZUME, M.; KUZUKAWA, Y. Fluorescent chromosome banding in *Picea* II. Relationships between rDNA loci and chromomycin A3- bands in somatic chromosomes of *Picea jezoensis* var. *hondoensis*. *La Kromosomo*, v. 79, p. 2754-2759, 1995.

HIZUME, M.; KUROSE, N.; SHIBATA, F.; KONDO, K. Molecular cytogenetic studies on sex chromosomes and proximal heterochromatin containing telomere-like sequences in *Cycas revoluta*. *Chromosome science*, v. 2, n. 2, p. 63-72, 1998.

HIZUME, M.; SHIBATA, F.; MATSUSAKI, Y.; GARAJOVA, Z. Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of *Pinus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, n. 4, p. 491-497, 2002.

HOUBEN, A.; SCHROEDER-REITER, E.; NAGAKI, K.; NASUDA, S.; WANNER, G.; MURATA, M.; ENDO, T. R. CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. *Chromosoma*, v. 116, n. 3, p. 275-283, 2007.

HRIBOVA, E.; NEUMANN, P.; MATSUMOTO, T.; ROUX, N.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing. *BMC Plant Biology*, v. 10, n. 1, p. 204, 2010.

HU, G.; HAWKINS, J. S.; GROVER, C. E.; WENDEL, J. F. The history and disposition of transposable elements in polyploid *Gossypium*. *Genome*, v. 53, n. 8, p. 599-607, 2010.

HUANG, S.; LI, R.; ZHANG, Z.; LI, L.; GU, X.; FAN, W.; LUCAS, W. J.; WANG, X.; XIE, B.; NI, P.; REN, Y.; ZHU, H.; LI, J.; LIN, K.; JIN, W.; FEI, Z.; LI, G.; STAUB, J.; KILIAN, A.; VAN DER VOSSEN, E. A. G.; WU, Y.; GUO, J.; HE, J.; JIA, Z.; REN, Y.; TIAN, G.; LU, Y.; RUAN, J.; QIAN, W.; WANG, M.; HUANG, Q.; LI, B.; XUAN, Z.; CAO, J.; ASAN, W. U. Z.; ZHANG, J.; CAI, Q.; BAI, Y.; ZHAO B.; HAN, Y.; LI, Y.; LI, X.; WANG, S.; SHI, Q.; LIU, S.; CHO, W. K.; KIM, J.-Y.; XU, Y.; HELLER-USZYNSKA K.; MIAO, H.; CHENG, Z.; ZHANG, S.; WU, J.; YANG, Y.; KANG, H.; LI, M.; LIANG, H.; REN, X.; SHI, Z.; WEN, M.; JIAN, M.; YANG, H.; ZHANG, G.; YANG, Z.; CHEN, R.; LIU, S.; LI, J.; MA, L.; LIU, H.; ZHOU, Y.; ZHAO, J.; FANG, X.; LI, G.; FANG, L.; LI, Y.; LIU, D.; ZHENG, H.; ZHANG, Y.; QIN, N.; LI, Z.; YANG, G.; YANG, S.; BOLUND, L.; KRISTIANSEN, K.; ZHENG, H.; LI, S.; ZHANG, X.; YANG, H.; WANG, J.; SUN, R.; ZHANG, B.; JIANG, S.; WANG, J.; DU, Y.; LI, S. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature genetics*, v. 41, n. 12, p. 1275-1281, 2009.

HUDAKOVA, S.; MICHALEK, W.; PRESTING, G. G.; TEN HOPEN, R.; DOS SANTOS, K.; JASENCAKOVA, Z.; SCHUBERT, I. Sequence organization of barley centromeres. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 24, p. 5029-5035, 2001.

HUSBAND, B. C.; BALDWIN, S. J.; SUDA, J. The incidence of polyploidy in natural plant populations: Major patterns and evolutionary processes. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 16, p. 255-276.

INGLE, J.; TIMMIS, J. N.; SINCLAIR, J. The relationship between satellite deoxyribonucleic acid, ribosomal ribonucleic acid gene redundancy, and genome size in plants. *Plant Physiology*, v. 55, n. 3, p. 496-501, 1975.

ISLAM-FARIDI, M. N.; NELSON, C. D.; KUBISIAK, T. L. Reference karyotype and cytomolecular map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Genome*, v. 50, n. 2, p. 241-251, 2007.

JACKSON, S.; CHEN, Z. J. Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, n. 2, p. 153-159, 2010.

JAKOWITSCH, J.; PAPP, I.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Identification of a new family of highly repetitive DNA, NTS9, that is located predominantly on the S9 chromosome of tobacco. *Chromosome Research*, v. 6, n. 8, p. 649-651, 1998.

JAMILENA, M.; GARRIDORAMOS, M.; REJON, M. R.; REJON, C. R.; PARKER, J. S. Characterization of repeated sequences from micro-dissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*, v. 104, n. 2, p. 113-120, 1995.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J.; VIEIRA, R.; SILVA, D.; BIZZO, H.; GRACINDO, L. Agronomic evaluation and identification of *Lippia alba* chemotypes from Distrito Federal, Brazil. *Horticultura Brasileira*, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

JANOUSEK, B.; HOBZA, R.; VYSKOT, B. Chromosomes and sex differentiation. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 11, p. 167-186.

JIANG, J.; BIRCHLER, J. A.; PARROTT, W. A.; DAWE, R. K. A molecular view of plant centromeres. *Trends in Plant Science*, v. 8, n. 12, p. 570-575, 2003.

JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, v. 49, n. 9, p. 1057-1068, 2006.

JIAO, Y.; WICKETT, N. J.; AYYAMPALAYAM, S.; CHANDERBALI, A. S.; LANDHERR, L.; RALPH, P. E.; TOMSHO, L. P.; HU, Y.; LIANG, H.; SOLTIS P. S.; SOLTIS, D. E.; CLIFTON, S. W.; SCHLARBAUM, S. E.; SCHUSTER, S. C.; MA, H.;

LEEBENS-MACK, J.; DEPAMPHILIS, C. W. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, v. 473, n. 7345, p. 97-100, 2011.

JORDON-THADEN, I.; KOCH, M. Species richness and polyploid patterns in the genus *Draba* (Brassicaceae): a first global perspective. *Plant Ecology & Diversity*, v. 1, n. 2, p. 255-263, 2008.

KAO, R. H. The coexistence of polyploids in *Arnica cordifolia* (Asteraceae). 2006. 122 f. Tese (Doutorado em Ecology and Evolutionary Biology). University of California, Santa Cruz.

KAO, R. H. Asexuality and the coexistence of cytotypes. *New Phytologist*, v. 175, n. 4, p. 764-772, 2007.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*, v. 160, n. 4, p. 1651-1659, 2002.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics*, v. 33, n. 1, p. 102-106, 2003.

KATO, A.; LAMB, J. C.; ALBERT, P. S.; DANILOVA, T.; HAN, F.; GAO, Z.; FINDLEY, S.; BIRCHLER, J. A. Chromosome painting for plant biotechnology. In: BIRCHLER, J. A. (Org.). *Plant chromosome engineering: methods and protocols, methods in molecular biology*. New York: Humana, 2011. cap. 3, p. 67-96.

KEELER, K. H.; DAVIS, G. A. Comparison of Common Cytotypes of *Andropogon gerardii* (Andropogoneae, Poaceae). *American Journal of Botany*, v. 86, n. 7, p. 97-979, 1999.

KENTON, A.; PAROKONNY, A. S.; GLEBA, Y. Y.; BENNETT, M. D. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 240, n. 2, p. 159-169, 1993.

KHANDELWAL, S. Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 102, n. 3, p. 205-217, 1990.

KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; CERMAK, T.; KUBAT, Z.; VYSKOT, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*, v. 102, n. 6, p. 533-541, 2009.

KEJNOVSKY, E.; HAWKINS, J. S.; FESCHOTTE, C. (2012) Plant transposable elements: biology and evolution. In: WENDEL, J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LEITCH, I. J. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 1: Plants genomes, their residents, their evolutionary dynamics*. Wien/New York: Springer, 2012. cap. 2, p. 17-34.

KHOSHOO, T. N. Polyploidy in gymnosperms. *Evolution*, v. 13, n. 1, p. 24-39, 1959.

KIHARA, H.; ONO, T. Chromosomenzahlen und systematische *Gruppierung der Rumex*-Arten. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie, v. 4, n. 3, p. 475-481, 1926.

KIKUCHI, S.; KISHII, M.; SHIMIZU, M.; TSUJIMOTO, H. Centromere-specific repetitive sequences from *Torenia*, a model plant for inter-specific fertilization, and whole-mount FISH of its interspecific hybrid embryos. Cytogenetic and genome research, v. 109, n. 1-3, p. 228-235, 2005.

KILIAN, A.; STIFF, C.; KLEINHOF, A. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 92, n. 21, p. 9555-9559, 1995.

KILIAN, B.; GRANER, A. NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks. Briefings in Functional Genomics, v. 11, n. 1, p. 38-50, 2012.

KIROV, I.V.; KISELEVA, A.V.; VAN LAERE, K.; VAN ROY, N.; KHRUSTALEVA, L.I. Tandem repeats of *Allium fistulosum* associated with major chromosomal landmarks. Molecular Genetics and Genomics. DOI 10.1007/s00438-016-1286-9. 2017

KNIGHT, C. A.; MOLINARI, N.; PETROV, D. A. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. Annals of Botany, v. 95, n. 1, p. 177-190, 2005.

KOH, J.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Homeolog loss and expression changes in natural populations of the recently and repeatedly formed allotetraploid *Tragopogon mirus* (Asteraceae). BMC genomics, v. 11, n. 1, p. 97, 2010.

KOHLER, C.; SCHEID, O. M.; ERILOVA, A. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. Trends in Genetics, n. 26, n. 3, p. 142-148, 2010.

KOJIMA, K. K.; KUBO, Y.; FUJIWARA, H. Complex and tandem repeat structure of subtelomeric regions in the Taiwan cricket, *Teleogryllus taiwanemma*. Journal of molecular evolution, v. 54, n. 4, p. 474-485, 2002.

KOKUBUGATA, G.; KONDO, K.; WILSON, G. W.; RANDALL, L. M.; VAN DER SCHANS, A.; MORRIS, D. K. Comparison of karyotype and rDNA-distribution in somatic chromosomes of *Bowenia species* (Stangeriaceae, Cycadales). Australian Systematic Botany, v. 13, n. 1, p. 15-20, 2000.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. Cell, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KOVASLKY, I. E.; NEFFA, V. G. S. Evidence of 2n microspore production in natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. Journal Plant Research, v. 125, n. 6, p. 725-734, 2012.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature genetics*, v. 33, n. 1, p. 102-106, 2003.

KUBAT, Z.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. (2008) Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*, v. 51, n. 5, p. 350-356, 2008.

KUBIS, S.; SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Annals of Botany*, v. 82, n. suppl 1, p. 45-55, 1998.

KUO, H. F.; OLSEN, K. M.; RICHARDS, E. J. Natural variation in a subtelomeric region of *Arabidopsis*: Implications for the genomic dynamics of a chromosome end. *Genetics*, v. 173, n. 1, p. 401-417, 2006.

KUMAR, P.; SINGHAL, V. K.; KAUR, D.; KAUR, S. Cytomixis and associated meiotic abnormalities affecting pollen fertility in *Clematis orientalis*. *Biologia Plantarum*, v. 54, n. 1, p. 181-184, 2010.

KUTA, E.; PRZYWARA, L. Cytotaxonomy of bryophytes in the Department of Plant Cytology and Embryology, Institute of Botany, Jagiellonian University, Krakow, Poland. *IOPB Newsl*, v. 32, p. 3-8, 2000.

KÜRSCHNER, W. M.; BATENBURG, S. J.; MANDER, L. Aberrant Classopollis pollen reveals evidence for unreduced (2n) pollen in the conifer family Cheirolepidiaceae during the Triassic-Jurassic transition. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 280, n. 1768, p. 1-8, 2013.

LAMB, J. C.; MEYER, J. M.; CORCORAN, B.; KATO, A.; HAN, F.; BIRCHLER, J. A. (2007) Distinct chromosomal distributions of highly repetitive sequences in maize. *Chromosome Research*, v. 15, n. 1, p. 33-49, 2007.

LAPITAN, N. L. V.; GANAL, M. W.; TANKSLEY, S. D. Somatic chromosome karyotype of tomato based on in situ hybridization of the TGRI satellite repeat. *Genome*, v. 32, n. 6, p. 992-998, 1989.

LARROSA, F. H.; MAUNE, J. F.; ERAZZÚ, L. E.; CAMADRO, E. L. Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. *Plant Biology*, v.14, n.1, p. 223-233, 2012

LATTOO, S. K.; KHAN, S.; BAMOTRA, S.; DHAR, A. K. (2006) Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq.—an additional strategy and possible implications. *Journal of Biosciences*, v. 31, n. 5, p. 629-637, 2006.

LAVIA, G. I.; ORTIZ, A. M.; ROBLEDO, G.; FERNÁNDEZ, A.; SEIJO, G. Origin of triploid *Arachis pintoii* (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behaviour. *Annals of Botany*, v. 108, n. 1, p. 103-11, 2011.

LAZAREVIC, M.; KUZMANOVIC, N.; LAKUŠIĆ, D.; ALEGRO, A.; SCHÖNSWETTER, P.; FRAJMAN, B. Patterns of cytotype distribution and genome size variation in the genus *Sesleria* Scop . (Poaceae), *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 179, n. 1, p. 126-143, 2015.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 82, n. 4, p. 651-663, 2004

LEITCH, I. J.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; BENNETT, M. D. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 207-217, 2005.

LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*, v. 320, n. 5875, p. 481-483, 2008.

LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R. Genome Size Diversity and Evolution in Land Plants. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 19, p. 307-322.

LEVAN, A. Cytological studies in *Allium*. I. Chromosome morphological contributions. *Hereditas*, v. 16, n. 3, p. 257-294, 1932.

LEVAN, A.; FREDGA, A.; SANDERBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. *Hereditas*, v. 52, n. 3, p. 201-220, 1964.

LEVIN, D. A.; FUNDERBURG, S. W. Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. *The American Naturalist*, v. 114, n. 6, p. 784-795, 1979.

LEVIN, D. A. Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*, v. 122, n. 1, p. 1-25, 1983.

LEVIN, D. A. *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford: Oxford University Press, 2002.

LEVITZKY G.A. 1931. The karyotype in systematics. *Bull Appl Bot Genet Plant Breed* 27:220–240

JACKSON, R. C. The karyotype in systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 2, n. 1, p. 327-368, 1971.

LEWIS, W. H.; OLIVER, R. L.; SUDA, Y. Cytogeography of *Claytonia virginica* and its allies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 54, n. 2, p. 153-171, 1967.

LI, X-Q.; DU, D. Variation, evolution, and correlation analysis of C+G content and genome or chromosome size in different kingdoms and phyla. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. 1-18, 2014.

LI, J.; YANG, F.; ZHU, J.; HE, S.; LI, L. Characterization of a tandemly repeated subtelomeric sequence with inverted telomere repeats in maize. *Genome*, v. 52, n. 3, p. 286-293, 2009.

LIM, K. Y.; MATYAEK R.; LICHTENSTEIN, C. P.; LEITCH, A. R. Molecular's cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. *Chromosoma*, v. 109, n. 4, p. 245-258, 2000a.

LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; MATYASEK, R.; BEZDEK, M.; LICHTENSTEIN, C. P.; LEITCH, A. R. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*, v. 109, n. 3, p. 161-172, 2000b.

LIM, K. Y.; MATYASEK, R.; KOVARIK, A.; FULNECEK, J.; LEITCH, A. R. Molecular cytogenetics and tandem repeat sequence evolution in the allopolyploid *Nicotiana rustica* compared with diploid progenitors *N. paniculata* and *N. undulata*. *Cytogenetics and Genome Research*, v. 109, n. 1-3, p. 298-309, 2005.

LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; MATYASEK, R.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; MCCARTHY, E.; CLARKSON, J. J.; LEITCH, A. R. Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section Alatae. *The Plant Journal*, v. 48, n. 6, p. 907-919, 2006.

LIM, K. Y.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J.; MATYASEK, R. SRUBAROVA, H.; KOVARIK, A.; PIRES, J. C.; XIONG, Z.; LEITCH, A. R. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). *PLoS One*, v. 3, n. 10, p. 1-13, 2008.

LINARDOPOULOU, E. V.; WILLIAMS, E. M.; FAN, Y.; FRIEDMAN, C.; YOUNG, J. M.; TRASK, B. J. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature*, v. 437, n. 7055, p. 94-100, 2005.

LOUIS, E. J.; VERSHININ, A. V. Chromosome ends: different sequences may provide conserved functions. *Bioessays*, v. 27, n. 7, p. 685-697, 2005.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, v. 98, n. 3, p. 679-689, 2006.

LÖVE Á, LÖVE D. Arctic polyploidy. *Proceedings of the Genetics Society of Canada*, v. 2, p. 23-27, 1957.

LUKENS, L. N.; PIRES, J. C.; LEON, E.; VOGELZANG, R.; OSLACH, L.; OSBORN, T. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly

resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiology*, v. 140, n. 1, p. 336-348, 2006.

LUMARET, R.; GUILLERM, J. L.; DELAY, J.; LOUTFI, A. A. L.; IZCO, J.; JAY, M. Polyploidy and habitat differentiation in *Dactylis glomerata* L from Galicia (Spain). *Oecologia*, v. 73, n. 3, p. 436-446, 1987.

LIU, H.; YAN, G.; SHAN, F.; SEDGLEY, R. Karyotypes in *Leucadendron* (Protaceae): evidence of the primitiveness of the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 151, n. 4, p. 387-394, 2006.

LIU, Z.; YUE, W.; LI, D.; WANG, R.; KONG, X.; LU, K.; WANG, G.; DONG, Y.; JIN, W.; ZHANG, X. Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. *Chromosoma*, v. 117, n. 5, p. 445-456, 2008.

LUKENS, L. N.; PIRES, J. C.; LEON, E.; VOGELZANG, R.; OSLACH, L.; OSBORN, T. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiology*, v. 140, n. 1, p. 336-348, 2006.

LYRENE, P. M.; VORSA, N.; BALLINGTON, J. R. Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica*, v. 133, n. 1, p. 27-36, 2003.

LYSÁK, M. A.; SCHUBERT, I. Mechanisms of chromosome rearrangements In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Eds.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 9, p. 137-147.

MA, X. F.; GUSTAFSON, J. P. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenetic and genome research*, v. 109, n. 1-3, p. 236-249, 2005.

MACAS, J.; NEUMANN, P.; NAVRATILOVA, A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *Bmc Genomics*, v. 8, n. 1, p. 427, 2007.

MACAS, J.; KOBLIZKOVA, A.; NAVRATILOVA, A.; NEUMANN, P. Hypervariable 3' UTR region of plant LTR-retrotransposons as a source of novel satellite repeats. *Gene*, v. 448, n. 2, p. 198-206, 2009.

MACAS, J.; KEJNOVSKÝ, E.; NEUMANN, P.; NOVÁK, P.; KOBLÍŽKOVÁ, A.; VYSKOT, B. Next generation sequencing-based analysis of repetitive DNA in the model dioecious [corrected] plant *Silene latifolia*. *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. 1-12, 2011.

MADLUNG, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*, v. 110, n. 2, p. 99-104, 2013.

- MAGOON, M. L.; SHAMBULINGUPPA, K. G. Karyomorphology of *Sorghum propinquum* and its bearing on origin of 40-chromosome sorghum. *Chromosoma*, v. 12, n. 1, p. 460-465, 1961.
- MÁNDÁKOVÁ, T.; MUMMENHOFF, K.; AL-SHEHBAZ, I. A.; MUCINA, L.; MÜHLHAUSEN, A.; LYSÁK, M. A. Whole-genome triplication and species radiation in the southern African tribe Heliophileae (Brassicaceae). *Taxon*, v. 61, n. 5, p. 989-1000, 2012.
- MANTU, D. E.; SHARMA, A. K. Cytomixis in pollen mother cells of an apomictic ornamental *Ervatamia diraricata* Linn., Alston. *Cytologia*, v. 48, n. 1, p. 201-207, 1983.
- MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.
- MARTIENSSEN, R. A. Maintenance of heterochromatin by RNA interference of tandem repeats. *Nature genetics*, v. 35, n. 3, p. 213, 2003.
- MARTIN, P. G. Variation in amounts of nucleic acids in cells of different species of higher plants. *Experimental cell research*, v. 44, n. 1, p. 84-94, 1966.
- MARTIN, G. E.; ROUSSEAU-GUEUTIN, M.; CORDONNIER, S.; LIMA, O.; MICHON-COUDOUEL, S.; NAQUIN, D.; DE CARVALHO, J. F.; AÏNOUCHE, M.; SALMON A.; AÏNOUCHE, A. The first complete chloroplast genome of the Genistoid legume *Lupinus luteus*: evidence for a novel major lineage-specific rearrangement and new insights regarding plastome evolution in the legume family. *Annals of Botany*, v. 113, n. 7, p. 1197-1210, 2014.
- MARTINEZ-ZAPATER, J. M.; ESTELLE, M. A. SOMERVILLE, C. R. A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 204, n. 3, p. 417-423, 1986.
- MASON, A. S.; PIRES J. C. Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends in Genetics*, v. 31, n. 1, p. 5-10, 2015.
- MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, v. 264, n. 5157, p. 421-423, 1994.
- MATYASEK, R.; GAZDOVA, B.; FAJKUS, J.; BEZDEK, M. NTRS, a new family of highly repetitive DNAs specific for the T1 chromosome of tobacco. *Chromosoma*, v. 106, n. 6, p. 369-379, 1997.
- MAVRODIEV, E. V.; CHESTER, M.; SANTIAGO, V. N. S.; VISGER S. J.; RODRIGUEZ, R.; SUSANNA, A.; BALDINI, R. M.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Multiple origins and chromosomal novelty in the allotetraploid *Tragopogon castellanus* (Asteraceae). *New Phytologist*, v. 206, n. 3, p. 1172-1183, 2015.

MCCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. *Science*, v. 69, n. 1798, p. 629-629, 1929.

MCCLINTOCK, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*, v. 26, n. 2, p. 234-282, 1941.

MCCLINTOCK, B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics*, v. 23, n. 4, p. 315, 1938.

MCCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, v. 226, n. 4676, p. 792-801, 1984.

MCCOY, T. J. The inheritance of 2n pollen formation in diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 24, n. 3, p. 315-323, 1982.

MEHROTRA, S.; GOEL, S.; RAINA, S. N.; RAJPAL, V. R. Significance of satellite DNA revealed by conservation of a widespread repeat DNA sequence among angiosperms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 173, n. 7, p. 1790-1801, 2014.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, v. 12, n. 4, p. 164-171, 2014.

MEISTER, A.; BAROW, M. DNA base composition of plant genomes. In: DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. (Orgs.). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. cap. 8, p. 177-215.

MENZEL, G.; DECHYEVA, D.; WENKE, T.; HOLTGRAWE, D.; WEISSHAAR, B.; SCHMIDT, T. Diversity of a complex centromeric satellite and molecular characterization of dispersed sequence families in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Annals of Botany*, v. 102, n. 4, p. 521-530, 2008.

MESA-ARANGO, A.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

MESTIRI, I.; CHAGUÉ, V.; TANGUY, A-M.; HUNEAU, C.; HUTEAU, V.; BELCRAM, H.; CORITON, O.; CHALHOUB, B.; JAHIER, J. Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytologist*, v. 186, n. 1, p. 86-101, 2010.

MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B.; PAVLEK, M.; VOJVODA-ZELJKO, T.; ŠATOVIĆ, E.; PLOHL, M. Structural and functional liaisons between transposable elements and satellite DNAs. *Chromosome Research*, v. 23, n. 3, p. 583-596, 2015.

- MICHAEL, T. P.; JACKSON, S. The first 50 plant genomes. *The Plant Genome*, v. 6, n. 2, p. 1-7, 2013.
- MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; et al. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, v. 452, n. 7190, p. 991-996, 2008.
- MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Research*, v. 5, n. 2, p. 86-92, 1997.
- MLINAREC, J.; SATOVIĆ, Z.; MIHELJ, D.; MALENICA, N.; BESENDORFER, V. Cytogenetic and phylogenetic studies of diploid and polyploid members of tribe Anemoninae (Ranunculaceae). *Plant Biology*, v. 14, n. 3, p. 525-536, 2012.
- MRÁZ, P.; ŠINGLIAROVÁ, B.; URFUS, T.; KRAHULEC, F. Cytogeography of *Pilosella officinarum* (Compositae): altitudinal and longitudinal differences in ploidy level distribution in the Czech Republic and Slovakia and the general pattern in Europe. *Annals of Botany*, v. 101, n. 1, p. 59-71, 2008.
- MISRA, R. N.; SHASTRY, S. V. S. Pachytene analysis in *Oryza*. VIII. Chromosome morphology and karyotypic variation in *O. sativa*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 27, p. 349-68, 1926.
- MOLDENKE, H. N. Materials towards a monograph of the genus *Lippia* L. *Phytologia*, v. 12, n. 1, p. 54-65, 1965.
- MOSCONE, E. A.; SAMUEL, R.; SCHWARZACHER, T.; SCHWEIZER, D.; PEDROSA-HARAND, A. Complex rearrangements are involved in *Cephalanthera* (Orchidaceae) chromosome evolution. *Chromosome Research*, v. 15, n. 7, p. 931-943, 2007.
- MOSQUIN, T. Evidence for autopolyploidy in *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Evolution*, v. 21, n. 4, p. 713-719, 1967.
- MÚLGURA DE ROMERO, M. E.; ROTMAN, A. D.; ATKINS, S. Flora fanerogámica Argentina: fascículo 84. 253. Verbenaceae, parte 1. Subfamilia I. Verbenoideae, parte 1. Tribu II. Lantaneae, parte A (excepto Lantana, Neosparton, Xeroaloyisia). ProFlora Conicet, Cordoba, 46p. 2003.
- MURRAY, B. G. Nuclear DNA amounts in gymnosperms. *Annals of Botany*, v. 82, n. suppl 1, p. 3-15, 1998.
- MURRAY, B. G. Karyotype variation and evolution in gymnosperms. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 17, p. 277-293.

NAGAKI, K.; MURATA, M. Characterization of CENH3 and centromere-associated DNA sequences in sugarcane. *Chromosome Research*, v. 13, n. 2, p. 195-203, 2005.

NAGAKI, K.; CHENG, Z. K.; OUYANG, S.; TALBERT, P. B.; KIM, M.; JONES, K. M.; HENIKOFF, S.; BUELL, C. R.; JIANG, J. M. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nature Genetics*, v. 36, n. 2, p. 138-145, 2004.

NAKAGAWA, M.; OHKAWA, T.; KANEKO, Y. Flow cytometric assessment of cytotype distributions within local populations of *Phragmites australis* (Poaceae) around Lake Biwa, the largest lake in Japan. *Plant Species Biology*, v. 28, n. 1, p. 94-100, 2013.

NARAYAN, R. K. J. The role of genomic constraints upon evolutionary changes in genome size and chromosome organization. *Annals of Botany*, v. 82, n. suppl 1, p. 57-66, 1998.

NAUMOVA, T. N.; HAYWARD M. D.; WAGENVOORT, M. Apomixia and sexuality and diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sexual Plant Reproduction*, v. 12, n. 1, p. 43-52, 1999.

NAVRATILOVA, A.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Karyotype analysis of four *Vicia* species using in situ hybridization with repetitive sequences. *Annals of Botany*, v. 91, n. 7, p. 921-926, 2003.

NEVES, N.; DELGADO, M.; SILVA, M.; CAPERTA, A.; MORAIS-CECÍLIO L.; VIEGAS, W. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and genome research*, v. 109, n. 1-3, p. 104-111, 2005.

NORRMANN, G. A.; QUARIN, C. L.; BURSON, B. L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosomes races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity*, v. 80, n. 1, p. 24-28, 1989.

NOVAK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, v. 11, n. 1, p. 378, 2010.

NUNES, A. C. P.; CLARINDO, W. R. Karyotype characterization and nuclear DNA content measurement in Bromeliaceae: state of the art and future perspectives, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 4, p. 1849-1862, 2014.

NYGREN, A. Further studies in spontaneous and synthetic *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas*, v. 34, n. 1-2, p. 113-134, 1948.

OGUR, M.; ERICKSON, R. O.; ROSEN, G. U.; SAX, K. B.; HOLDEN, C. Nucleic acids in relation to cell division in *Lilium longiflorum*. *Experimental Cell Research*, v. 2, n. 1, p. 73-89, 1951.

O'LEARY, N.; DENHAM, S.S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M.E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 170, p. 197–219.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

ORNDUFF, R. Cytogeography of *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Taxon*, v. 19, n. 5, p. 715-719, 1970.

OTTO, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in Cell Biology*, v. 33, p. 105-110, 1990.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, v. 34, n. 1, p. 401-437, 2000.

OZKAN, H.; LEVY, A. A.; FELDMAN, M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *The Plant Cell*, v. 13, n. 8, p. 1735-1747, 2001.

OZKAN, H.; TUNA, M.; ARUMUGANATHAN, K. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Journal of Heredity*, v. 94, n. 3, p. 260-264, 2003.

PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *The New Phytologist*, v. 186, n. 1, p. 5-17, 2010.

PATERSON, H. A.; WANG, X.; LI, J.; TANG, H. 2012. Ancient and recent polyploidy in monocots. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D. E. (Orgs.). *Polyploidy and Genome Evolution*. London: Springer, 2012. cap. 6, p. 93-108.

PATON, A. J.; BRUMMITT, N.; GOVAERTS, R.; HARMAN, K.; HINCHCLIFFE, S.; ALLKIN, B.; LUGHADHA, E. N. Towards target 1 of the global strategy for plant conservation: a working list of all known plant species—progress and prospects. *Taxon*, v. 57, n. 2, p. 602-611, 2008.

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 64, n. 2, p. 600-604, 1969.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; CHAPMAN, B. A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 26, p. 9903-9908, 2004.

PÉCRIX, Y.; RALLO, G.; FOLZER, H.; CIGNA, M.; GUDIN, S.; LE BRIS, M. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete

formation in *Rosa* sp. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 10, p. 3587–3597, 2011.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 100, n. 3-4, p. 361-367, 2000.

PELLICER, J.; FAY, M. F.; GARDENS, R. B.; TW, R. S. The largest eukaryotic genome of them all ? *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 164, n. 1, p. 10-15, 2010.

PERUZZI, L.; LEITCH, I. J.; CAPARELLI, K. F. Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Annals of Botany*, v. 103, n. 3, p. 459-475, 2009.

PESTSOVA, E. G.; GONCHARO, V. N. P.; SALINA, E. A. Elimination of a tandem repeat of telomeric heterochromatin during the evolution of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 97, n. 8, p. 1380-1386, 1998.

PETRAČEK, M. E.; LEFEBVRE, P. A.; SILFLOW, C. D.; BERMAN, J. Chlamydomonas telomere sequences are A + T-rich but contain three consecutive G-C base pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 21, p. 8222-8226, 1990.

PETIT, M.; LIM, K. Y.; JULIO, E.; PONCET, C.; DORLHAC DE BORNE, F.; KOVARIK, A.; LEITCH, A. R.; GRANDBASTIEN, M-A.; MHIRI, C. Differential impact of retrotransposon populations on the genome of allotetraploid tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Molecular Genetics and Genomics*, v. 278, n. 1, p. 1-15, 2007.

PETIT, M.; GUIDAT, C.; DANIEL, J.; DENIS, E.; MONTORIOL, E.; BUI, Q.T.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; LEITCH, A. R.; GRANDBASTIEN, M. A.; MHIRI, C. Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco. *New Phytologist*, v. 186, n. 1, p. 135-147, 2010.

PICH, U.; FUCHS, J.; SCHUBERT, I. How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Research*, v. 4, n. 3, p. 207-213, 1996.

PIERRE, P. M. O.; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 3, p. 993-1005, 2011.

PIERRE, P. M. O. Poliploidia em acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br (Verbenaceae). 2008. 113 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- PIERRE, P. M. O. Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br (Verbenaceae). 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PIRES, J. C.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; MATYASEK, R.; BOYD, A.; LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *American Journal of Botany*, v. 91, n. 7, p. 1022-1035, 2004.
- PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MESTROVIC, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene*, v. 409, n. 1, p. 72-82, 2008.
- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. *Genome Dynamics*, v. 7, p. 126-152, 2012.
- POMPANON, F.; SAMADI, S. Next generation sequencing for characterizing biodiversity: promises and challenges. *Genetica*, v. 143, n. 2, p. 133-138, 2015.
- QUARIN, C. G.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E. J.; PESSINO, S. C.; BOVO, O. A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*, v. 13, n. 5, p. 243-249, 2001.
- DEL BOSQUE, M. E. Q.; LÓPEZ-FLORES, I.; SUÁREZ-SANTIAGO, V. N.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Differential spreading of HinfI satellite DNA variants during radiation in Centaureinae. *Annals of Botany*, v. 112, n. 9, p. 1793-1802, 2013.
- DEL BOSQUE, M. E. Q.; LÓPEZ-FLORES, I.; SUÁREZ-SANTIAGO, V. N.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite-DNA diversification and the evolution of major lineages in Cardueae (Carduoideae, Asteraceae). *Journal of plant research*, v. 127, n. 5, p. 575-583, 2014.
- RAINA, S. N.; PARIDA, A.; KOUL, K. K.; SALIMATH, S. S.; BISHT, M. S.; RAJA, V.; KHOSHOO, T. N. Associated chromosomal DNA changes in polyploids. *Genome*, v. 37, n. 4, p. 560-564, 1994.
- RAMANNA, M. S.; PRAKKEN, R. Structure of and homology between pachytene and somatic metaphase chromosomes of the tomato. *Genetica*, v. 38, n. 1, p. 115-133, 1967.
- RAMSEY, J. Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity*, v. 98, n. 3, p. 143-150, 2007.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 29, n. 1, p. 467-501, 1998.

RASMUSSEN, S. W.; HOLM, P. B.; LU, B. C.; ZICKLER, D.; SAGE, J. Synaptonemal complex formation and distribution of recombination nodules in pachytene trivalents of triploid *Coprinus cinereus*. Carlsberg Research Communications, v. 46, n. 5, p. 347-360, 1981.

RAUSCH, J. H.; MORGAN, M. T. The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autopolyploid establishment. Evolution, v. 59, n. 9, p. 1867-1875, 2005.

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VALE, A. A.; PIERRE, P. M. O.; FRANCO, A. L.; CAMPOS, J. M. S.; VIEIRA, R. F.; VICCINI, L. F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? American Journal of Botany, v. 101, n. 6, p. 1002-1012, 2014.

REIS, A. C.; SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid *Lippia alba*. Plant Systematic and Evolution, v. 302, n. 1, p. 121-127, 2016.

RENNY-BYFIELD, S.; CHESTER, M.; KOVARIK, A.; LE COMBER, S.; GRANDBASTIEN, M.; DELOGER, M.; NICHOLS, R.; MACAS, J.; NOVAK, P.; CHASE, M.; LEITCH, A. Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. Molecular Biology and Evolution, p. msr112, 2011.

RENNY-BYFIELD, S.; KOVARIK, A.; CHESTER, M.; NICHOLS, R. A.; MACAS, J.; NOVAK, P.; LEITCH, A. R. Independent, rapid and targeted loss of highly repetitive DNA in natural and synthetic allopolyploids of *Nicotiana tabacum*. PLoS One, v. 7, n. 5, p. e36963, 2012.

RICHARDS, A. J. Plant breeding systems. London: Chapman Hall, 1997.

RICHARD, M. M. S.; CHEN, N. W. G.; THAREAU, V.; PFLIEGER, E.; BLANCHET, S.; PEDROSA-HARAND, A.; IWATA, A.; CHAVARRO, C.; JACKSON, S. A.; GEFFROY, V. The subtelomeric khipu satellite repeat from *Phaseolus vulgaris*: lessons learned from the genome analysis of the Andean genotype G19833. Frontiers in Plant Science, v. 4, p. 109, 2013.

RICCIARDI, G.; CICCÍO, J. F.; OCAMPO, R.; LORENZO, D.; RICCIARDI, A.; BANDONI, A.; DELLACASSA, E. Chemical variability of essential oils of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown growing in Costa Rica and Argentina. Natural Product Communications, v. 4, n. 6, p. 853-858, 2009.

RIBEIRO, T.; SANTOS, K. G. B.; RICHARD, M. M. S.; SÉVIGNAC, M.; THAREAU, V.; GEFFROY, V.; PEDROSA-HARAND, A. Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from *Phaseolus beans*. Protoplasma, p. 1-11, 2016.

- ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, n. 1, p. 225, 2012.
- RODRIGUEZ, D. J. A model for the establishment of polyploidy in plants. *The American Naturalist*, v. 147, n. 1, p. 33-46, 1996.
- ROTHERA, S. L.; DAVY, A. J. Polyploidy and habitat differentiation in *Deschampsia cespitosa*. *New Phytologist*, v. 102, n. 3, p. 449-467, 1986.
- ROTHFELS, K.; SEXSMITH, E.; HEIMBURGER, M.; KRAUSE, M. O. Chromosome size and DNA content of species of *Anemone* L. and related genera (Ranunculaceae). *Chromosoma*, v. 20, n. 1, p. 54-74, 1966.
- RUAS, C. D. F.; VANZELA, A. L. L.; SANTOS, M. O.; FREGONEZI, J. N.; RUAS, P. M.; MATZENBACHER, N. I.; DE AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 1, p. 129-139, 2005.
- SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. *Harvard Papers in Botany*, v. 5, n. 2, p. 303-358, 2001.
- SANDERSON, S. C.; STUTZ, H. C. High chromosome numbers in Mojavean and Sonoran desert *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, p. 1045-1053, 1994.
- SANDERY, M. J.; FORSTER, J. W.; BLUNDEN, R.; JONES, N. Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome*, v. 33, n. 6, p. 908-913, 1990.
- SANTOS, J. L.; ALFARO, D.; ARMSTRONG, S. J.; FRANKLIN, F. C. H.; JONES, G. H. Partial diploidization of meiosis in autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, v. 165, n. 3, p. 1533-1540, 2003.
- SCHAEFER, V. G.; MIKSCHE, J. P. Mikrospectrophotometric determination of DNA per cell and polyploidy in *Fraxinus americana* L. *Silvae Genetica*, v. 26, p. 184-192, 1977.
- SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Variability and evolution of highly repeated DNA sequences in the genus *Beta*. *Genome*, v. 36, n. 6, p. 1074-1079, 1993.
- SCHOCKEN, N. R. L. Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill.). N. E. Brown. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *The EMBO Journal*, v. 28, n. 16, p. 2323-2336, 2009.

- SCHRANZ, M. E.; OSBORN, T. C. De novo variation in life-history traits and responses to growth conditions of resynthesized polyploid *Brassica napus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, v. 91, n. 2, p. 174-183, 2004.
- SCHUBERT, I.; LYSAK, M. A. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, v. 27, n. 6, p. 207-216, 2011.
- SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In: HAYMAN, D. L.; ROFE, R. H.; SHARP, P. J. (Orgs.). *Chromosomes today volume 9*. London: Allen & Unwin, 1987. p. 61-74.
- SERENKOV, G. P. Nucleic acids in the evolution of algae [in Russian]. *Izvestiia Akademii Nauk SSSR. Serii Biologicheskaja*, p. 857-868, 1962
- SHAKIROV, E. V.; SHIPPEN, D. E. Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 16, n. 8, p. 1959-1967, 2004.
- SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J. A. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 142, n. 3, p. 309-320, 2003.
- SHAKED, H.; KASHKUSH, K.; OZKAN, H.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *The Plant Cell*, v. 13, n. 8, p. 1749-1759, 2001.
- SHASTRY, S. V. S.; RANGA, R. A. O. DR MISRA, R. N. Pachytene analysis in *Oryza*. I. Chromosome morphology in *Oryza sativa*. *Indian Journal of Genetics*, v. 20, p. 15-21, 1960.
- SHARMA, S.; RAINA, S. N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 109, n. 1-3, p. 15-26, 2005.
- SHIBATA, F.; HIZUME, M.; KUROKI, Y. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma*, v. 108, n. 4, p. 266-270, 1999.
- SHIBATA, F.; HIZUME, M.; KUROKI, Y. Differentiation and the polymorphic nature of the Y chromosomes revealed by repetitive sequences in the dioecious plant, *Rumex acetosa*. *Chromosome Research*, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2000.
- SHOEMAKER, R. C.; SCHLUETER, J.; DOYLE, J. J. Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, n. 2, p. 104-109, 2006.

SINGHAL, V. K.; KUMAR, P. Impact of cytotoxicity on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeata* Royle). *Journal of Biosciences*, v. 33, n. 3, p. 371-380, 2008.

SIOMOS, M. F.; RIHA, K. Telomeres and their biology. In: WENDEL, J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LEITCH, I. J. (Eds.). *Plant genome diversity volume 1: Plants genomes, their residents, their evolutionary dynamics*. Wien/New York: Springer, 2012. cap. 5, p. 71-82.

SLOTKIN, R.; NUTHIKATTU, S.; JIANG, N. The impact of transposable elements on gene and genome evolution. In: WENDEL, J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LEITCH, I. J. (Eds.). *Plant genome diversity volume 1: Plants genomes, their residents, their evolutionary dynamics*. Wien/New York: Springer, 2012. cap. 3, p. 35-58.

SLOVAK, M.; VIT, P.; URFUS, T.; SUDA, J. Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of the Asteraceae. *Journal of Biogeography*, v. 36, n. 2, p. 372-384, 2009.

SMARDA, P.; BURES, P.; HOROVA, L.; FOGGI, B.; ROSSI, G. Genome size and GC content evolution of *Festuca*: ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany*, v. 101, n. 3, p. 421-433, 2008.

SMARDA, P.; BURES, P. Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia*, v. 82, n. 1, p. 41-61, 2010.

SMARDA, P.; BURES, P.; HOROVA, L. The evolution of base composition in monocots. In: *Proceedings of the international workshop on structural and functional diversity of the eukaryotic genome*, Brno: Muni Press, 2010, p. 69.

SMARDA, P.; BURES, P. The variation of base composition in plant genomes. In: WENDEL, J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LEITCH, I. J. (Eds.). *Plant genome diversity volume 1: Plants genomes, their residents, their evolutionary dynamics*. Wien/New York: Springer, 2012. cap. 14, p. 209-235.

SONE, T.; FUJISAWA, M.; TAKENAKA, M.; NAKAGAWA, S.; YAMAOKA, S.; SAKAIDA, M.; NISHIYAMA, R.; YAMATO, K. T.; OHMIDO, N.; FUKUI, K.; FUKUZAWA, H.; OHYAMA, K. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Molecular Biology*, v. 41, n. 5, p. 679-685, 1999.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; RIESEBERG, L. H. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 12, n. 3, p. 243-273, 1993.

SOLTIS, P. S.; PLUNKETT, G. M.; NOVAK, S. J.; SOLTIS, D. E. Genetic variation in *Tragopogon* species: addition origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). *American Journal of Botany*, v. 82, n. 10, p. 1329-1341, 1995.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; TATE, J. A. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, v. 161, n. 1, p. 173-191, 2004.

SOLTIS, D. E.; BELL, C. D.; KIM, S.; SOLTIS, P. S. Origin and early evolution of angiosperms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1133, n. 1, p. 3-25, 2008.

SOLTIS, D. E.; ALBERT, V. A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C. D.; PATERSON, A. H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; DEPAMPHILIS, C. W.; WALL, P. K.; SOLTIS, P. S. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, v. 96, n. 1, p. 336-348, 2009.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, n. 1, p. 561-588, 2009.

SOLTIS, D. E.; BUGGS, R. J. A.; DOYLE, J. J.; SOLTIS, P. S. What we still don't know about polyploidy. *Taxon*, v. 59, n. 5, p. 1387-1403, 2010.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. 2013. Angiosperm phylogeny: a framework for studies of genome evolution. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 1, p. 1-12.

SOUZA, L. G. R.; CROSA, O.; SPERANZA, P.; GUERRA, M. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany*, v. 109, n. 5, p. 987-999, 2012.

SPELLENBERG, R. Polyploidy in *Dalea formosa* (Fabaceae) on the Chihuahuan desert. *Brittonia*, v. 33, n. 3, p. 309-324, 1981.

SPENCE, J. M.; BLACKMAN, R. L.; TESTA, J. M.; READY, P. D. A 169- base pair tandem repeat DNA marker for subtelomeric heterochromatin and chromosomal rearrangements in aphids of the *Myzus persicae* group. *Chromosome Research*, v. 6, n. 3, p. 167-175, 1998.

SPERANZA, P.; VAIO, M.; MAZZELLA, Z. Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 4, p. 499-503, 2003.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, v. 49, n. 3, p. 451-477, 2000.

STACK, S. Two-dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants. I. The technique. *Stain Technology*, v. 57, n. 5, p. 265-272, 1982.

STÅHLBERG, D. Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology*, v. 23, n. 2, p. 295-328, 2009.

STEBBINS, G. L. Cytological characteristics associated with the different growth habits in the dicotyledons. *American Journal of Botany*, v. 25, n. 3, p. 189-198, 1938.

STEBBINS, G. L. *Variation and evolution in plants*. New York: Columbia University Press, 1950.

STEBBINS, G. L. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, v. 91, n. 861, p. 337-354, 1957.

STEBBINS, G. L. *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Edward Arnold, 1971.

STEBBINS, G. L. Polyploidy and the distribution of the arctic-alpine flora: new evidence and a new approach. *Botanica Helvetica*, v. 94, n. 1, p. 1-13, 1984.

STRAUB, T. Heterochromatin dynamics. *PLoS Biology*, v. 1, n. 1, 2003.

STRAUB, S. C. K.; PARKS, M.; WEITEMIER, K.; FISHBEIN, M.; CRONN, R. C.; LISTON, A. Navigating the tip of the genomic iceberg: Next-generation sequencing for plant systematics. *American Journal of Botany*, v. 99, n. 2, p. 349-364, 2012.

SUDA, J.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TRIBSCH, A.; SCHNEEWEISS, G.M.; PAVEL TRAVNICEK, P.; SCHONSWETTER, P. Complex distribution patterns of di-, tetra-, and hexaploid cytotypes in the European high mountain plant *Senecio carniolicus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, v. 94, n. 8, p. 1391-1401, 2007.

SUMNER, A. T. *Chromosomes – organization and function*. Malden: Blackwell Publishing, 2003.

SWAMINATHAN, K.; VARALA, K.; HUDSON, M. E. Global repeat discovery and estimation of genomic copy number in a large, complex genome using a high-throughput 454 sequence survey. *BMC genomics*, v. 8, n. 1, p. 132, 2007.

SYKOROVA, E.; LIM, K. Y.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R.; FAJKUS, J. The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. *The Plant Journal*, v. 34, n. 3, p. 283-291, 2003.

TANG, H.; BOWERS, J. E.; WANG, X.; MING, R.; ALAM, M.; PATERSON, A. H. Synteny and collinearity in plant genomes. *Science*, v. 320, n. 5875, p. 486-488, 2008.

TANG, X.; DATEMA, E.; GUZMAN, M. O.; DE BOER, J. M.; VAN ECK, H. J.; BACHEM, C. W.; VISSER, R. G.; DE JONG, H. Chromosomal organizations of major repeat families on potato (*Solanum tuberosum*) and further exploring in its sequenced genome. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, n. 6, p. 1307-1319, 2014.

- TATE, J. A.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy in plants. In: GREGORY, T. R. (Org.). The evolution of the genome. San Diego: Elsevier, 2005. cap. 7, p. 371-426.
- TAYALÉ, A.; PARISOD, C. Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 140, n. 2-4, p. 79-96, 2013.
- TAVOLETTI, S.; MARIANI, A.; VERONESI, F. Phenotypic recurrent selection for 2n pollen and 2n egg production in diploid alfalfa. *Euphytica*, v. 57, n. 2, p. 97-102, 1991.
- TEMSCH, E. M.; GREILHUBER, J.; KRISAI, R. Genome size in liverworts. *Preslia*, v. 82, n. 1, p. 63-80, 2010.
- TEK, A. L.; JIANG, J. The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. *Chromosoma*, v. 113, n. 2, p. 77-83, 2004.
- TELES, S.; PEREIRA, J. A.; SANTOS, C. H. B.; MENEZE, R. H.; MALHEIRO, R.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. *Industrial Crops and Products*, v. 37, n. 1, p. 247-252, 2012.
- THOMPSON, J. D.; LUMARET, R. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 7, n. 9, p. 302-307, 1992.
- THOMPSON, J. N.; NUISMER, S. L.; MERG, K. Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 82, n. 4, p. 511-519, 2004.
- THOMPSON, S. L.; WHITTON, J. Patterns of recurrent evolution and geographic parthenogenesis within apomictic polyploid Easter daises (*Townsendia hookeri*). *Molecular Ecology*, v. 15, n. 11, p. 3389-3400, 2006.
- TORRES, E.; LOPEZ, N. Phenotypic plasticity of *Lippia alba* and *Lippia organoides* (Verbenaceae) in response to availability of light. *Acta Biológica Colombiana*, v. 12, n. 1, p. 91-102, 2007.
- TORRES, G. A.; GONG, Z.; IOVENE, M.; HIRSCH, C. D.; BUELL, C. R.; BRYAN, G. J.; NOVÁK, P.; MACAS, J.; JIANG, J. Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 1, n. 2, p. 85-92, 2011.
- TRÁVNÍČEK, P.; ELIÁŠOVÁ, A.; SUDA, J. The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. *Preslia*, v. 82, n. 1, p. 149-163, 2010.

TUSKAN, G. A.; DIFAZIO, S.; JANSSON, S.; et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, v. 313, n. 5793, p. 1596-1604, 2006.

UGARKOVIĆ, Đ.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *The EMBO Journal*, v. 21, n. 22, p. 5955-5959, 2002.

UGARKOVIC, D. Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Reports*, v. 6, n. 11, p. 1035-1039, 2005.

URBANSKA, K. M.; HURKA, H.; LANDOLT, E.; NEUFFER, B.; MUMMENHOFF, K. Hybridization and evolution in *Cardamine* (Brassicaceae) at Urnerboden, Central Switzerland: biosystematic and molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution*, v. 204, n. 3, p. 233-256, 1997.

VALE, A. A. Plasticidade fenotípica em acessos de *Lippia alba* (Verbenaceae). 2010. f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

VAMOSI, J. C.; DICKINSON, T. A. Polyploidy and diversification: a phylogenetic investigation in Rosaceae. *International Journal of Plant Sciences*, v. 167, n. 2, p. 349-358, 2006.

VAN DIJK, P.; HARTOG, M.; VAN DELDEN, W. Single cytotype areas in autopolyploid *Plantago media* L. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 46, n. 4, p. 315-331, 1992.

VAIO, M.; SPERANZA, P.; VALLS, J. F.; GUERRA, M.; MAZZELLA, C. Location of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany*, v. 96, n. 2, p. 191-200, 2005.

VAN DE PEER, Y.; FAWCETT, J. A.; PROOST, S.; STERCK, L.; VANDEPOELE, K. The flowering world: a tale of duplications. *Trends in Plant Science*, v. 14, n. 12, p. 680-688, 2009.

VANNESTE, K.; BAELE, G.; MAERE, S.; VAN DE PEER, Y. Analysis of 41 plant genomes supports a wave of successful genome duplications in association with the Cretaceous – Paleogene boundary. *Genome Research*, v. 24, n. 8, p. 1334-1347, 2014.

VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M.; LUCENO, M. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios*, v. 88, n. 355, p. 219-228, 1996.

VARSHNEY, R. K.; GROSSE, I.; HAHNEL, U.; SIEFKEN, R.; PRASAD, M.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; ALTSCHMIED, L.; GRANER, A. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers shows non-uniform distribution of genes in the barley genome. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 113, n. 2, p. 239, 2006.

VEILLEUX, R. E.; MCHALE, N. A.; LAUER, F. I. 2n gametes in diploid *Solanum*: frequency and types of spindle abnormalities. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 24, n. 3, p. 301-314, 1982.

VELASCO, R.; ZHARKIKH, A.; TROGGIO, M.; CARTWRIGHT, D. A.; CESTARO, A.; et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS One*, v. 2, n. 12, 2007.

VENÂNCIO, D. F. A.; VICCINI, L. F.; LUIZI-PONZO, A.P.; PREZOTO, F. Flower-visiting insects and phenology of *Lippia alba* (Lamiales: Verbenaceae): floral color changes and environmental conditions as cues for pollinators. *Environmental Entomology*, v. 45, n. 3, p. 685-693, 2016.

VESELÝ, P.; BURES, P.; SMARDA, P.; PAVLÍČEK, T. Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology? *Annals of Botany*, v. 109, n. 1, p. 65-75, 2012.

VERSHININ, A. V.; ALKHIMOVA, E. G.; HESLOP-HARRISON, J. S. Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some *Triticeae* species. *Chromosome Research*, v. 4, n. 7, p. 517-525, 1996.

VERSHININ, A. V.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes. *The Plant Cell*, v. 7, n. 11, p. 1823-1833, 1995.

VERMA, S. C.; REES, H. Nuclear DNA and evolution of allotetraploid Brassicae. *Heredity*, v. 33, n. 1, p. 61-68, 1974.

VERONESI, F.; MARIANI, A.; BINGHAM, E. T. Unreduced gametes in diploid *Medicago* and their importance in alfalfa breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 72, n. 1, p. 37-41, 1986.

VICCINI, L. F.; SILVEIRA, R. S.; DO VALE, A. A.; CAMPOS, J. M. S.; REIS, A. C.; OLIVEIRA, M. S.; CAMPOS, V. R.; CARPANEZ, A. G.; GRAZUL, R. M. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Industrial Crops and Products*, v. 59, n. p. 14-19, 2014.

VOGEL, J.; GARVIN, D.; MOCKLER, T. C.; SCHMUTZ, J.; ROKHSAR, D.; BEVAN, M. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, v. 463, n. 7282, p. 763-768, 2010.

VYSKOT, B.; HOBZA, R. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends in Genetics*, v. 20, n. 9, p. 432-438, 2004.

WAGNER, W. H.; WAGNER, F. S. Polyploidy in pteridophytes. In: LEWIS, W. H. (Org.). *Polyploidy: biological relevance*. New York: Plenum Press, 1980. cap. 11, p. 199-214.

- WAN, T.; ZHANG, X.; GREGAN, J.; ZHANG, Y.; GUO, P.; GUO, Y. A dynamic evolution of chromosome in subgenus *Potamogeton* revealed by physical mapping of rDNA loci detection. *Plant Systematics and Evolution*, v. 298, n. 6, p. 1195-1210, 2012.
- WANG, J.; TIAN, L.; LEE, H-S.; WEI, N. E.; JIANG, H.; WATSON, B.; MADLUNG, A.; OSBORN, T. C.; DOERGE, R. W.; COMAI, L.; CHEN, Z. J. Genome wide non additive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics*, v. 172, n. 1, p. 507-517, 2006.
- WANG, C. T.; HO, C. H.; HSEU, M. J.; CHEN, C. M. The subtelomeric region of the *Arabidopsis thaliana* chromosome IIIIR contains potential genes and duplicated fragments from other chromosomes. *Plant Molecular Biology*, v. 74, n. 1-2, p. 155-166, 2010.
- WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KOSUGE, K. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *Journal of Plant Research*, v. 112, n. 2, p. 145-161, 1999.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; SCHNEEWEISS, G. M.; STUESSY, T. F.; MABUCHI, Z.; PARK, J. M.; JANG, C. G.; SUN B. Y. Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). *New Phytologist*, v. 174, n. 3, p. 669-682, 2007.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TREMETSBERGER, K.; SCHNEEWEISS, G. M.; PARKER, J. S.; STUESSY, T. F. Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. *Annals of Botany*, v. 101, n. 7, p. 909-918, 2008.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T. F.; VILLASENOR, J. L. Chromosome numbers, karyotypes, and evolution in *Melampodium* (Asteraceae). *International journal of plant sciences*, v. 170, n. 9, p. 1168-1182, 2009.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; SCHNEEWEISS, G. M. Karyotype diversity and evolutionary trends in angiosperms. In: LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. (Orgs.). *Plant genome diversity volume 2: Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*. Vienna: Springer, 2013. cap. 13, p. 209-230.
- WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Evolution*, v. 42, n. 1, p. 225-249, 2000.
- WERNER, J. E.; PELOQUIN, S. J. Occurrence and mechanisms of 2n egg formation in 2x potato. *Genome*, v. 34, n. 6, p. 975-982, 1991.

WETTSTEIN, F. Die erscheinung der heteroploidie, besonders im Pflanzenreich. *Ergebnisse der Biologie*, n. 2, p. 311-356, 1927.

WICKER, T.; TAUDIEN, S.; HOUBEN, A.; KELLER, B.; GRANER, A.; PLATZER, M.; STEIN, N. A wholegenome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. *The Plant Journal*, v. 59, n. 5, p. 712-722, 2009.

WICKER, T.; SCHLAGENHAUF, E.; GRANER, A.; CLOSE, T. J.; KELLER, B.; STEIN, N. 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. *BMC Genomics*, v. 7, n. 1, p. 275, 2006.

WILKES, T. M.; FRANCKI, M. G.; LANGRIDGE, P.; KARP, A.; JONES, R. N.; FORSTER, J. W. Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome Research*, v. 3, n. 8, p. 466-472, 1995.

WOOD, T. E.; TAKEBAYASHI, N.; BARKER, M. S.; MAYROSE, I.; GREENSPOON, P. B.; RIESEBERG, L. H. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the national Academy of sciences*, v. 106, n. 33, p. 13875-13879, 2009.

WU, F.; TANKSLEY, S. D. Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC genomics*, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2010.

XIONG, L. Z.; XU, C. G.; MAROOF, M. A. S.; ZHANG, Q. F. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 261, n. 3, p. 439-446, 1999.

XIONG, Z.; GAETA, R. T.; PIRES, J. C. Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 19, p. 7908-7913, 2011.

YAN, G.; FERGUSON, A. R.; MCNEILAGE, M. A.; MURRAY, B. G. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. *Euphytica*, v. 96, n. 2, p. 267-272, 1997.

YANG, L.; KOO, D-H.; LI, Y.; ZHANG, X.; LUAN, F.; HAVEY, M. J.; JIANG, J.; WENG, Y. Chromosome rearrangements during domestication of cucumber as revealed by high-density genetic mapping and draft genome assembly. *The Plant journal*, v. 71, n. 6, p. 895-906, 2012.

YU, Q.; HOU, S.; FELTUS, F. A.; JONES, M. R.; MURRAY, J. E.; VEATCH, O.; LEMKE, C.; SAW, J. H.; MOORE, R. C.; THIMMAPURAM, J.; LIU, L.; MOORE, P. H.; ALAM, M.; JIANG, J.; PATERSON, A. H.; MING, R. Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. *The Plant Journal*, v. 53, n. 1, p. 124-132, 2008.

ZELININ, A. V.; ZOSHCHUK, N. V. History of contemporary chromosome analysis: the fundamental contribution of Caspersson's Works. *Russian Journal of Developmental Biology*, v. 31, n. 3, p. 124-130, 2000.

ZHAO, X.; SI, Y.; HANSON, R. E.; CRANE, C. F.; PRICE, H. J.; STELLY, D. M.; WENDEL, J. F.; PATERSON, A. W. Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton. *Genome Research*, v. 8, n. 5, p. 479-492, 1998.

ZHAO, M.; DU, J.; LIN, F.; TONG, C.; YU, J.; HUANG, S.; WANG, X.; LIU, S.; MA, J. Shifts in the evolutionary rate and intensity of purifying selection between two Brassica genomes revealed by analyses of orthologous transposons and relics of a whole genome triplication. *The Plant Journal*, v. 76, n. 2, p. 211-22, 2013.

ZHONG, C. X.; MARSHALL, J. B.; TOPP, C.; MROCZEK, R.; KATO, A.; NAGAKI, K.; BIRCHLER, J. A.; JIANG, J. M.; DAWE, R. K. Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *The Plant Cell*, v. 14, n. 11, p. 2825-2836, 2002.

ZHONG, X. B.; FRANZ, P. F.; WENNEKES-VAN EDEN, J.; KAMMEN, A. V.; ZABEL, P. FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato. *The Plant Journal*, v. 13, n. 4, p. 507-517, 1998.

ZIELINSKI, M.; SCHEID, O.M. 2012. Meiosis in polyploid plants. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS D. E. (Orgs.). *Polyploidy and genome evolution*. New York: Springer, 2012. Cap. 3, p. 33-55.

APÊNDICE A

Tabela: Nomenclatura dos acessos de *Lippia alba* estudados no presente trabalho.

Acessos	Acessos
BGEN-01	BGEN-56
BGEN-02	BGEN-58
BGEN-03	BGEN-59
BGEN-05	BGEN-60
BGEN-06	BGEN-61
BGEN-09	BGEN-62
BGEN-10	BGEN-64
BGEN-11	BGEN-65
BGEN-12	BGEN-66
BGEN-13	BGEN-67
BGEN-14	BGEN-68
BGEN-15	BGEN-70
BGEN-16	BGEN-71
BGEN-17	BGEN-72
BGEN-18	BGEN-73
BGEN-19	BGEN-74
BGEN-20	BGEN-75
BGEN-21	BGEN-77
BGEN-23	BGEN-78
BGEN-24	BGEN-80
BGEN-25	BGEN-81
BGEN-27	BGEN-82
BGEN-28	BGEN-84
BGEN-29	BGEN-86
BGEN-31	BGEN-87
BGEN-35	BGEN-88
BGEN-37	BGEN-89
BGEN-40	BGEN-90
BGEN-41	BGEN-92
BGEN-42	BGEN-96
BGEN-44	BGEN-98
BGEN-45	BGEN-100
BGEN-46	BGEN- 101
BGEN-47	BGEN-107
BGEN-48	BGEN-109
BGEN-49	BGEN-111
BGEN-53	BGEN-112

APÊNDICE B

Artigo publicado: 2016

“High frequency of cytomixis observed at zygotene in tetraploid Lippia alba”

Autores: Aryane Campos Reis
Saulo Marçal de Sousa
Lyderson Facio Viccini

Plant Systematic and Evolution, v. 302, n. 1, p. 121-127.