

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

Sirlei Aparecida Julião

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA EM ACESSOS
NATURAIS E SINTÉTICOS DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. Br.
(VERBENACEAE)**

TESE

JUIZ DE FORA
2017

SIRLEI APARECIDA JULIÃO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA EM ACESSOS
NATURAIS E SINTÉTICOS DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. Br.
(VERBENACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora
2017

Aos professores e amigos com os quais
convivi durante minha jornada de
estudante,
OFEREÇO.

À minha família, fonte da minha
motivação e determinação,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Genética e Biotecnologia, pela oportunidade de realização do curso e pela concessão da bolsa. Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao professor Lyderson Facio Viccini, pela orientação, pela confiança e pelos ensinamentos.

Aos professores Saulo, José Marcelo, Marcelo, Carlos e Michele pelos conselhos e pela disponibilidade em ajudar.

Ao professor Paulo por ter me concedido livre acesso ao Laboratório de Fisiologia Vegetal e pela disponibilidade em me ajudar e discutir os experimentos.

À Dra. Ana Luisa e Dr. Marco Antônio por disponibilizar o laboratório para elaboração de parte do trabalho.

Ao professor Richard pela ajuda com o experimento de análise do óleo essencial.

À Juliana, primeiramente pela amizade, pela gentileza, pelo carinho, pelo companheirismo durante os 4 anos de doutorado. Por ter me ensinado todo o capricho para trabalhar com molecular, pelo tempo dedicado a me ajudar a planejar e executar os experimentos.

À Aryane, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelos ensinamentos e ajuda com a citogenética.

Ao Elyabe, pela amizade, pela gentileza e por toda ajuda no cuidado com as plantas e na execução dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia e do Laboratório de Fisiologia Vegetal, pela amizade, pelos bons conselhos, pela ajuda com os trabalhos técnicos, pelos momentos de descontração, pelos momentos de conversas sobre os resultados dos experimentos e sobre as incertezas em relação a emprego.

Aos meus pais, irmãos e meu marido, razão desta conquista, agradeço pelo amor, apoio e incentivo, pela torcida e pelas orações. Especialmente à minha irmã Maria das Graças pelo suporte e encorajamento na busca pelos meus ideais.

À Deus pelo dom da vida, por ter me concedido a capacidade de executar este trabalho e por ter me dado forças para vencer os obstáculos.

RESUMO

Lippia alba é uma espécie medicinal com ampla diversidade fenotípica, incluindo a composição do óleo essencial. A variação genética é provavelmente a principal causa dessa variação. A espécie foi descrita como um complexo poliploide com cinco números cromossômicos ($2n=30, 38, 45, 60$ e 90). Devido à importância econômica e à variação genética natural, essa espécie representa um excelente modelo em estudos sobre estabilidade genômica. Este trabalho teve como objetivo investigar a estabilidade genômica de 22 acessos naturais cultivados *in vitro* durante sete anos e em acessos poliploides sintéticos obtidos a partir da duplicação cromossômica de um acesso diploide natural usando colchicina. Para analisar a estabilidade do genoma de plantas cultivadas a longo prazo, foram analisadas quatro plantas (três mantidas *in vitro* e uma no campo) de 22 acessos. O tamanho do genoma foi verificado por citometria de fluxo e oito marcadores ISSR foram utilizados para verificar a estabilidade em nível de sequência de DNA. Para avaliar a estabilidade genômica após a poliploidização, onze plantas poliploides sintéticas, sendo 5 tetraploides (4X) e 6 mixoploides (2X / 4X) foram comparadas com a planta matriz diploide. As comparações foram baseadas no conteúdo de DNA, contagem cromossômica, marcadores moleculares ISSR e SSR e no perfil químico do óleo essencial. A comparação entre as plantas mantidas *in vitro* e as respectivas plantas mantidas no campo mostrou que 13 dos 22 acessos sofreram uma pequena redução no tamanho do genoma. Os marcadores ISSR detectaram polimorfismos na sequência de DNA variando de 1,61 a 33,87%. Somente três acessos não apresentaram bandas polimórficas. O número de bandas polimórficas entre os outros 19 acessos variou de um a 21. A análise da ploidia das plantas poliploides sintéticas realizada em folhas e raízes confirmou a estabilidade das plantas tetraploides. As plantas mixoploides apresentaram um único pico G1 correspondente a plantas triploides. A análise cromossômica revelou 60 cromossomos com 12 sítios de DNAr 45S nas plantas tetraploides e 9 sítios de DNAr 45S nos 45 cromossomos observados nas plantas triploides. Os marcadores ISSR mostraram polimorfismo entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas. A taxa de polimorfismo variou de 1,81 a 5,45% nas plantas tetraploides e de 43,63 a 56,36% nas plantas triploides. Alterações no tamanho dos alelos de microssatélites também foram detectadas. A planta matriz diploide apresentou dez alelos, três dos quais foram compartilhados com as plantas triploides e sete com as plantas tetraploides. Todas as plantas triploides apresentaram 13 alelos, sendo dez deles correspondentes a alelos novos. O número de alelos detectados nas plantas tetraploides variou de oito a 11 e o número de alelos novos como consequência da poliploidização variou de dois a quatro. O componente majoritário detectado no óleo essencial da planta matriz diploide e das plantas tetraploides foi o citral e nas plantas triploides foi o linalol. A instabilidade genômica detectada em *L. alba* após sete anos de cultura *in vitro* pode ser devido à consequência da instabilidade do genoma natural combinada com a cultura *in vitro* a longo prazo. Os efeitos da poliploidização que resultam em reorganização genômica e alterações fisiológicas podem explicar a variação observada nas plantas poliploides sintéticas.

Palavras-chave: variação somaclonal. poliploides sintéticos. estabilidade genômica. citometria de fluxo. marcadores moleculares.

ABSTRACT

Lippia alba is a medicinal species with a broad phenotypic diversity, including the essential oil composition. Genetic variation is probably the main cause of this variation. The species is a polyploid complex with five chromosome numbers ($2n = 30, 38, 45, 60$ and 90). Due to the economic importance and the natural genetic variation, this species represents an excellent model in studies on the genomic stability. This work aimed to investigate the genomic stability of 22 natural accessions grown in vitro for 7 years and in synthetic polyploid accessions obtained from the chromosome duplication of a natural diploid access using colchicine. To analyze the genome stability of long-term cultivated plants, four replicates (three maintained in vitro and one in the field) of 22 accessions were analyzed. The size of the genome was verified by flow cytometry and eight ISSR markers checked for stability in the DNA sequence. To evaluate the effect of polyploidization, eleven synthetic polyploid plants composed of 5 tetraploids (4X) and 6 mixoploids (2X/4X) were compared with the diploid parent plant. The comparisons were based on DNA content, chromosomal count, molecular markers ISSR and SSR, and chemical profile of the essential oil. The comparison between the plants maintained in vitro and the respective plants maintained in the field showed that 13 of the 22 accessions suffered a small reduction in the size of the genome. ISSR markers detected polymorphisms in the DNA sequence ranging from 1.61 to 33.87%. Only three accessions did not present polymorphic bands. The number of polymorphic bands among the other 19 accesses ranged from 1 to 21. Analysis of the ploidy of the synthetic polyploid plants carried out on leaves and roots confirmed the stability of the tetraploid plants. The mixoploid plants presented a single G1 peak corresponding to triploid plants. The chromosome analysis showed 60 chromosomes with twelve 45S rDNA sites in the synthetic tetraploids and nine 45S rDNA sites over the 45 chromosomes observed in the synthetic triploid plants. ISSR markers showed polymorphism between the diploid parent plant and synthetic polyploid plants. The polymorphism rate varied from 1.81 to 5.45% in the tetraploid plants and from 43.63 to 56.36% in the triploid plants. Changes in the size of the microsatellite alleles were also detected. The diploid parental plant presented 10 alleles, of which 3 were shared with the triploid plants and 7 with the tetraploid plants. All triploid plants had 13 alleles, 10 of which correspond to new alleles. The number of alleles detected in tetraploid plants ranged from 8 to 11 and the number of new alleles as a consequence of polyploidization ranged from 2 to 4. The major component detected in the essential oil of the parental diploid plant and the tetraploid plants was the citral and the triploid plants was the linalool. The genetic instability detected in *L. alba* after seven years of in vitro culture may be due to the consequence of natural genome instability combined with long-term in vitro culture. The effects of polyploidization that result in genomic reorganization and physiological changes may explain the variation observed in synthetic polyploid plants.

Keywords: somaclonal variation. synthetic polyploids. genomic stability. flow cytometry. molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conteúdo de DNA nuclear de 22 acessos de *L. alba* mantidos em condições de campo e os respectivos clones mantidos *in vitro* durante sete anos. Acessos 1-7: diploide ($2n=30$), 8-14: triploide ($2n=45$), 15-20: tetraploide ($2n=60$), 21: aneuploide ($2n=38$), 22: hexaploide ($2n=90$). As barras com asterisco indicam diferença estatística entre a planta controle (campo) e os clones *in vitro* para cada acesso de acordo com o teste t ($p < 0,05$).....42

Figura 2. Perfil de bandas representativo do marcador ISSR em vinte e dois acessos de *L. alba* mantidos *in vitro* e no campo. O padrão de amplificação de DNA foi obtido com o *primer* de ISSR UBC830. Para cada acesso, foram analisadas quatro plantas. Da esquerda para a direita: planta controle (mantida no campo) seguida de três repetições de clones *in vitro*. Utilizou-se um marcador de 100 pb como referência. A seta contínua indica o surgimento de uma nova banda em clones *in vitro*. Setas pontilhadas indicam ausência de banda nos clones *in vitro*.....45

Figura 3. Esquema ilustrativo das análises de ploidia das plantas poliploides sintéticas obtidas após tratamento com colchicina de um acesso diploide de *L. alba*.....62

Figura 4. Histogramas representativos de núcleos de folhas e raízes da planta matriz diploide e das plantas poliploides sintéticas. O eixo x representa a intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos e o eixo y o número de núcleos analisados. A-B: planta matriz diploide, C-D: planta triploide sintética, E-F: planta tetraploide sintética.....63

Figura 5. Métáfases representativas da planta matriz diploide ($2n=30$) (A), planta sintética triploide ($2n=45$) (B), planta sintética tetraploide ($2n=60$) (C). Barra = 5 μm64

Figura 6. Métáfases representativas da hibridização fluorescente *in situ* com a sonda 45S. (A) planta matriz diploide ($2n=30$), (B) planta sintética triploide ($2n=45$) (C)

planta sintética tetraploide (2n=60). Barra = 5µm.....64

Figura 7. Padrão de bandas obtido com *primers* de ISSR em *L. alba*. Os números de 1 a 6 correspondem a plantas triploides sintéticas, o número 7 corresponde a planta matriz diploide, os números de 8 a 12 correspondem a plantas tetraploides sintéticas. M: marcador de peso molelular (100 pb).....67

Figura 8. Eletroferogramas representativos dos locos p473 e p484. Loco p473 – (A) planta matriz diploide: dois alelos (105 e 170 pb), (B) planta triploide sintética: um alelo (105 pb), (C) planta tetraploide sintética: dois alelos (105 e 170 pb). Loco p848 – (D) planta matriz diploide: um alelo (174 pb), (E) planta triploide sintética: um alelo (172 pb), (F) planta tetraploide sintética: um alelo (176 pb), (G) planta tetraploide sintética: um alelo (174 pb). O eixo y indica a intensidade de fluorescência e o eixo x indica o tamanho dos alelos em pares de bases.....71

Figura 9. Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes Jaccard de 12 acessos de *L. alba*. 1-6 plantas triploides sintéticas, 7 plantas matriz diploide, 8-12 plantas tetraploides sintéticas. (A) Dendrograma obtido a partir dos dados de 11 *primers* de ISSR. (B) Dendrograma obtido a partir dos dados de 7 *primers* de SSR.....74

Figura 10. Gráfico representativo do percentual de citral e linalol detectados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa na planta matriz diploide (7), nas plantas triploides sintéticas (1-6) e nas plantas tetraploides sintéticas (8-12).....75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. *Primers* de ISSR e SSR utilizados para comparar plantas de *L. alba* mantidas *in vitro* (7 anos) com plantas mantidas no campo, incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_a), número total de bandas (N_b), variação no número de bandas (V_b), tamanho das bandas em pares de base (T_{pb}).....43
- Tabela 2. Análise do padrão de bandas gerado por oito *primers* de ISSR utilizados para comparar plantas de *L. alba* mantidas *in vitro* (7 anos) com plantas mantidas no campo.....46
- Tabela 3. *Primers* de ISSR utilizados para comparar a planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas, incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_a), número total de bandas (N_b), variação no número de bandas (V_b), tamanho das bandas em pares de base (T_{pb}).....65
- Tabela 4. Padrão de bandas comparativo em *L. alba*, entre a planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas obtido com onze *primers* de ISSR.....68
- Tabela 5. *Primers* de SSR utilizados para comparar a planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas, incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_a), fluorocromo usado na marcação do *primer* (F), número de alelos detectados (N_a), tamanho dos alelos em pares de base (T_{pb}).....70
- Tabela 6. Distribuição alélica de sete locos de microssatélites entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas. Plantas 1 a 6 (triploides sintéticas), planta 7 (diploide matriz), plantas 8 a 12 (tetraploides sintéticas).....72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism” Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado
AIB	Ácido Indolbutírico
BAP	Benzilaminopurina
CESJ	Herbário Leopoldo Krieger
CTAB	“Cetyl trimethylammonium bromide” – Brometo trimetilamônio de cetilo
DNA	“Deoxyribonucleic acid” – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	“Deoxynucleotide triphosphates” – Desoxinucleotidos Trifosfatos
FISH	“Fluorescence in situ Hybridization” – Hibridização Fluorescente in situ
ISSR	“Inter Simple Sequence Repeats” – Repetição entre Sequências Simples
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Murashige e Skoog
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase
pg	picograma
RAPD	“Random Amplification of Polymorphic DNA” – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
SRAP	“Sequence Related Amplified Polymorphism” – Polimorfismo Amplificado de Sequências Relacionadas
SSR	“Simple Sequence Repeats” – Sequências Simples Repetidas
Tris-HCl	N-tris[hidroximetil]aminoetano – ácido clorídrico
UPGMA	“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” – Método de agrupamento não ponderada com Média Aritmética
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 <i>Lippia alba</i>	15
2.2 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA.....	16
2.3 TÉCNICAS DE ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÔMICA	19
2.3.1 CITOMETRIA DE FLUXO	20
2.3.2 TÉCNICAS DE ESTUDO CROMOSSÔMICO.....	21
2.3.3 MARCADORES MOLECULARES.....	22
2.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> A LONGO PRAZO E ESTABILIDADE GENÔMICA	25
2.5 POLIPLOIDIA E ESTABILIDADE GENÔMICA EM AUTOPOLIPLOIDES SINTÉTICOS	28
2.5.1 POLIPLOIDIA.....	28
2.5.2 ESTABILIDADE GENÔMICA E AUTOPOLIPLOIDIA SINTÉTICA ..	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA DO COMPLEXO POLIPLOIDE <i>Lippia alba</i> CULTIVADO <i>IN VITRO</i> A LONGO PRAZO	35
4.1 INTRODUÇÃO	35
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.3 MATERIAL VEGETAL	37
4.4 ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÔMICA	37
4.5 CITOMETRIA DE FLUXO.....	38
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA	38
4.7 MARCADORES ISSR	39
4.8 MARCADORES SSR	39
4.9 ANÁLISE DOS DADOS	40
5 RESULTADOS	41
5.1 CRESCIMENTO VEGETATIVO	41
5.2 TAMANHO DO GENOMA	41
5.3 ANÁLISE MOLECULAR	42

6 DISCUSSÃO	47
7 CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA EM ACESSOS AUTOPOLIPLOIDES SINTÉTICOS DE <i>Lippia alba</i>	53
7.1 INTRODUÇÃO	53
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
7.3 MATERIAL VEGETAL	56
7.4 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA	56
7.5 PREPARAÇÃO CROMOSSÔMICA	57
7.6 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	57
7.6 MARCADORES MOLECULARES.....	58
7.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA	58
7.6.2 MARCADORES ISSR	58
7.6.3 MARCADORES SSR	59
7.6.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	60
7.7 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL	60
8 RESULTADOS	62
8.1 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA	62
8.2 NÚMERO CROMOSSÔMICO E HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN</i> <i>SITU</i> (FISH)	64
8.3 PERFIL MOLECULAR POR MARCADORES ISSR.....	65
8.4 PERFIL MOLECULAR POR MARCADORES SSR	69
8.5 SIMILARIDADE GENÉTICA	73
8.6 PERFIL DO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	75
9 DISCUSSÃO	76
9.1 ESTABILIDADE DO NÍVEL DE PLOIDIA	76
9.2 REORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	79
9.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL	82
10 CONCLUSÃO.....	85
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
12 ANEXO A	102

1 INTRODUÇÃO

Lippia alba é uma espécie que desperta o interesse da comunidade científica em variedade de áreas de pesquisa. A espécie é uma planta medicinal com diversas propriedades terapêuticas, é produtora de óleos essenciais contendo uma ampla variedade de compostos químicos. Além da diversidade química, a espécie também apresenta plasticidade fenotípica e genotípica. A Universidade Federal de Juiz de Fora possui um banco de germoplasma conservado no campo contendo mais de 100 acessos de *L. alba* coletados em diferentes regiões do Brasil. Estudos genéticos desse banco revelaram que *L. alba* é um complexo poliploide com cinco números cromossômicos ($2n = 30, 38, 45, 60, 90$), possivelmente de origem autopoliploide.

Alguns acessos do banco conservado no campo também são mantidos *in vitro*. Além dos acessos de ocorrência natural, o banco conta também com plantas poliploides sintéticas provenientes do tratamento de um acesso diploide com colchicina. A conservação de plantas *in vitro* tem a vantagem de demandar pouco espaço para manter as plantas. Mas por outro lado, durante a conservação *in vitro* podem ocorrer instabilidades genômicas. O genoma de plantas autopoliploides sintéticas pode ser instável e passar por diversas reorganizações genômicas para a estabilização e adaptação da planta à nova ploidia. Uma planta autoploiploide sintética pode apresentar inúmeras modificações genômicas, fenotípicas e fisiológicas, quando comparada com a planta diploide que lhe deu origem.

A estabilidade genômica pode ser verificada utilizando-se diversas técnicas que possibilitam a análise do genoma em seus mais diferentes níveis de organização, desde o núcleo inteiro, cromossomos individualizados até a sequência de DNA. A citometria de fluxo é uma técnica rápida e eficiente para analisar o conteúdo de DNA, possibilitando identificar mudanças de ploidia e no tamanho do genoma. Alterações cromossômicas numéricas e morfológicas necessitam de técnicas citogenéticas para serem identificadas. Os marcadores moleculares, como o SSR e o ISSR, são técnicas mais refinadas e identificam mudanças na sequência de DNA.

Estudos de estabilidade genômica são de extrema relevância para o entendimento do comportamento genômico de uma espécie. Condições de estresse como cultivo *in vitro* e a poliploidização induzida podem influenciar a estabilidade genômica. Diante da diversidade de acessos e das condições de manutenção, *L. alba* mostra-se como excelente modelo para estudar a estabilidade genômica. Os acessos de diferentes ploidias cultivados *in vitro* oferecem a oportunidade de avaliar a estabilidade genômica da espécie sob tal condição de estresse, podendo-se analisar a estabilidade genômica de diferentes genótipos. Sob outra perspectiva, as plantas poliploides sintéticas possibilitam o estudo dos efeitos da poliploidização induzida sob diferentes aspectos como estabilidade do nível de ploidia, reorganização genômica e consequências fenotípicas. Plantas autopoliploides sintéticas representam materiais excelentes para estudos genômicos- e fenotípicos comparativos na tentativa de compreender os efeitos da duplicação do genoma.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Lippia alba*

Lippia alba é uma das espécies de plantas medicinais da família Verbenaceae, nativa da América do Sul e América Central (HENNEBELLE et al., 2008). No Brasil, a espécie é encontrada em todo o país e é popularmente conhecida como erva-cidreira (TAVARES et al., 2004; CHIES et al., 2013). A planta apresenta inúmeras propriedades medicinais, sendo muito usada na medicina popular e esse é um dos motivos que torna essa espécie a mais estudada do gênero *Lippia* (HENNEBELLE et al., 2008).

As propriedades medicinais dessa espécie são conhecidas há muito tempo. Os extratos da planta são usados na medicina popular principalmente contra problemas digestivos, respiratórios, cardíacos e como sedativo (HENNEBELLE et al., 2008). Além do seu amplo uso na medicina popular, esta espécie tem sido considerada promissora para uso em indústrias farmacêuticas e cosméticas. As suas propriedades antifúngica e inseticida também possibilita seu uso na indústria química agrícola (BLANK et al., 2015). Na piscicultura o óleo essencial de *L. alba* é indicado para o transporte de tilápia-do-Nilo, pois seu efeito sedativo reduz os fatores de estresse (HOHLENWERGER et al., 2017).

O uso diverso de *L. alba* está relacionado com a variabilidade da composição química do seu óleo essencial. O óleo essencial é produzido principalmente pelas folhas e as variações nos constituintes do óleo essencial permitiram a divisão desta espécie em quimiotipos, baseada nos componentes químicos majoritários do óleo essencial (HENNEBELLE et al., 2008; TAVARES et al., 2011). Viccini et al. (2014) discutiram a possível associação entre o conteúdo de citral e linalol com o tamanho do genoma em *L. alba*. Citral, por exemplo, foi o principal componente de praticamente todos os acessos diploides e tetraploides. Todos os acessos que apresentaram linalol como componente principal são triploides, sugerindo uma possível relação entre a produção de linalol e o conteúdo de DNA.

O cultivo *in vitro* de três quimiotipos de *L. alba*, linalol, citral, e carvona, sob diferentes fontes de luz e concentração atmosférica de CO₂, resultou em diferenças na taxa de crescimento das plantas entre os quimiotipos, mudanças no padrão qualitativo dos óleos essenciais e alterações na expressão de genes relacionados à via biossintética de monoterpenos, sesquiterpenos e seus intermediários (BATISTA et al., 2016; 2017).

Várias técnicas têm sido utilizadas para identificar características genéticas que contribuem para a diferenciação genética em *L. alba*. A diversidade genética entre acessos dessa espécie já foi caracterizada por meio de análises cromossômicas, estudos de comportamento reprodutivo, análises com marcadores moleculares e conteúdo de DNA (MANICA-CATTANI et al., 2009; PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014; LOPES, 2015; CAMPOS, 2017; REIS, 2017). Em análise com os marcadores RAPD e ISSR Manica-Cattani et al. (2009) observaram 84,1% de bandas polimórficas entre acessos de *L. alba* oriundos da região sul do Brasil. Reis et al. (2014) caracterizaram acessos de diferentes regiões do Brasil usando citogenética clássica e molecular e citometria de fluxo. Os acessos apresentaram grande variação no tamanho do genoma com o conteúdo de DNA 1C variando de 1,17 a 3,45 pg. Diferentes citótipos foram identificados na análise citogenética e cinco números cromossômicos distintos foram observados ($2n = 30, 38, 45, 60, 90$). Esses resultados caracterizam a existência de um complexo poliploide na espécie *L. alba* (REIS et al., 2014).

2.2 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

A conservação do germoplasma de uma espécie garante a proteção dos recursos genéticos da espécie contra eventuais perdas devido às atividades antropogênicas, fatores bióticos e abióticos (CRUZ-CRUZ et al., 2013). No caso de espécies nativas, que carecem de estudos científicos básicos, a conservação do germoplasma facilita o estudo da espécie conservada.

O Banco de Germoplasma de *L. alba* mantido na Universidade Federal de Juiz de Fora é composto por uma ampla coleção de acessos representativos da

diversidade da espécie. São mais de 100 acessos de diferentes ploidias coletados em diferentes regiões do Brasil. A conservação desses acessos tem possibilitado muitos estudos na espécie como a descoberta de diferentes citótipos na espécie (PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014), a associação entre o nível de ploidia e o composto majoritário do óleo essencial (VICCINI et al., 2014), análise da diversidade genética (LOPES, 2015), indução de poliploidia sintética (RIBEIRO, 2015), estudo da biologia reprodutiva (CAMPOS, 2017), mapeamento de DNA satélite e comportamento meiótico (REIS, 2017). Esses resultados em conjunto têm contribuído para o entendimento do funcionamento e evolução do complexo poliploide *L. alba*. Além dos trabalhos citados acima, o presente trabalho descreve um panorama sobre a estabilidade genômica na espécie analisada em acessos naturais e sintéticos do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As duas estratégias básicas de conservação de germoplasma são a conservação *in situ* e *ex situ*. Na conservação *in situ* o germoplasma é preservado no seu hábitat natural, em reservas com ambiente ao qual a espécie está adaptada. A conservação *ex situ* do germoplasma consiste na manutenção de espécies em locais diferentes daqueles aos quais estão adaptadas (KASSO e BALAKRISHNAN, 2013). A conservação *ex situ* pode ser realizada por meio de bancos de sementes, bancos de campo e bancos *in vitro* (BOROKINI, 2013).

Os bancos em condições de campo e bancos *in vitro* são ideais para conservar espécies de propagação vegetativa ou que produzem sementes recalcitrantes (MATSUMOTO et al., 2010; BOROKINI, 2013). Os bancos de germoplasma de *L. alba* são voltados para a conservação das plantas no campo, como é o caso do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Juiz de Fora, Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (CAMÊLO, 2010) e do Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (ROCHA, 2014). Porém, materiais mantidos em campo têm a desvantagem de ser vulneráveis a fatores bióticos e abióticos, o que pode comprometer significativamente a integridade da coleção (MATSUMOTO et al., 2010; SILVA et al., 2016).

A conservação *in vitro* tem a vantagem de demandar pouco espaço para armazenar a coleção de germoplasma e ainda possibilita a rápida multiplicação do material conservado quando necessário. Além da conservação de recursos

genéticos de sementes recalcitrantes e espécies propagadas de forma vegetativa, os bancos *in vitro* também possibilitam a conservação de espécies raras e ameaçadas de extinção e produtos de biotecnologia, tais como genótipos elite e material geneticamente modificado (ENGELMANN, 2011; KULUS e ZALEWSKA, 2014).

Existem dois procedimentos que possibilitam a conservação de plantas *in vitro*. O crescimento mínimo, cujo objetivo é reduzir o crescimento e aumentar os intervalos entre os subcultivos, para armazenamento a curto e médio prazo. O crescimento mínimo é alcançado pela redução da temperatura, combinada ou não, com modificações na intensidade da luz, modificações dos meios de cultura e a adição de agentes osmóticos tais como sacarose, manitol e/ou sorbitol (CRUZ-CRUZ et al., 2013; KULUS e ZALEWSKA, 2014). Para armazenamento a longo prazo, os procedimentos de criopreservação são mais indicados pois promovem a supressão completa do metabolismo da planta por armazenamento em temperaturas ultra-baixas (ENGELMANN, 2011). Dependendo da técnica, do tipo de material e da espécie utilizada, as amostras podem ser conservadas desde meses a anos sem subcultivos (CRUZ-CRUZ et al., 2013).

Protocolos de conservação *in vitro* por meio de crescimento mínimo são rotineiramente testados para a conservação de numerosas espécies. Em *L. alba* a combinação de meio MS (concentração dos sais reduzida pela metade) com 2% de sacarose, 3% de manitol, 2 mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio e temperatura a 18°C permitiu a conservação *in vitro* por um período de 90 dias sem subcultivo (SANTOS, 2010). Os quimiotipos de *L. alba* carvona, citral e linalol mostraram diferenças em relação ao tempo de conservação *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,7 g L⁻¹ de ágar. A imersão dos explantes em óleo mineral, por meio da adição de 3 mL de óleo nos tubos de ensaio, combinada com temperatura a 18°C possibilitou a conservação *in vitro* do quimiotipo carvona por 270 dias e dos quimiotipos citral e linalol por 180 dias (PEIXOTO et al., 2017).

A conservação de plantas *in vitro* pode ser realizada mesmo sem adotar condições que proporcionem o crescimento mínimo do material vegetal. Por exemplo, amostras de germoplasma de *Bacopa monnieri* foram mantidas *in vitro* por um período de 5 anos com subcultivos a cada 2 meses em meio MS, 3% de sacarose, 0,4% de agente solidificante, fotoperíodo 16:8h com intensidade luminosa

de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (LARGIA et al., 2015). Da mesma forma, Smýkal et al. (2007), relataram a conservação de *Pisum sativum* sob condições de cultura para crescimento contínuo das amostras por período de 24 anos.

Os acessos de *L. alba* do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Juiz de Fora conservados *in vitro* são mantidos em meio MS, 3% de sacarose, 0,7% de ágar, fotoperíodo 16:8h com intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Essas condições de cultivo *in vitro* permitem um intervalo de 60 dias entre os subcultivos.

A técnica de conservação *in vitro* apresenta vantagens como permitir o estabelecimento de extensas coleções de germoplasma usando pequenos espaços, apresenta um risco reduzido de perdas por desastres climáticos, ataques de pragas e doenças. Contudo, é importante monitorar a estabilidade genética de plantas conservadas *in vitro* uma vez que as técnicas de cultura *in vitro* podem induzir instabilidade genômica nas amostras, processo conhecido como variação somaclonal (MATSUMOTO et al., 2010; CRUZ-CRUZ et al., 2013).

2.3 TÉCNICAS DE ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÔMICA

Alterações na estabilidade genômica em plantas podem ocorrer a nível de ploidia e conteúdo de DNA, a nível cromossômico com alterações numéricas e estruturais e a nível de sequência de DNA. As técnicas mais utilizadas para análises de estabilidade são a citometria de fluxo, técnicas citogenéticas e marcadores moleculares. No presente trabalho os marcadores ISSR e SSR foram utilizados devido ao alto índice de informação gerado por esses marcadores.

2.3.1 CITOMETRIA DE FLUXO

No contexto de análises de estabilidade genômica a citometria de fluxo possibilita estimar o nível de ploidia, o tamanho de genomas e o conteúdo de bases AT/CG de genomas (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005; OCHATT, 2008; VRÁNA et al., 2014). Essas estimativas são determinadas por comparação com um padrão de referência (planta com conteúdo de DNA e bases AT/CG conhecido).

A citometria de fluxo é uma ferramenta que analisa parâmetros ópticos de partículas coradas em suspensão. Portanto, determina indiretamente o conteúdo de DNA nuclear pela mensuração da emissão de fluorescência. Suspensões de núcleos e/ou células são coradas com fluorocromos DNA específicos e a quantidade de luz emitida é quantificada (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005; OCHATT, 2008; VRÁNA et al., 2014).

Um histograma típico em análises de núcleos isolados de tecidos jovens apresenta um pico dominante que corresponde aos núcleos que se encontram na fase G1 do ciclo celular e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G2 (LOUREIRO e SANTOS, 2007; VRÁNA et al., 2014). A posição do pico G1 é usada para analisar o tamanho de genomas e o nível de ploidia de DNA.

Como a citometria de fluxo analisa a intensidade de fluorescência relativa e, portanto, o conteúdo de DNA relativo, o tamanho do genoma de uma amostra desconhecida pode ser determinado pela comparação com núcleos de um padrão de referência, cujo tamanho do genoma é conhecido. Isso pode ser obtido por meio da análise separada da amostra e da planta padrão, ou os núcleos do padrão e da amostra são isolados, corados e analisados simultaneamente. A quantidade absoluta de DNA de uma amostra é calculada com base nos valores médios do pico G1: conteúdo de DNA 2C da amostra = (valor médio do pico G1 da amostra) / (valor médio do pico G1 do padrão) X conteúdo de DNA 2C do padrão (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005; LOUREIRO e SANTOS, 2007; VRÁNA et al., 2014).

Os dados sobre o conteúdo de DNA podem ser usados para determinar o nível de ploidia da amostra, uma vez que eles são correlacionados. Para estimar o

nível de ploidia, a posição do pico G1 da amostra é comparada com o pico de uma planta com uma ploidia conhecida (OCHAT, 2008; YAN et al., 2016).

A citometria de fluxo tem sido amplamente usada como ferramenta de análise complementar para as técnicas de cultura de tecidos, incluindo a análise de plantas regeneradas submetidas à duplicação cromossômica (GOMES et al., 2014; IANNICELLI et al., 2016; ZHOU et al., 2017) e para investigar possíveis alterações no tamanho do genoma e no nível de ploidia de plantas cultivadas *in vitro* (PRADO et al., 2010; BAIRU et al., 2011; LARGIA et al., 2015; CAO et al., 2016).

2.3.2 TÉCNICAS DE ESTUDO CROMOSSÔMICO

A análise cromossômica, por meio de diferentes técnicas citogenéticas, é a única maneira de observar todo o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, passíveis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diversas maneiras (GUERRA e SOUZA, 2002).

A preparação dos cromossomos é um passo fundamental em todas as técnicas de citogenética. Cromossomos morfologicamente intactos e bem espalhados são pré-requisito para todas as técnicas de citogenética (KIROV et al., 2014). A maioria das técnicas de análises cromossômicas requerem cromossomos mitóticos metafásicos. Isso é possível por meio do tratamento de células com inibidores de tubulina que despolimerizam o fuso mitótico e paralisam a célula nesta fase (BICKMORE, 2001). Existem basicamente três métodos de preparação cromossômica em plantas: esmagamento, gotejamento e dissociação celular com secagem ao ar. Frequentemente novas modificações nos métodos de preparação cromossômica são sugeridas para obter preparações cromossômicas de alta qualidade (KIROV et al., 2014).

A associação de técnicas moleculares aos procedimentos de preparações cromossômicas, como a hibridização *in situ* (FISH e GISH), tem ampliado o âmbito dos estudos citogenéticos, que agora vão desde a análise do cariótipo à localização

de genes (KATO et al., 2005; YOUNIS et al., 2015). A técnica é baseada na hibridização de sondas de DNA marcadas com corantes fluorescentes através do anelamento da sequência de DNA complementar. Após a ligação da sonda ao alvo, um sinal fluorescente pode ser detectado (GUERRA, 2004).

A técnica FISH permite a identificação de sequências específicas de DNA na intérfase ou metáfase. A FISH provou ser uma excelente ferramenta para o estudo de número de cópias e a distribuição de sequências de DNA nos cromossomos. A técnica permite identificar regiões ribossomais que podem estabelecer relações filogenéticas quando se comparam espécies de plantas e sua genética. Além disso, esta ferramenta tem sido utilizada para mapear famílias de genes multi-cópias e sequências de DNA repetitivo, e para localizar com precisão a posição de genes nos cromossomos. Por meio dessa técnica também é possível visualizar segmentos cromossômicos de grande porte, braços cromossômicos e cromossomos inteiros, via pintura cromossômica (YOUNIS et al., 2015). Outra aplicação dessa técnica é a possibilidade de localizar um transgene no genoma, e até mesmo determinar os números de cópias do transgene (KATO et al., 2005).

As técnicas de citogenética tornaram-se componentes essenciais de estudos da organização do genoma e para a determinação do cariótipo da planta estudada. O estudo do cariótipo tem sido fundamental para pesquisas que buscam a identificação do nível de ploidia de uma espécie (REIS et al., 2014), caracterização citogenética de variantes somaclonais (CAO et al., 2016) e para a contagem do número cromossômico e caracterização cromossômica após procedimentos de duplicação genômica (GOMES et al., 2014).

2.3.3 MARCADORES MOLECULARES

Um marcador molecular é definido como um segmento específico de DNA que é representativo da variabilidade entre diferentes indivíduos com base no polimorfismo encontrado na sua sequência de DNA (AGARWAL et al., 2008; GROVER e SHARMA, 2014). A facilidade na sua detecção e no monitoramento da sua herança também são características que o define. Os usos de marcadores

moleculares são baseados em polimorfismos na sequência de DNA que ocorrem naturalmente (inserções, deleções, inversões, translocações, substituições e duplicações de pares de bases). Tais polimorfismos tornam os marcadores moleculares uma das mais poderosas ferramentas para a análise de genomas, pois, permite a associação de características hereditárias com a variação genômica identificada pelos marcadores (MISHRA et al., 2014; HAYWARD et al., 2015).

As propriedades de um marcador molecular ideal incluem: ser polimórfico e distribuído uniformemente em todo o genoma, ter herança codominante (diferenciar organismos diploides homocigotos de heterocigotos), proporcionar resolução adequada das diferenças genéticas, gerar múltiplos marcadores independentes e confiáveis, apresentar facilidades técnicas (simplicidade, rapidez e baixo custo), dispor de pequenas quantidades de DNA, ter associação com fenótipos e não necessitar de informação prévia sobre o genoma de um organismo (AGARWAL et al., 2008; ARIF et al., 2010; MISHRA et al., 2014).

Não existe uma técnica de marcador molecular que atenda a todas as necessidades de um experimento. As técnicas diferem uma da outra em relação ao nível de polimorfismo detectado, a abundância do marcador no genoma, a especificidade e reprodutibilidade, requerimentos técnicos e custos. De acordo com o tipo de estudo a ser realizado, pode-se escolher entre a variedade de técnicas moleculares, cada uma combina pelo menos algumas das propriedades desejáveis. Algumas técnicas são claramente mais adequadas do que outras para aplicações específicas, como estudos de diversidade e de taxonomia (SEMAGN et al., 2006; AGARWAL et al., 2008; KUMAR et al., 2009).

As técnicas de marcadores moleculares são classificadas em duas categorias: técnicas baseadas em hibridização como RFLP e as técnicas baseadas em PCR como RAPD, AFLP, SCAR, IRAP, SSR e ISSR (AGARWAL et al., 2008; KUMAR et al., 2009, GROVER e SHARMA, 2014). Cada técnica tem suas próprias vantagens e limitações. Em estudos de variação genética, um bom marcador genético é definido por alta variabilidade genética e a capacidade de gerar dados multilocus do genoma em estudo. O alto nível de polimorfismo e a ampla distribuição no genoma estão entre as vantagens que tornam os marcadores SSRs e ISSRs amplamente usados em estudos genéticos em plantas.

Marcadores microssatélites, também conhecidos como repetições de sequência simples (SSR), representam uma série de sequências repetitivas amplamente distribuídas em todos os genomas. São fragmentos de DNA compostos de uma a seis bases repetidas em *tandem* e são especialmente adequados para distinguir genótipos intimamente relacionados devido ao seu elevado grau de variabilidade e sua natureza codominante. O alto grau de variação alélica revelada por esses marcadores resulta da variação no número de repetições causada pelo deslizamento da polimerase durante a replicação do DNA e/ou *crossing-over* desigual durante a meiose, gerando novos alelos com diferentes números de unidades repetitivas (KALIA et al., 2011; GROVER e SHARMA, 2014; VIEIRA et al., 2016).

A variação alélica de microssatélites pode ser identificada por meio da amplificação usando dois *primers* loco-específicos que flanqueiam o microssatélite. Os produtos amplificados são analisados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida combinada com coloração com prata ou brometo de etídeo. Alternativamente, os *primers* de SSR podem ser sintetizados com marcação fluorescente para genotipagem por eletroforese capilar usando sequenciador automático. Neste caso, cada amostra de DNA é carregada em um capilar contendo uma matriz de poliacrilamida em que a eletroforese é realizada. A fluorescência emitida pelo *primer* marcado é capturada e a massa molecular do fragmento amplificado é determinada. O resultado é um eletroferograma que mostra picos de luminescência correspondentes a cada alelo amplificado (AGARWAL et al., 2008; KALIA et al., 2011; VIEIRA et al., 2016).

As sequências simples entre repetições (ISSR) são regiões do genoma flanqueadas por sequências de microssatélites. ISSRs são marcadores genéticos dominantes gerados pela amplificação de segmentos de DNA presentes a uma distância amplificável entre duas regiões de repetição de microssatélites idênticos orientadas em direção oposta. A técnica utiliza microssatélites como *primers* em uma reação de PCR de *primer* único tendo como alvos múltiplos *loci* genômicos. As repetições microssatélites utilizadas como *primers* para ISSR podem ser di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleótido. O polimorfismo detectado pelos marcadores ISSR são consequência de falhas na replicação, deleção, inserção ou translocação que

modifica a distância entre as repetições (KUMAR et al., 2009; MISHRA et al., 2014; NG e TAN, 2015).

Os *primers* utilizados podem ou não ser ancorados em uma das extremidades (5' – 3') com 1 a 4 bases degeneradas. A ancoragem tem como função fixar o pareamento do *primer* em uma única posição no sítio alvo para diminuir o nível de pareamentos inespecíficos. Os *primers* de ISSR são considerados robustos e de alta reprodutibilidade devido á maior superfície de ancoragem (*primers* longos 15-30 nucleotídeos) permitindo o uso de alta temperatura de anelamento. Os produtos amplificados são normalmente de 200-2000 pb de comprimento e podem ser detectados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (MISHRA et al., 2014; NG e TAN, 2015).

Os marcadores ISSR e SSR são usados em análises de estabilidade genômica de plantas cultivadas *in vitro* (CAO et al., 2016; SILVA et al., 2016; THORAT et al., 2017), para a caracterização molecular de germoplasma (HANCI e GÖKÇE, 2016; COSTA et al., 2016), em estudos de diversidade genética (ZHANG et al., 2017). Levando-se em consideração o alto nível de polimorfismo e a ampla distribuição no genoma desses dois marcadores pode-se pressupor a eficiência deles para a investigação da estabilidade de plantas poliploides sintéticas ao nível de sequência de DNA.

2.4 CULTIVO *IN VITRO* A LONGO PRAZO E ESTABILIDADE GENÔMICA

O cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais pode desencadear alterações genéticas e epigenéticas (BAIRU et al., 2011; KRISHNA et al., 2016). As alterações genéticas incluem rearranjos e quebras cromossômicas, substituição de bases na sequência de DNA, ativação e mobilidade de elementos transponíveis para outros locais genômicos e alterações no nível de ploidia (PHILLIPS et al., 1994; BAIRU et al., 2011; KRISHNA et al., 2016). As alterações epigenéticas estão relacionadas com modificações nos padrões de metilação do DNA (KAEPLER et al., 2000; BAIRU et al., 2011; KRISHNA et al., 2016). Essas alterações originadas do

cultivo *in vitro* foram denominadas variação somaclonal por Larkin e Scowcroft em 1981, e esse termo continua sendo amplamente utilizado.

Existem vários fatores que podem determinar a frequência de variação durante o cultivo *in vitro*. Entre eles podemos citar o genótipo da planta doadora de explantes, o método de propagação de propagação *in vitro*, a origem do explante, tipo e concentrações de reguladores de crescimento vegetal, o número e a duração do subcultivos (BAIRU et al., 2011; KRISHNA et al., 2016). As alterações genéticas observadas em plantas cultivadas *in vitro* podem resultar da ação conjunta de todos esses fatores, da associação de alguns fatores ou da ação única de alguns fatores (LAKSHMANAN et al., 2007).

Um exemplo da associação de alguns fatores foi observado em *Platanus acerifolia*. Essa espécie foi cultivada *in vitro* em meio MS suplementado com 0,3 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA por meio de segmentos nodais, com subcultivos bimensais, durante 8 anos. O resultado da análise da estabilidade genética com marcadores ISSR mostrou 2,88% de alterações genéticas (HUANG et al., 2009). Nesse trabalho a variação genética observada pelos autores pode ser atribuída aos fatores: regulador de crescimento, número de subcultivos e tempo de cultivo.

Em *Solanum tuberosum*, o percentual de alterações genéticas detectado na análise com marcadores AFLP variou de 8,75 a 15,63%. Os três clones que apresentaram alteração genética foram cultivados por segmentos nodais durante 40 anos em meio MS sem adição de regulador de crescimento (DANN e WILSON, 2011). Esse trabalho exemplifica a ação do longo período de cultivo *in vitro* como responsável por desencadear as alterações genéticas observadas.

Resultados contrastantes com aqueles apresentados acima foram observados na espécie *Bacopa monnieri*. A estabilidade genética da espécie foi analisada por meio da citometria de fluxo e marcadores moleculares. A espécie foi cultivada *in vitro* durante 5 anos em meio MS sem adição de reguladores de crescimento. O subcultivo era realizado a cada dois meses usando segmentos nodais como explantes. Não foram observadas diferenças significativas entre o conteúdo de DNA das plantas cultivadas *in vitro* e das plantas cultivadas no campo. Os fragmentos amplicados pelos marcadores moleculares apresentaram um padrão monomórfico entre as plantas cultivadas *in vitro* e as plantas cultivadas no campo (LARGIA et al., 2015).

O longo tempo de cultivo *in vitro* mesmo com uso de reguladores de crescimento não induziu alterações genéticas nas espécies *Pisum sativum*, *Lavandula officinalis* e *Taxus media*. Gemas axilares de *Pisum sativum* foram cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com 20 μM de BAP e 0,1 μM de ANA por um período de 24 anos (SMÝKAL et al., 2007). *Lavandula officinalis* foi cultivada *in vitro* sob condições de crescimento mínimo durante 6 anos em meio MS contendo 2% de sacarose, 1,2% de ágar e 2,5 mg L^{-1} de cinetina. Essas condições possibilitaram aumentar o intervalo entre os subcultivos de 6 para 12 semanas (PRASAD et al., 2015). Calos foram induzidos na espécie *Taxus media* em meio MS contendo 1,0 mg L^{-1} de 2, 4-D, 1,0 mg L^{-1} de ANA e 1,0 mg L^{-1} de BAP. Os calos foram subcultivados a cada 28 dias durante 5 anos (FU et al., 2012).

A frequência de alterações na estabilidade de plantas cultivadas *in vitro* durante um longo período pode ser influenciada pelo genótipo. Por isso, algumas espécies apresentam alterações e outras permanecem estáveis. Os resultados da análise da estabilidade genética na espécie *Ananas comosus* corrobora essa ideia. Quatro variedades da espécie *Ananas comosus* foram usadas para estudar a estabilidade genética na espécie após um longo período de cultivo *in vitro*. As plantas foram mantidas *in vitro* durante 10 anos sob condições de crescimento mínimo com redução da concentração dos sais MS pela metade, temperatura a 21 ± 1 °C, intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. Essas condições possibilitaram um intervalo de 24 meses entre os subcultivos. Apenas uma das quatro variedades apresentou variação genética para os marcadores ISSR (SILVA et al., 2016). Os resultados desse trabalho mostram que as diferenças na constituição genômica pode influenciar a estabilidade dentro da mesma espécie.

2.5 POLIPLOIDIA E ESTABILIDADE GENÔMICA EM AUTOPOLIPLOIDES SINTÉTICOS

2.5.1 POLIPLOIDIA

A poliploidia, definida como a existência de mais de dois conjuntos cromossômicos no mesmo núcleo, é o mecanismo mais importante na evolução e especiação dos vegetais (SOLTIS e SOLTIS, 2009; MADLUNG, 2013; HEGARTY et al., 2013; DE STORME e MASON, 2014). Os benefícios da poliploidia na evolução das plantas têm sido atribuídos a uma série de fatores que aceleram a evolução, tais como a não manifestação de mutações deletérias, aumento da diversidade alélica, da heterozigosidade e sub ou neofuncionalização de genes duplicados, resultando em variação fenotípica (COMAI, 2005; DEL POZO e RAMIREZ-PARRA, 2015).

A poliploidia é um fenômeno muito comum no reino vegetal, e provavelmente todas as angiospermas passaram por pelo menos um evento de poliploidização durante sua história evolutiva (JIAO et al., 2011; MOGHE e SHIU, 2014; DEL POZO e RAMIREZ-PARRA, 2015). Plantas poliploides podem ser classificadas com base em três parâmetros diferentes: origem genômica, via de formação e o tempo após a formação do poliploide (YANG et al., 2011).

Quanto à origem, podem ser divididas em autopoliploides, que são derivados de um evento de duplicação genômica do mesmo conjunto cromossômico ou genomas muito semelhantes dentro da mesma espécie, tais como batata (*Solanum tuberosum*), alfafa (*Medicago sativa*), e cana de açúcar (*Saccharum*). E alopoliploides, que são derivados de um evento de hibridização entre genomas diferentes seguido de duplicação genômica do híbrido ou da fusão de gametas não reduzidos entre as espécies. Milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*) e algodão (*Gossypium hirsutum*) são exemplos de espécies alopoliploides (CHEN, 2010; PIGNATTA et al., 2010; AVERSANO et al., 2012).

A diferenciação de plantas autopoliploides de alopoliploides é frequentemente realizada através da análise do pareamento cromossômico e padrões de herança. A presença de mais de dois cromossomos homólogos em

autopoliploides pode contribuir para a formação de multivalentes durante a meiose. Devido ao pareamento não preferencial, a descendência de um cruzamento entre dois autopoliploides apresentará herança polissômica. Nos alopoliploides os complementos cromossômicos divergentes não se pareiam entre si, resultando na formação de bivalentes durante a meiose e num padrão de herança dissômica (TAYALÉ e PARISOD, 2013; SATTLE et al., 2016).

Em relação à via de formação, plantas poliploides podem ser divididas em plantas poliploides de origem sexual e plantas poliploides de origem somática. A produção e a fusão de gametas não reduzidos têm sido apontadas como a causa mais comum de poliploidia em plantas. Um gameta não reduzido pode fundir-se com outro gameta não reduzido (poliploidização bilateral) ou com um gameta reduzido (poliploidização unilateral). A poliploidização somática se baseia na duplicação cromossômica dos tecidos somáticos, e está associada a eventos mitóticos como endomitose ou endoreduplicação, que podem ocorrer tanto em uma célula zigoto quanto em tecidos meristemáticos (DE STORME e MASON, 2014; SATTLE et al., 2016).

As plantas poliploides têm uma tendência em retornar a um comportamento do tipo diploide ao longo do tempo, experimentando mudanças na organização dos cromossomos, na ordem e expressão dos genes e modificações epigenéticas, um fenômeno conhecido como diploidização (TAYALÉ e PARISOD, 2013; MOGHE e SHIU, 2014). A classificação dos poliploides com relação ao tempo após sua formação leva em consideração a diploidização. Nos paleopoliploides o evento de duplicação ocorreu milhões de anos atrás e o genoma encontra-se diploidizado. Já nos neopoliploides o evento de duplicação é recente e o genoma ainda não é diploidizado (TAYALÉ e PARISOD, 2013). Os neopoliploides podem ser divididos em naturais e sintéticos. Poliploides naturais resultam de duplicação genômica espontânea, enquanto poliploides sintéticos são o resultado de duplicação genômica induzida, com ou sem pré-hibridização do genoma, resultado do cruzamento entre diferentes plantas (YANG et al., 2011).

Estudos têm mostrado que genomas poliploides podem ser altamente dinâmicos e passam por mudanças estruturais e funcionais. A comparação entre citótipos diploides e tetraploides revela que a duplicação do genoma envolve mudanças importantes na biologia celular dos poliploides. Por exemplo, o tamanho

das células é aumentado, a relação entre o volume celular e o conteúdo de DNA nuclear é alterada e contribui para a aquisição de novas características como o aumento da expressão gênica, alterações na fisiologia e ocupação de diferentes nichos ecológicos (PARISOD et al., 2010).

Após o processo de poliploidização, extensas mudanças genéticas e epigenéticas ocorrem no genoma e levam a uma ampla reorganização do genoma. No entanto, os mecanismos que desencadeiam essas reorganizações genômicas permanecem desconhecidos. Algumas dessas alterações genéticas envolvem a reestruturação do genoma, incluindo rearranjos cromossômicos, amplificação de sequências repetitivas, perda de sequências de DNA e ativação de elementos transponíveis. A poliploidização envolve também alterações funcionais sem alterações da sequência nucleotídica, tais como modificações epigenéticas, envolvendo alterações no padrão de metilação e outros tipos de remodelação da cromatina. Genes duplicados são perdidos ou silenciados ao longo do tempo, mas alguns são mantidos e desenvolvem novas funções (neofuncionalização) ou funções mais específicas (subfuncionalização) (SOLTIS et al., 2010; DEL POZO e RAMIREZ-PARRA, 2015; SPOELHOF et al., 2017).

A possibilidade de comparar plantas poliploides sintéticas com seus respectivos parentais tem despertado a atenção de pesquisadores. O estudo de plantas poliploides sintéticas possibilita investigar as alterações morfológicas, fisiológicas e genômicas imediatamente após a formação de poliploides (YANG et al., 2011; DEL POZO e RAMIREZ-PARRA, 2015).

2.5.2 ESTABILIDADE GENÔMICA E AUTOPOLIPLOIDIA SINTÉTICA

A duplicação do número cromossômico em plantas por meio de compostos químicos inibidores da mitose é extensivamente pesquisada. A maioria dos trabalhos de indução de poliploidia relata a ocorrência de plantas mixoploides. A mixoploidia é considerada um fator negativo dos procedimentos de indução de poliploidia (KANCHANAPOOM e KOARAPATCHAIKUL, 2012; REGALADO et al., 2017; SALMA et al., 2017). Alguns pesquisadores usam o termo poliploides parciais

para nomear as plantas mixoploides. A condição de mixoploidia é considerada instável, uma vez que a competição entre as células originais e as células poliploides pode levar à eliminação das células poliploides (REGALADO et al., 2017). Em função dessa instabilidade das plantas mixoploides alguns pesquisadores optam por descartar essas plantas (CARVALHO et al., 2005; PRAÇA et al., 2009; VIEHMANNOVÁ et al., 2009; HANNWEG et al., 2013; JAVADIAN et al., 2017).

Estudos sobre a estabilidade da ploidia de plantas poliploides e mixoploides são escassos em comparação ao grande número de publicações sobre indução de poliploidia. A estabilidade da ploidia de plantas tetraploides foi confirmada em *Eriobotrya japonica* um ano após o tratamento de indução (BLASCO et al., 2015), em *Dioscorea zingiberensis* após 6 meses (HUANG et al., 2010) e em *Arabidopsis thaliana* após três gerações (YU et al., 2009). Tetraploides sintéticos estáveis também foram relatados em cultivares de *Rhododendron*, mas os autores não mencionaram o tempo decorrido após a indução (VÄINÖLÄ, 2000). Por outro lado, instabilidade da ploidia de plantas tetraploides foi relatada em *Acacia mangium* (HARBARD et al., 2012) e *Centella asiatica* (KAENSAKSIRI et al., 2011). Exemplos de estudos sobre a análise da estabilidade da ploidia em plantas mixoploides podem ser encontrados em Väinölä (2000), Vanstechelman et al. (2010) e Harbard et al. (2012).

Além da análise da estabilidade da ploidia, a estabilidade das plantas poliploides sintéticas também pode ser investigada em nível de sequência genômica. Nesse caso, as alterações genômicas são analisadas pela comparação entre a estrutura genômica da planta matriz e das plantas poliploides sintéticas. As alterações genômicas detectadas em plantas poliploides sintéticas são decorrentes da reorganização do genoma em função do evento de poliploidização (HUFTON e PANOPOULOU, 2009; TAYALÉ e PARISOD, 2013).

A poliploidização demanda uma reorganização do genoma para permitir a correta funcionalização no mesmo núcleo de genes de origem diferente (no caso de alopoliploides) ou de genes duplicados de genomas idênticos ou muito semelhantes (no caso de autopoliploides) (AVERSANO et al., 2013). A reorganização genômica ocorre por meio de rearranjos genômicos. O termo rearranjo genômico refere-se a qualquer alteração que tenha o efeito de mover (inversões e translocações), duplicar, inserir ou deletar trechos do genoma. O termo também é utilizado para

descrever rearranjos que desencadeiam alterações detectáveis na ordem, tamanho ou posição de marcadores genômicos (HUFTON e PANOPOULOU, 2009).

No caso de autoploidos, os resultados dos estudos sobre reorganização genômica em diferentes espécies são contraditórios. Em algumas espécies a reorganização genômica é detectada imediatamente após a poliploidização e em outras, tal evento não é identificado. De acordo com Parisod et al. (2010), autoploidos não passam por uma reestruturação substancial do genoma durante a primeira geração após a duplicação do genoma, mas os processos de reorganização podem se tornar mais importantes a longo prazo.

Para investigar a reorganização genômica após a poliploidização em duas espécies de batata selvagem (*Solanum commersonii* e *Solanum bulbocastanum*), Aversano et al. (2013; 2015), usaram marcadores SSR e ISSR. Em nenhuma das espécies os *loci* testados (SSR e ISSR) mostraram polimorfismos entre os tetraploides e o progenitor diploide de onde foram derivados. De acordo com os autores os resultados revelaram que alterações estruturais devidas à duplicação cromossômica não afetaram o genoma de ambas as espécies nos *loci* analisados. Resultado semelhante foi observado em *Citrus limonia*. A constituição genômica de genótipos diploides e tetraploides foi comparada usando marcadores moleculares SSR. Os resultados mostraram que os perfis de marcadores eram idênticos entre os genótipos (ALLARIO et al., 2011).

Em *Eragrostis curvula*, genótipos com o mesmo *background* genético e diferentes níveis de ploidia (tetraploide natural, dihaploide, tetraploide sintético), foram analisados com os marcadores RAPD e AFLP para investigar a reorganização genômica após a poliploidização. O percentual de 29,77% de polimorfismos genômicos detectado entre os genótipos foi considerado resultado do evento de poliploidização, conversão do genótipo dihaploide a tetraploide sintético (MECCHIA et al., 2007).

Uma série autoploide (diploide, triploide e tetraploide) da espécie *Citrullus lanatus* foi usada para investigar possíveis alterações genômicas induzidas pela poliploidização. As análises foram realizadas com os marcadores ISSR e SRAP. A comparação entre plantas diploides e triploides mostrou que aproximadamente 17% dos sítios foram polimórficos. A comparação do tetraploide

com o diploide e com o autotriploide mostrou que aproximadamente 40% do total de sítios foram polimórficos em cada análise pareada (WANG et al., 2009).

Em *Paspalum notatum* análises comparativas com marcadores RAPD e AFLP entre tetraploides e o parental diploide mostraram 9,20 e 9,90% de modificações genômicas (respectivamente) após a poliploidização. A frequência de perda de bandas dos progenitores foi significativamente superior ao ganho de novas bandas. A maioria do polimorfismo detectado com RAPD foi revelada por quatro *primers* específicos. A análise do sequenciamento desses fragmentos mostrou correspondência com sequências repetitivas (MARTELOTTO et al., 2007).

Análise com marcadores SRAP na espécie *Chrysanthemum lavandulifolium*, mostrou que em comparação com o parental diploide, a reorganização genômica como consequência da poliploidização, resultou em 1,1% de perda de fragmentos da planta parental e 1,6% de novos fragmentos (GAO et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo investigar a estabilidade genômica em acessos naturais e sintéticos de *L. alba* com base em duas diferentes perspectivas: em acessos naturais de diferentes ploidias cultivados *in vitro* durante sete anos e em acessos sintéticos obtidos a partir da duplicação cromossômica de um acesso diploide natural por meio de tratamento com colchicina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos do longo tempo de cultura *in vitro* de *L. alba* avaliando-se o tamanho do genoma de acessos naturais representantes de cinco níveis de ploidia;
- Investigar os efeitos do longo tempo de cultura *in vitro* sobre a sequência de nucleotídeos em acessos naturais representantes de cinco níveis de ploidia de *L. alba*;
- Verificar a estabilidade da ploidia de plantas tetraploides e mixoploides sintéticas obtidas após o tratamento de um acesso diploide natural com colchicina;
- Determinar o número cromossômico e o número de sítios de DNAr 45S das plantas poliploides sintéticas;
- Investigar os efeitos da poliploidização nas regiões de sequências repetitivas por meio dos marcadores ISSR e SSR;
- Comparar o perfil químico das plantas poliploides sintéticas com o da planta matriz diploide.

4 CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA DO COMPLEXO POLIPLOIDE *Lippia alba* CULTIVADO *IN VITRO* À LONGO PRAZO

4.1 INTRODUÇÃO

A técnica de cultura *in vitro* é uma poderosa ferramenta para a manutenção de recursos fitogenéticos. Ela tem sido amplamente utilizada há muito tempo como uma eficiente alternativa para a preservação de germoplasma vegetal nativo e cultivado (SAN JOSÉ et al., 2015; SILVA et al., 2016) e também para multiplicar rapidamente o número de plantas de interesse comercial (PNIEWSKI et al., 2017; VIVES et al., 2017). Além disso, a possibilidade de modular a produção de componentes químicos constitui um aspecto interessante da exploração do cultivo *in vitro* (GIRI e ZAHEER, 2016).

Um dos aspectos cruciais da cultura *in vitro* é a manutenção da integridade do genoma vegetal. Durante o desenvolvimento, os explantes podem ser expostos a condições particulares que provocam a desestabilização do programa genético e epigenético dos tecidos vegetais, levando a variações cromossômicas e de DNA, conhecidas como variação somaclonal (LARKIN e SCOWCROFT, 1981). A frequência dessas variações pode ser afetada por diferentes fatores como a composição do meio e as condições de cultura, padrão de regeneração, estresse resultante do cultivo *in vitro*, composição genética das espécies, tempo de duração da cultura e o número de subcultivos (BAIRU et al., 2011; KRISHNA et al., 2016).

Embora a cultura de tecidos seja usada com sucesso há um longo tempo em diferentes espécies como uma alternativa para a manutenção de bancos de germoplasma superando os problemas existentes na manutenção das plantas no campo (ENGELMANN, 2011; RAJASEKHARAN e SAHIJRAM, 2015), não há relatos publicados sobre a estabilidade genética de uma série poliploide após a manutenção *in vitro* a longo prazo.

A citometria de fluxo e marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para analisar a estabilidade genética de plantas regeneradas *in vitro* (PRADO et al., 2010; BAIRU et al., 2011; LARGIA et al., 2015). Os marcadores

ISSRs estão entre os marcadores mais utilizados devido à sua simplicidade, custo-benefício, confiabilidade e o alto índice discriminativo (BHATIA et al., 2011; RAMAKRISHNAN et al., 2014). Estes marcadores têm sido muito úteis para investigar a estabilidade genômica de várias espécies micropropagadas tais como *Platanus acerifolia* (HUANG et al., 2009), *Alhagi maurorum* (AGARWAL et al., 2015), *Gerbera jamesonii* (BHATIA et al., 2011), *Pisum sativum* (SMÝKAL et al., 2007), *Zea mays* (RAMAKRISHNAN et al., 2014) e *Bacopa monnieri* (LARGIA et al., 2015).

Lippia alba (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae) é uma erva aromática nativa da América do Sul e Central (HENNEBELLE et al., 2008). No Brasil, a espécie é encontrada em todo o país e é popularmente conhecida como erva-cidreira (TAVARES et al., 2004; CHIES et al., 2013). Devido às propriedades medicinais, a espécie tem sido usada há muito tempo na medicina popular como sedativo e contra problemas digestivos, respiratórios e cardiovasculares (HENNEBELLE et al., 2008). A espécie possui uma extraordinária variação química (HENNEBELLE et al., 2008), morfológica (JEZLER et al., 2013) e genômica (REIS et al., 2014). Uma interessante associação entre seu perfil químico e o nível de ploidia foi recentemente relatada abrindo novas possibilidades para explorar e modular a produção de óleo essencial. O linalol, um componente importante para a indústria de perfumes, é produzido eficientemente por triploides e é produzido apenas em quantidades relativamente pequenas por diploides e tetraploides (VICCINI et al., 2014).

Apesar da importância comercial da espécie, poucos estudos têm investigado aspectos do cultivo *in vitro* em *L. alba*. Os autores descreveram principalmente a resposta da regeneração de plantas a partir de meristemas apicais/axilares (GUPTA et al., 2001; TAVARES et al. 2004; ASMAR et al., 2012, LUZ et al., 2014) ou calos derivados de explantes foliares (JIBINABAI et al., 2014). Até o momento, nenhum estudo sobre o cultivo *in vitro* de *L. alba* avaliou a estabilidade genômica de plantas micropropagadas. Neste trabalho, a estabilidade genômica foi investigada em acessos diploides, aneuploides, triploides, tetraploides e hexaploides de *L. alba* cultivados *in vitro* durante sete anos. A investigação foi realizada utilizando a citometria de fluxo e marcadores moleculares (ISSR e SSR). Os resultados desse trabalho fornecem a primeira documentação do perfil genômico da espécie sob condições de manutenção *in vitro* a longo prazo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.3 MATERIAL VEGETAL

Vinte e dois acessos de *L. alba*, com cinco níveis de ploidia (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide) (Figura 1), provenientes de coletas em diferentes estados brasileiros são mantidos na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), e também sob cultivo *in vitro* no Laboratório de Genética e Biotecnologia, no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. Os acessos foram estabelecidos *in vitro* a partir de meristemas axilares em 2008. As plantas foram mantidas *in vitro* em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura contendo sais e vitaminas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de *myo-inositol* (Sigma-Aldrich®) e ágar 7 g L⁻¹ (Sigma-Aldrich®). O pH foi ajustado para 5,7±0,1. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 16h e irradiância de, 35 μmol m⁻² s⁻¹. Os acessos foram mantidos neste meio durante sete anos, com subcultivos a cada dois meses.

4.4 ANÁLISE DA ESTABILIDADE GENÔMICA

Folhas jovens e frescas foram usadas nas análises citométrica e molecular. Foram analisadas quatro plantas de cada acesso, três representando plantas conservadas *in vitro* durante sete anos e uma correspondendo ao acesso mantido no campo. No total, 88 plantas foram analisadas.

4.5 CITOMETRIA DE FLUXO

Para estimar o conteúdo de DNA dos acessos de *L. alba*, aproximadamente 30 mg de tecido foliar foram macerados com a mesma massa da planta padrão de referência *Pisum sativum* L. cv. 'Ctirad' (2C = 9,09 pg). A extração de núcleos foi realizada de acordo com o método de Galbraith et al. (1983) por meio de cortes no tecido foliar com bisturi numa placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado. A suspensão nuclear foi filtrada e os núcleos foram posteriormente corados com 25 µL de iodeto de propídio (10 mg/L) (Sigma), com 2,5 µL de RNase (20 mg/L) (Sigma) adicionado a cada amostra. Pelo menos 10000 núcleos foram analisados por amostra num citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson). Cada histograma obtido a partir do software FACS Diva 6.1.3 foi analisado utilizando o software Flowing 2.5.1 (disponível em <http://www.flowingsoftware.com/>). A quantidade de DNA nuclear (pg) de cada planta foi estimada pela intensidade de fluorescência relativa da planta e do padrão de referência interno (*Pisum sativum* 9,09 pg) de acordo com Doležel et al. (2007). Cada planta foi estimada três vezes. O conteúdo de DNA das plantas mantidas *in vitro* foi comparado com os valores obtidos para as plantas mantidas no campo (para cada um dos acessos). As diferenças no tamanho do genoma foram avaliadas pelo teste t ($p < 0,05$).

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

Cerca de 200 mg de tecido foliar fresco foram triturados utilizando o macerador *Tissue Lyser* (Quiagen). O procedimento de extração com base no método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990) com modificações, foi usado para isolar o DNA do pó resultante da maceração. A concentração de DNA das amostras foi estimada por leitura em Nanodrop[®]. A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%.

4.7 MARCADORES ISSR

Vinte e três *primers* de ISSR foram inicialmente rastreados e os oito mais polimórficos (Tabela 1) foram selecionados. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 1µL de tampão GoTaq®Flexi (Promega), 0,5µM de *primer*, 0,15mM de dNTPs, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 2 mM de MgCl₂ e 30ng de DNA. O programa de amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, 45 segundos a temperatura de anelamento, 2 minutos a 72°C e um passo de extensão final de 72°C por 7 minutos. A temperatura de anelamento foi ajustada de acordo com o *primer* usado (Tabela 1). Os produtos da amplificação foram analisados em géis de agarose 2,0%, submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X por cerca de 90 minutos. O gel foi corado com uma solução de SYBR® *Safe DNA gel stain* (Sigma) e visualizado em transiluminador UV. A imagem capturada pelo sistema GelDoc-It™ Imaging System foi fotodocumentada com auxílio do software Vision Works® LS. O peso molecular dos fragmentos foi estimado utilizando-se um marcador de 100 pb (Amresco).

4.8 MARCADORES SSR

A análise com marcadores SSR foi realizada para confirmar alguns resultados particulares do padrão de bandas obtido com os marcadores ISSR para cinco acessos. Os resultados de ISSR que mostraram variação genética para menos de dois *primers* foram avaliados por marcadores microssatélites. Foram utilizados *primers* de SSR especificamente desenvolvidos para *L. alba* pelo nosso grupo de pesquisa (LOPES, 2015). Após uma análise preliminar de 16 *primers*, os cinco mais informativos foram selecionados (Tabela 1). As condições das reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas conforme estabelecido por Lopes (2015). As reações de PCR tiveram um volume final de 10µL contendo 1µL de tampão GoTaq®Flexi (Promega), 0,013 µM de *primer forward*, e 0,5 µM *primer reverse*, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Promega) e 30ng de

DNA genômico. A amplificação do DNA foi realizada utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (3 minutos), seguida de 35 ciclos a 94°C (45 segundos), temperatura de anelamento específica de cada primer (Tabela 1) (45 segundos), extensão a 72°C (45 segundos) e extensão final por 20 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação do DNA foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida 8% utilizando cubas de eletroforese vertical com tampão TBE (500 volts por 5 horas). O gel foi fixado em solução de 10% de etanol e 1% de ácido acético, corado com solução de nitrato de prata 12% e revelado em solução composta por 1% de formaldeído 37% e 10% de hidróxido de sódio. Os produtos de amplificação foram analisados visualmente e o peso molecular dos fragmentos foi estimado utilizando um marcador de 50 pb.

4.9 ANÁLISE DOS DADOS

As reações de amplificação para todos os *primers* foram repetidas duas vezes para confirmar a reprodutibilidade dos resultados. Para quantificar o polimorfismo genético, os padrões de amplificação de PCR foram registrados como uma matriz binária, na qual a presença ou ausência de fragmentos com tamanho similar (para os marcadores ISSR e SSR) foi avaliada como 1 ou 0, respectivamente. Apenas bandas consistentes e reprodutíveis, variando de 100 a 1600 pb de tamanho foram incluídas na análise. A variação genética foi evidenciada, considerando bandas novas ou ausentes, comparando cada amostra *in vitro* com a respectiva planta mantida no campo.

5 RESULTADOS

5.1 CRESCIMENTO VEGETATIVO

Segmentos nodais de 22 acessos de *L. alba* cultivados *in vitro*, em meio MS livre de regulador de crescimento, apresentaram desenvolvimento satisfatório. As gemas axilares dormentes brotaram em cerca de 5-10 dias após a repicagem. O processo de enraizamento ocorreu simultaneamente com a brotação após 7-15 dias. Após 2 meses, cada explante micropropagado *in vitro* de cada um dos acessos produziu pelo menos oito nós por planta. Os acessos apresentaram poucas diferenças quanto à resposta *in vitro*. Em geral, o processo de abscisão foliar foi observado após 2 meses de cultivo.

5.2 TAMANHO DO GENOMA

A análise simultânea das suspensões nucleares de *L. alba* e do padrão de referência interno mostrou um perfil típico de dois picos (G0/G1, G2/M) com coeficiente de variação abaixo de 5%. Diferenças significativas no conteúdo de DNA nuclear ($p < 0,05$) foram observadas entre as plantas mantidas *in vitro* e as plantas mantidas no campo para alguns acessos. Cinco acessos diploides e cinco poliploides mantidos *in vitro* mostraram menor conteúdo de DNA (Figura 1).

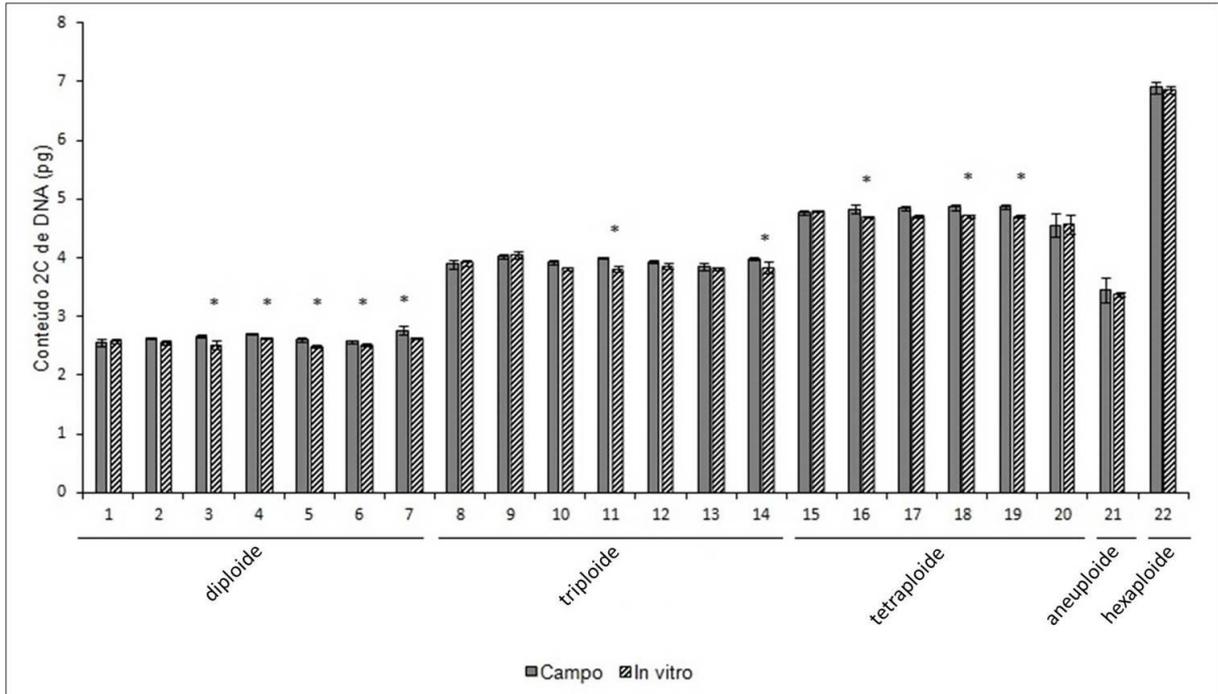


Figura 1. Conteúdo de DNA nuclear de 22 acessos de *L. alba* mantidos em condições de campo e os respectivos clones mantidos *in vitro* durante sete anos. Acessos 1-7: diploide ($2n=30$), 8-14: triploide ($2n=45$), 15-20: tetraploide ($2n=60$), 21: aneuploide ($2n=38$), 22: hexaploide ($2n=90$). As barras com asterisco indicam diferença estatística entre a planta controle (campo) e os clones *in vitro* para cada acesso de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

5.3 ANÁLISE MOLECULAR

Oito *primers* de ISSR foram selecionados após uma triagem preliminar de 23 *primers*. Os marcadores ISSR produziram um total 62 bandas com média de 7,75 bandas por *primer*. Cada *primer* produziu um conjunto de produtos de amplificação com tamanhos variando de 200 a 1600 pb. O número de bandas para cada *primer* variou de 4 (UBC-820) a 11 (UBC-809, Tabela 1). 5456 bandas (número de amostras analisadas vezes o número de bandas considerando todos os 8 *primers*) foram geradas pelos marcadores ISSR. Destas bandas, 145 foram polimórficas em todas as 88 plantas analisadas.

Tabela 1. *Primers* de ISSR e SSR utilizados para comparar plantas de *L. alba* mantidas *in vitro* (7 anos) com plantas mantidas no campo, incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_a), número total de bandas (N_b), variação no número de bandas (V_b), tamanho das bandas em pares de base (T_{pb}).

<i>Primer</i>	Sequencia (5'-3')	T_a °C	N_b	V_B	T_{pb}
ISSR					
UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	48,2	11	3-11	300-1000
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	50,2	10	4-8	250-1300
UBC-854	TCTCTCTCTCTCTCRG	50	5	1-4	300-1400
UBC-818	CACACACACACACAG	51	7	3-7	400-1600
UBC-820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	51	4	2-4	600-1200
UBC-830	TGTGTGTGTGTGTGG	52,7	8	3-7	300-1500
UBC-848	CACACACACACACARG	52,7	9	2-8	200-1000
UBC-850	GTGTGTGTGTGTGTGYC	52,7	8	3-6	300-1000
SSR					
77F	*AAGGTCACGTAAACATACCG	56	7	3-5	140-250
77R	AGGAGAAGCATGAGCATGTA				
294F	*CACCAGTGC GACTACATAGAT	55	2	1-2	160-190
294R	CCTATGATTCTCGAACACTTC				
229F	*GAGGAAGTTTCCTGTACCAGT	50	12	7-9	140-250
229R	GTGTACAGAGAGATGGCAAAG				
440F	*GCAAAGTAGTGAAAGATGTC	50	9	4-9	150-400
440R	CCAAACTCACTGCTTTTAC				
473F	*GAAACAATATCTCTCGTGTGC	59	2	1-2	100-120
473R	GGTAGCTTCCGAGAAAACA				

O polimorfismo entre plantas *in vitro* e plantas do campo foi observado quando o fragmento estava presente/ausente no genótipo do campo, mas ausente/presente nos regenerantes *in vitro*. Um exemplo dos perfis de bandas das plantas mantidas *in vitro* e das plantas mantidas no campo gerado com o marcador UBC 830 está ilustrado na Figura 2.

O número de bandas polimórficas foi variável. Algumas plantas mantidas *in vitro* acumularam um grande número de bandas polimórficas, e somente 3 plantas não apresentaram polimorfismo (planta 15, 16 e 20). Pelo menos uma banda polimórfica estava presente em 86,36% das plantas *in vitro* analisadas (19 acessos). O número de bandas polimórficas entre plantas *in vitro* e do campo variou de 1 a 21 dependendo do acesso. A taxa de polimorfismo variou de 1,61 a 33,87% (Tabela 2).

Os acessos 17 e 22 mostraram variação genética para apenas um *primer*, com um e dois fragmentos polimórficos, respectivamente. Apenas um acesso revelou polimorfismo para todos os *primers*, mostrando também a maior taxa de polimorfismo.

Curiosamente, o número de bandas polimórficas diminuiu à medida que o nível de ploidia aumentou. Diploides mostraram 66 bandas polimórficas, enquanto triploides e tetraploides exibiram 49 e 20 bandas polimórficas, respectivamente. Os acessos que não mostraram polimorfismo (15, 16 e 20) ou polimorfismo para apenas um *primer* de ISSR (17 e 22) também foram analisados utilizando marcadores microsatélites para confirmar a ausência ou a baixa ocorrência de variação.

Dos 16 marcadores SSR específicos para *L. alba*, cinco foram selecionados devido ao perfil mais informativo. A amplificação destes cinco marcadores SSR produziu 32 fragmentos reprodutíveis. Os fragmentos de microsatélites variaram de 100 a 400 pb de tamanho. O número de bandas variou de 2 (*primers* SSR-294 e 473) a 12 (*primer* SSR-473), sendo o número médio de bandas por *primer* de 6,4. As 640 bandas (número de amostras analisadas vezes o número de bandas considerando os cinco *primers*) geradas pelos marcadores SSR foram monomórficas (dados não mostrados) corroborando os resultados obtidos pelos marcadores ISSR.

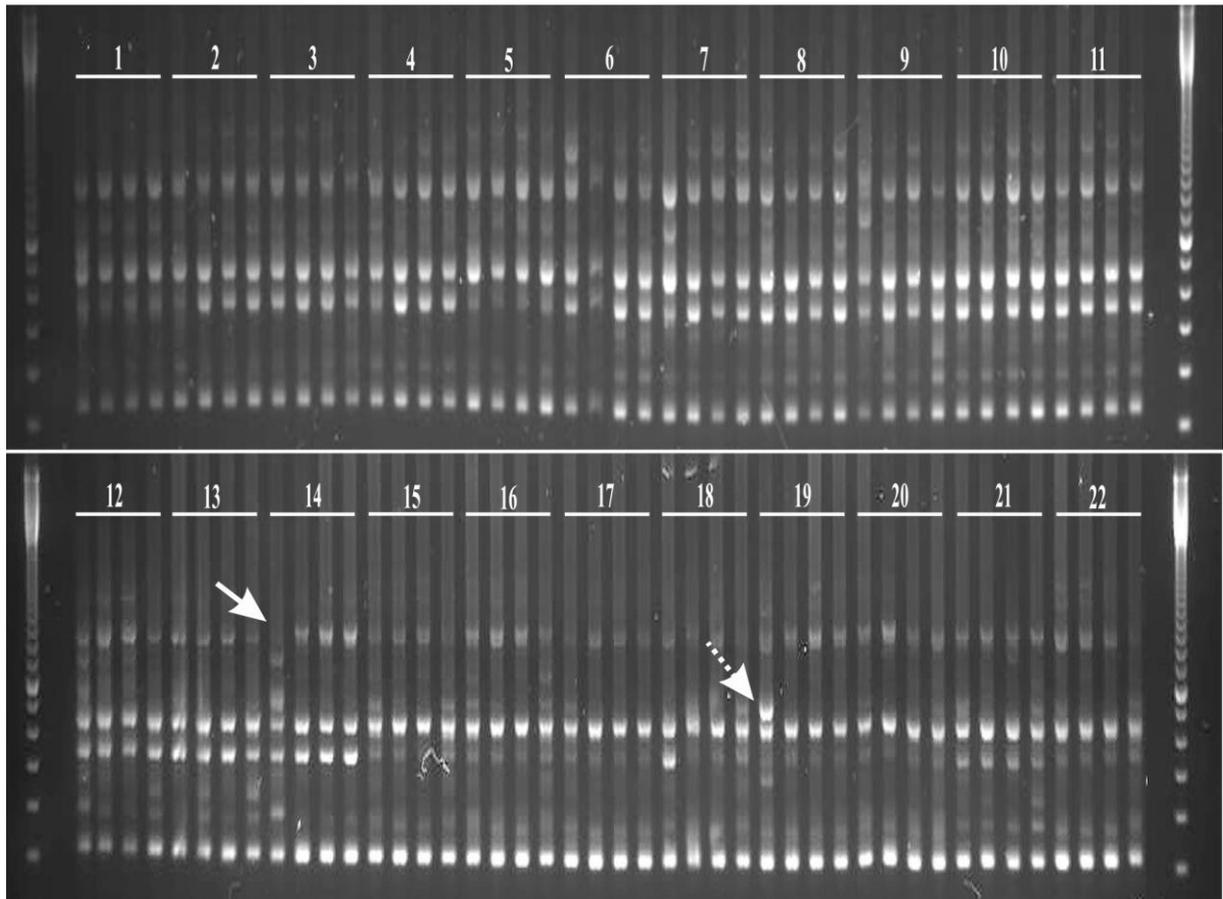


Figura 2. Perfil de bandas representativo do marcador ISSR em vinte e dois acessos de *L. alba* mantidos *in vitro* e no campo. O padrão de amplificação de DNA foi obtido com o *primer* de ISSR UBC830. Para cada acesso, foram analisadas quatro plantas. Da esquerda para a direita: planta controle (mantida no campo) seguida de três repetições de clones *in vitro*. Utilizou-se um marcador de 100 pb como referência. A seta contínua indica o surgimento de uma nova banda em clones *in vitro*. Seta pontilhada indica ausência de banda nos clones *in vitro*.

Tabela 2. Análise do padrão de bandas gerado por oito *primers* de ISSR utilizados para comparar plantas de *L. alba* mantidas *in vitro* (7 anos) com plantas mantidas no campo.

Acessos	<i>Primer</i>								No. de <i>primers</i> com polimorfismo	Total de bandas polimórficas	Taxa de Polimorfismo (%)
	Número de bandas polimórficas/total de bandas										
	UBC-830	UBC-848	UBC-850	UBC-820	UBC-818	UBC-854	UBC-835	UBC-809			
1	1/8	3/9	0/8	0/4	0/7	1/5	3/10	0/11	4	8	12,90
2	2/8	1/9	3/8	1/4	1/7	1/5	3/10	2/11	8	14	22,58
3	0/8	1/9	0/8	0/4	0/7	1/5	0/10	0/11	2	2	3,23
4	2/8	3/9	3/8	0/4	2/7	1/5	3/10	5/11	7	17	30,65
5	0/8	1/9	0/8	0/4	1/7	1/5	0/10	0/11	3	3	4,84
6	1/8	2/9	1/8	1/4	0/7	1/5	2/10	1/11	7	8	14,52
7	2/8	2/9	2/8	0/4	0/7	1/5	6/10	1/11	6	14	22,58
8	0/8	1/9	1/8	0/4	0/7	2/5	0/10	0/11	3	4	6,45
9	3/8	1/9	0/8	0/4	0/7	0/5	0/10	0/11	2	4	6,45
10	0/8	1/9	0/8	0/4	0/7	1/5	0/10	0/11	2	2	3,23
11	1/8	0/9	0/8	0/4	0/7	2/5	0/10	0/11	2	3	4,84
12	2/8	3/9	0/8	0/4	0/7	2/5	0/10	0/11	3	7	11,29
13	1/8	4/9	0/8	0/4	0/7	3/5	0/10	0/11	3	8	12,90
14	3/8	5/9	3/8	0/4	0/7	3/5	2/10	5/11	6	21	33,87
15	0/8	0/9	0/8	0/4	0/7	0/5	0/10	0/11	0	0	0,00
16	0/8	0/9	0/8	0/4	0/7	0/5	0/10	0/11	0	0	0,00
17	0/8	0/9	0/8	0/4	1/7	0/5	0/10	0/11	1	1	1,61
18	2/8	0/9	2/8	0/4	2/7	2/5	1/10	2/11	6	11	17,74
19	1/8	3/9	0/8	0/4	1/7	1/5	2/10	0/11	5	8	12,90
20	0/8	0/9	0/8	0/4	0/7	0/5	0/10	0/11	0	0	0,00
21	1/8	2/9	0/8	0/4	0/7	2/5	0/10	0/11	3	5	8,06
22	0/0	2/9	0/8	0/4	0/7	2/5	0/10	0/11	1	2	3,23

6 DISCUSSÃO

Em geral, o procedimento de regeneração de plantas *in vitro* envolve o uso de reguladores de crescimento mesmo quando gemas axilares são utilizadas como explantes (FEYISSA et al., 2007; HUANG et al., 2009; SHILPHA et al.; 2014, AGARWAL et al., 2015). Em *L. alba*, por exemplo, a citocinina BAP tem sido utilizada no cultivo de segmentos nodais com o objetivo da rápida multiplicação de plantas (GUPTA et al., 2001; LUZ et al., 2014). Neste trabalho demonstrou-se que *L. alba* não necessita de reguladores de crescimento para a manutenção *in vitro*, como foi relatado para outras espécies como *Bacopa monnieri* (LARGIA et al., 2015) e *Scutellaria baicalensis* (ALAN et al., 2007). Os autores demonstraram a propagação de gemas axilares em meio MS sem adição de reguladores de crescimento. De acordo com Souza et al. (2010), durante a cultura de segmento nodal, o nível endógeno de auxina/citocinina pode mudar devido à liberação da dominância apical. A remoção do meristema apical leva a uma redução do nível de auxina, o que provavelmente favorece a biossíntese de citocininas e/ou inibe sua degradação no tecido nodal, resultando no desenvolvimento de gemas laterais.

Os acessos de *L. alba* mantiveram sua capacidade de produzir raízes e brotos saudáveis durante sete anos de cultivo *in vitro*. Portanto, a espécie manteve sua capacidade de crescimento mesmo após a cultura por um longo período. Geralmente, as alterações de ploidia reduzem a capacidade de regeneração de explantes no cultivo *in vitro* (PHILLIPS et al., 1994, CURRAIS et al., 2013), o que aparentemente não foi observado no complexo poliploide natural *L. alba*. Todos os níveis de ploidia (diploide, aneuploide, triploide, tetraploide e hexaploide) mostraram o mesmo comportamento em relação à capacidade de crescimento.

O tamanho do genoma, estimado por citometria de fluxo, foi o mesmo para 12 dos 22 acessos avaliados comparando-se plantas mantidas *in vitro* com as respectivas plantas mantidas no campo. Para os demais, observou-se uma pequena redução, em torno de 2%, no conteúdo de DNA. Nossos resultados são consistentes com aqueles relatados por Largia et al. (2015), trabalhando com manutenção *in vitro* de *Bacopa monnieri*, por meio da multiplicação de gemas axilares. Os autores não

detectaram alterações no conteúdo de DNA nuclear e nos níveis de ploidia em plantas mantidas *in vitro* por 5 anos, como observamos para 12 acessos de *L. alba*.

A redução no tamanho do genoma detectada em alguns acessos de *L. alba* após um longo período de cultivo *in vitro* pode estar relacionado com a plasticidade natural do genoma da espécie juntamente com as condições de estresse do ambiente *in vitro*. Cinco acessos diploides e cinco poliploides mostraram redução no tamanho do genoma. Não foi possível observar uma relação entre a redução do tamanho do genoma e o nível de ploidia, indicando que a redução não foi associada ao número de cópias do genoma. Resultados semelhantes de tamanho reduzido do genoma também foram observados na cultura *in vitro* de *Pueraria lobata* (SLIWINSKA e THIEM, 2007), *Musa* spp. (MSOGOYA et al., 2011) e *Elaeis guineensis* (GIORGETTIA e CASTIGLIONE, 2016). A instabilidade meiótica e a variação de algumas marcas cromossômicas nos citótipos de *L. alba* já observados (REIS, 2017) corroboram a hipótese de que este complexo poliploide ainda está em adaptação evidenciando a instabilidade do genoma durante a divisão celular. Além da estimativa do conteúdo de DNA, as variações genéticas induzidas durante o cultivo de plantas *in vitro* também podem ser detectadas por marcadores moleculares (PHILLIPS et al., 1994).

Os perfis de bandas polimórficas apresentadas pela análise de marcadores ISSR mostraram variação genética quando as plantas de *L. alba* cultivadas *in vitro* foram comparadas com as respectivas plantas mantidas no campo. Curiosamente, o número de bandas polimórficas diminuiu à medida que o tamanho do genoma aumentou. Em outras palavras, os tetraploides mostraram menos polimorfismo do que os diploides. Os triploides mostraram um número intermediário de polimorfismo. Este resultado reforça a instabilidade do genoma de *L. alba*, mesmo no nível de ploidia inferior (diploide). A causa exata da variação somaclonal ainda é desconhecida, embora muitos fatores tenham sido mencionados por afetar a estabilidade genética de culturas *in vitro*: natureza do tecido usado como explante, estresse *in vitro* devido ao ambiente de crescimento artificial, genótipo da planta, número de subcultivos e duração da cultura (BAIRU et al., 2011; KRISHNA et al., 2016). Tais fatores podem atuar em conjunto ou independentemente para provocar alterações genéticas em plantas cultivadas *in vitro* (LAKSHMANAN et al., 2007).

De acordo com a literatura, a cultura de órgãos diferenciados, como raízes, folhas e caules, geralmente produz mais variantes do que gemas axilares e apicais que possuem meristemas pré-existentes (SHARMA et al., 2007). Apesar da cultura de gemas axilares ser relatada como o método mais seguro para evitar a instabilidade genética, uma vez que os meristemas são mais estáveis em comparação com outros tecidos (LEROY et al., 2000; JOSHI e DHAWAN, 2007; NGEZAHAYO e LIU, 2014), detectou-se neste trabalho instabilidade genômica em *L. alba*, mesmo utilizando cultura de gemas axilares. Acessos de *L. alba* mantidos *in vitro* em meio MS sem reguladores de crescimento durante 7 anos apresentaram até 33,87% de bandas polimórficas. Resultados semelhantes foram relatados para outras espécies após um longo período de cultura *in vitro* usando gemas axilares (HUANG et al., 2009; DANN e WILSON, 2011). Huang et al. (2009), utilizando marcadores ISSR, observaram 2,8% de polimorfismo em *Platanus acerifolia* após 8 anos de cultura em meio MS suplementado com BAP e ANA. Maior nível de variação (8,75-15,63%) foi detectado por Dann e Wilson (2011) em três clones de batata subcultivados por segmentos nodais durante aproximadamente 40 anos em meio MS livre de regulador de crescimento. Em contraste, não foi detectada qualquer variação genética em *Bacopa monnieri* mantida *in vitro* durante 5 anos em meio MS0 (LARGIA et al., 2015). Esses resultados, aparentemente contraditórios, podem ser explicados pelas diferenças na constituição genômica de cada espécie/genótipo (BAIRU et al., 2011). Em nosso estudo, o número de bandas polimórficas identificadas pelos marcadores ISSR variou de 1 a 21, dependendo do acesso, demonstrando a influência do genótipo mesmo dentro da mesma espécie. Tal instabilidade genética detectada pelos marcadores ISSR pode ser devida à ocorrência de regiões no genoma de *L. alba* que apresentaram maior suscetibilidade à variação durante a cultura *in vitro*. De fato, a existência de tais regiões tem sido sugerida para outras espécies tais como *Secale cereale* (LINACERO et al., 2000; DE LA PUENTE et al., 2008), *Eucalyptus globulus* (MO et al., 2009) e *Iris pseudacorus* (KOZYRENKO et al., 2004).

A instabilidade genômica também pode estar associada ao estresse fisiológico como espécies reativas de oxigênio. O tecido vegetal cultivado *in vitro* pode sofrer níveis elevados de estresse oxidativo devido à interrupção de controles normais de desenvolvimento, o que pode conduzir em última instância a diferentes

tipos de aberrações ao nível da sequência de nucleotídeos no DNA (CASSELLS e CURRY, 2001), incluindo, por exemplo, a instabilidade observada em regiões de microsatélites (JACKSON et al., 1998). A instabilidade genética detectada em nosso estudo pode ser atribuída ao cultivo *in vitro* de longo prazo, aumentando os efeitos nocivos do estresse oxidativo. Durante sete anos de cultivo *in vitro* de acessos de *L. alba*, eles foram subcultivados a cada dois meses resultando em 42 passagens. O ferimento dos tecidos durante a excisão do explante pode desencadear uma explosão oxidativa prejudicial (YAHRAUS et al., 1995). Esse fato, juntamente com outros fatores que induzem a variação somaclonal, além da possível instabilidade natural do genoma de *L. alba*, pode compor um cenário complexo responsável pela variação genética detectada em *L. alba*.

O acúmulo de mutações durante a cultura *in vitro* foi previamente associado ao aumento do tempo de cultivo. A variação genética entre a planta-mãe doadora e as plantas regeneradas de *Nepenthe khasiana* aumentou de 5,65% no primeiro subcultivo para 10,87% no terceiro (DEVI et al., 2014). Os autores atribuíram estes resultados a um aumento da exposição dos regenerantes às condições de cultura que poderiam induzir variação somaclonal. De forma semelhante, a frequência de subcultivos aumentou a variação genética em *Tetrastigma hemsleyanum*, observando-se um pico de variação após 4-6 subcultivos (PENG et al., 2015). Além disso, os 72% de alteração genética observada em banana foram atribuídos a um grande número de subcultivos (10 ciclos) (BAIRU et al., 2006).

Devido ao ambiente de crescimento artificial, a cultura *in vitro* de longo prazo pode dificultar a preservação da integridade genética das plantas (MIGUEL e MARUM 2011). De acordo com Us-Camas et al. (2014), as plantas necessitam mudar rapidamente a sua regulação molecular de forma a responder rápida e eficientemente durante a divisão e crescimento celular. A elevada taxa de proliferação durante a micropropagação alcançada em períodos relativamente curtos leva a um aumento no número de subcultivos, aumentando as condições de estresse.

A cultura *in vitro* de material vegetal pode induzir variação espontânea, mas também pode revelar uma variação pré-existente (BAIRU et al., 2011). A taxa de variação genética detectada em *L. alba* poderia também ser uma combinação do

sistema *in vitro* juntamente com a instabilidade do genoma da espécie. Considerando que os genótipos cultivados *in vitro* são clones das amostras mantidas no campo, as diferenças genéticas entre clones *in vitro* e do campo não são um caráter pré-existente. Há relatos de que as variações observadas nos clones *in vitro* ocorrem com maior frequência do que as mutações espontâneas *ex vitro* (DE LA PUENTE et al., 2008; YANG et al., 2010). É provável que *L. alba* sofra uma taxa relativamente alta de mutação espontânea *in vitro* que poderia estar associada à pequena redução no tamanho do genoma observado e as taxas de polimorfismos detectadas com os marcadores ISSR.

Recentemente, Reis et al. (2014) relataram que existe uma variação considerável no tamanho do genoma de *L. alba*. Cinco números cromossômicos diferentes ($2n = 30, 38, 45, 60, 90$) foram detectados em 106 acessos. Outro aspecto é a variação natural do cariótipo observada mesmo dentro dos acessos diploides. As medidas de cromossomos revelaram uma fórmula cariotípica diferente reforçando a variação entre indivíduos do mesmo nível de ploidia (SOUSA et al., 2009, PIERRE et al., 2011, REIS et al., 2014). As anormalidades observadas durante a meiose (REIS et al., 2014) também reforçam a instabilidade do genoma de *L. alba*. Este cenário é consistente com a hipótese de que existe uma porção específica do genoma que é especialmente susceptível ao estresse, mostrando taxas mais elevadas de rearranjo e mutação do que outras porções do genoma (SAHIJRAM et al., 2003). Possivelmente as sequências repetitivas estão envolvidas em tais alterações, uma vez que tais sequências compreendem grande parte dos genomas de plantas (MEHROTRA e GOYAL, 2014; BISCOTTI et al., 2015).

Este é o primeiro relato de cultivo *in vitro* de longo prazo e o primeiro estudo que avalia a integridade genômica de plantas micropropagadas de *L. alba*. Embora tenhamos observado pequena redução no tamanho do genoma de alguns acessos cultivados *in vitro*, nossos resultados sugerem que a cultura *in vitro* de longo prazo não induz poliploidia em *L. alba*. Corroborando algumas das variações observadas no conteúdo de DNA, a análise de ISSR foi eficiente para detectar instabilidade no genoma da espécie em nível molecular, revelando uma taxa de variação somaclonal relativamente alta. Tal variação está possivelmente associada à instabilidade natural do genoma de *L. alba* combinada com a manutenção *in vitro* de longa duração.

Considerando a importância econômica da espécie e os aspectos úteis para a manutenção dos recursos genéticos *in vitro*, a instabilidade do genoma de *L. alba* deve ser levada em conta na sua preservação e também no uso da espécie para fins medicinais ou industriais.

7 CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÔMICA EM ACESSOS AUTOPOLIPLOIDES SINTÉTICOS DE *Lippia alba*

7.1 INTRODUÇÃO

A poliploidização resulta na multiplicação do genoma e no aumento do conteúdo de genes que conduz frequentemente a diferenças morfológicas e fisiológicas entre as plantas poliploides e os seus genitores diploides (MOGHE e SHIU, 2014). Com o objetivo de compreender os fatores envolvidos na formação de espécies de plantas poliploides, muitos estudos têm sido realizados em poliploides sintéticos obtidos por inibidores mitóticos e hibridação (YANG et al., 2011; TAMAYO-ORDÓÑEZ et al., 2016).

Os efeitos da poliploidização têm sido amplamente investigados principalmente em aloploiploides. Acredita-se que a hibridação interespecífica pode ter impacto maior que a duplicação do genoma resultando em maiores alterações genômicas, morfológicas e fisiológicas do que em autopoliploides. Em contraste, menos informação está disponível em autopoliploides, que contêm mais de um conjunto do mesmo (ou similar) genoma e, portanto, representam materiais ideais para tais estudos (AVERSANO et al., 2015). Os efeitos da poliploidia *per se* só podem ser estudados com precisão em autopoliploides obtidos pela poliploidização somática, uma vez que os poliploides, neste caso, diferem da planta genitora apenas na dosagem do genoma (COHEN et al., 2013).

Os procedimentos de poliploidização somática com o uso de inibidores mitóticos geram normalmente um alto percentual de plantas mixoploides. As plantas mixoploides são consideradas um problema por serem poliploides parciais e pelo desconhecimento da estabilidade da ploidia dessas plantas. A maioria dos trabalhos que tem por objetivo estudar plantas poliploides sintéticas negligencia as plantas mixoploides, que são na maioria das vezes, consideradas uma consequência indesejada dos protocolos de duplicação. Análises comparativas entre plantas poliploides sintéticas e os respectivos genitores são realizadas em nível histológico, morfológico, fisiológico, agrônomico, genômico e epigenômico (RÊGO et al., 2011;

ALLARIO et al., 2011; GOMES et al., 2014; AVERSANO et al., 2015; GAO et al., 2016; IANNICELLI et al., 2016; ZHOU et al., 2017).

Uma consequência comum da poliploidia é o aumento do tamanho celular resultante do maior tamanho do genoma nuclear (TSUKAYA, 2013; CARMONA-MARTÍN et al., 2015; DAI et al., 2015; SATTLER et al., 2016). Esse aumento do tamanho celular resulta em diminuição na densidade de estômatos (COHEN et al. 2013; GOMES et al., 2014; WIDORETNO, 2016; REGALADO et al., 2017; ZHOU et al., 2017), lâmina foliar mais espessa (ALLARIO et al., 2011; GAO et al., 2016; ZHOU et al., 2017), e órgãos maiores como raízes, folhas, tubérculos, frutos, flores e sementes (SATTLER et al., 2016). Estudos sobre os perfis metabólicos em plantas poliploides sintéticas tem mostrado que a poliploidia influencia o metabolismo das plantas tanto em nível qualitativo como quantitativo, resultado de alterações nos mecanismos que regulam a biossíntese de compostos individuais (CARUSO et al., 2011; DEGHAN et al., 2012; TROJAK-GOLUCH e SKOMRA, 2013; XU et al., 2014; GOMES et al., 2014; TAVAN et al., 2015; FASANO et al., 2016).

Após o processo de poliploidização, mudanças genéticas e epigenéticas podem ocorrer no genoma duplicado e levam a uma reorganização do genoma (MOGHE e SHIU, 2014; DEL POZO e RAMIREZ-PARRA, 2015). A reorganização genômica é um processo longo e dinâmico que pode ocorrer como respostas iniciais após a duplicação genômica ou a médio e longo prazos (YANG et al., 2011; TAYALÉ e PARISOD, 2013).

Autopoliploides sintéticos têm sido utilizados para investigar possíveis modificações genéticas, epigenéticas e na expressão gênica em uma variedade de espécies tais como: *Paspalum notatum* (MARTELOTTO et al., 2007), *Solanum* sp. (AVERSANO et al., 2013; 2015), *Phlox drummondii* (DAR et al., 2013); *Arabidopsis thaliana* (PIGNATTA et al., 2010), *Eragrostis curvula* (MECCHIA et al., 2007), *Paulownia fortunei* (ZHANG et al., 2014), *Citrus limonia* (ALLARIO et al., 2011), *Oryza sativa* (WU et al., 2014) e *Chrysanthemum lavandulifolium* (GAO et al., 2016).

A espécie *L. alba* é um complexo poliploide de origem autopoliploide, com citótipos diploides ($2n=30$), aneuploides ($2n=38$), triploides ($2n=45$), tetraploides ($2n=60$) e hexaploide ($2n=90$) (REIS et al., 2014). Além da variação genética a espécie apresenta extensa variabilidade morfológica e na composição química do óleo essencial (HENNEBELLE et al., 2008). A espécie apresenta uma relação entre

o tamanho do genoma e a composição do óleo essencial. Os citótipos diploides e tetraploides apresentam o citral como componente majoritário enquanto o linalol foi encontrado como componente majoritário nos citótipos triploides (VICCINI et al., 2014). Considerando a origem autopoliploide, a espécie torna-se um raro modelo para investigar as alterações fenotípicas e genômicas que ocorrem após a poliploidização sintética. A possibilidade de se comparar o genoma de citótipo diploide com poliploides imediatamente após o evento de poliploidização oferece uma singular oportunidade de se avaliar a influência do tamanho do genoma no “comportamento funcional da espécie”. Paralelamente, esta investigação contribui para entender a origem e a prevalência de indivíduos poliploides em condições naturais. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar a estabilidade genômica de acessos poliploides sintéticos obtidos a partir de um citótipo diploide por meio de tratamento com colchicina.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.3 MATERIAL VEGETAL

Plantas autoploiploides sintéticas foram geradas pela exposição de gemas axilares do acesso BGEN 02 ($2n=30$) a diferentes concentrações de colchicina em meio de cultura. Os tratamentos resultaram em cinco plantas tetraploides e treze mixoploides. Essas plantas foram repicadas e após a aclimatização, 28 plantas poliploides sintéticas foram plantadas em vasos e cultivadas em casa de vegetação (RIBEIRO, 2015). Em função da disponibilidade de material vegetal, onze plantas foram escolhidas para as análises de estabilidade genômica.

7.4 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA

Inicialmente, procedeu-se à estimativa da quantidade de DNA, por citometria de fluxo, a fim de se obter uma indicação do nível de ploidia das plantas escolhidas. Aproximadamente 30 mg de tecido foliar ou radicular foram macerados com a mesma massa da planta padrão de referência *Pisum sativum* L. cv. 'Ctirad' ($2C = 9,09$ pg). Para análise do nível de ploidia amostras de folhas e raízes foram processadas separadamente. A extração de núcleos foi realizada de acordo com o método de Galbraith et al. (1983) por meio de cortes no tecido foliar com bisturi numa placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado. A suspensão nuclear foi filtrada e os núcleos foram posteriormente corados com 25 μ L de iodeto de propídio (10 mg/L) (Sigma), sendo adicionado 2,5 μ L de RNase (20 mg/L) (Sigma) a cada amostra. Pelo menos 10000 núcleos foram analisados por amostra no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson). Cada histograma obtido a partir do software FACS Diva 6.1.3 foi analisado utilizando o programa Flowing software 2.5.1 (disponível em <http://www.flowingsoftware.com/>). A quantidade de DNA nuclear

(pg) de cada amostra foi estimada pela intensidade de fluorescência relativa da amostra e do padrão de referência interno (*Pisum sativum*, 9,09 pg) de acordo com Doležel et al. (2007). O nível de ploidia foi verificado comparando-se a posição do pico G1 da planta diploide com as demais plantas. Três estimativas foram realizadas para cada planta.

7.5 PREPARAÇÃO CROMOSSÔMICA

Raízes obtidas de estacas mantidas em hidroponia à temperatura ambiente foram tratadas com 3mM de 8-Hidroxiquinoleína (Sigma) a 4°C por 9h e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24 horas a -20°C. Posteriormente, as raízes foram digeridas em solução enzimática contendo 20% de pectinase (Sigma) e 2% de celulase (Serva-Onozuka R-10) a 37°C por 6 horas. As lâminas foram preparadas pelo processo de dissociação celular (CARVALHO e SARAIVA, 1993). As lâminas foram previamente analisadas em microscopia de campo claro para a seleção de lâminas com número suficiente de metáfases com cromossomos espalhados para prosseguir com a técnica de hibridização fluorescente *in situ* e a contagem do número cromossômico.

7.6 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

O processo de hibridização foi adaptado de Jiang et al. (1995). As lâminas foram desnaturadas por 1 minuto a 85°C com formamida 70% e então submetidas a desidratação em uma série alcóolica crescente. A mistura de hibridização contendo formamida deionizada 100%; 20xSSC pH 7; sonda; sulfato de dextrano 50% e água foi desnaturada por dez minutos a 90°C e adicionada nas lâminas nas regiões de interesse. A hibridização foi realizada durante 18 h a 37°C em câmara úmida. Os banhos pós-hibridização foram realizados em 2xSSC e 1xPBS. Para a detecção,

anti-DIG conjugado com Rhodamina (Sigma) foi adicionado às lâminas junto com o reagente de bloqueio 5xTNB e água. Em seguida, as lâminas foram lavadas em 1xTNT e 1xPBS e montadas em 20 µL de Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories). A visualização dos sinais foi realizada em microscopia de fluorescência Olympus BX53 e as imagens foram fotografadas com câmera Olympus DP72 acoplada ao microscópio.

7.6 MARCADORES MOLECULARES

7.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração do DNA, cerca de 200 mg de tecido foliar fresco foram triturados utilizando o macerador *Tissue Lyser* (Quiagen). O procedimento de extração com base no método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990) com modificações, foi usado para isolar o DNA do pó resultante da maceração. A concentração de DNA das amostras foi estimada por leitura em Nanodrop[®]. A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%.

7.6.2 MARCADORES ISSR

Onze *primers* de ISSR foram selecionados para comparar o perfil genético do acesso diploide e os poliploides sintéticos (Tabela 3). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler em volume final de 25 µL contendo 1 µL de tampão GoTaq[®]Flexi (Promega), 0,5 µM de *primer*, 0,15 mM de dNTPs, 1 unidade da enzima Taq polimerase (Promega), 2 mM de MgCl₂ e 30 ng de DNA. O programa de amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, 45 segundos a temperatura de anelamento, 2 minutos a 72°C e um passo de extensão final de 72°C por 7 minutos. A temperatura de anelamento

foi ajustada de acordo com o *primer* utilizado (Tabela 3). Os produtos da amplificação foram analisados em géis de agarose 2,0%, submetidos à eletroforese em tampão TBE por cerca de 1h:30 min. O gel foi corado com uma solução de SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen) e as bandas correspondentes aos fragmentos de DNA foram visualizadas através de um transiluminador UVP. O peso molecular dos fragmentos foi estimado utilizando-se um marcador de 100 bp (Amresco). Os produtos da amplificação de PCR foram registrados como uma matriz binária, em que a presença ou ausência de fragmentos com tamanho similares foram assinalados como 1 ou 0, respectivamente. Apenas bandas consistentes e reprodutíveis, entre 200 e 800 pb de tamanho foram incluídas na análise.

7.6.3 MARCADORES SSR

Foram utilizados *primers* de SSR especificamente desenvolvidos para *L. alba* pelo nosso grupo de pesquisa (LOPES, 2015). Após uma análise preliminar de 16 *primers*, os sete mais informativos foram selecionados (Tabela 5). As condições das reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas conforme estabelecido por Lopes (2015). As temperaturas de anelamento dos *primers* variaram de 50 a 60°C (Tabela 5). As reações de PCR tiveram um volume final de 10 µL contendo 1 µL de tampão GoTaq[®]Flexi (Promega), 0,013 µM de *primer forward*, 0,5 µM de *primer forward* marcado com fluorescência (FAM ou HEX) e 0,5 µM de *primer reverso*, 1,5 mM a 3,0mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Promega) e 30 ng de DNA. A amplificação do DNA foi realizada utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C (3 min), seguida de 35 ciclos a 94°C (45 s), temperatura de anelamento específica de cada *primer* (45 s), extensão a 72°C (45 s) e extensão final por 20 min a 72°C. As reações de PCR foram realizadas em duplicata. Os produtos de amplificação foram precipitados, ressuspendidos em água e armazenados a -20°C até o uso.

Os fragmentos amplificados foram analisados no sequenciador MegaBACE1000 (GE Healthcare) que utiliza eletroforese capilar para separar fragmentos de DNA e possibilita identificar diferenças de até 1 pb entre um alelo e

outro. A identificação dos alelos e o tamanho dos fragmentos foram inferidos utilizando o software Fragment Profile (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

7.6.4 ANÁLISE DOS DADOS

Para quantificar o polimorfismo genético, os padrões de amplificação de PCR foram registrados como uma matriz binária, na qual a presença ou ausência de fragmentos com tamanho similar (para os marcadores ISSR e SSR) foi assinalada como 1 ou 0, respectivamente. Os coeficientes de similaridade de Jaccard foram calculados para cada combinação de pares de acessos sendo utilizados para construir um dendrograma de acordo com o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) por meio do software NTSYS (ROHLF, 2000).

7.7 MICROEXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

Uma folha de cada planta, pesando aproximadamente 300 mg, foi congelada a -18°C por 24 horas em frasco de vidro com tampa. Após o congelamento, 0,5 mL de hexano e 0,25 mL de metanol foram adicionadas em cada amostra foliar. As amostras foram mantidas em banho de ultrassom (Thornton-INPEC) com frequência de 70 KHz e temperatura ambiente por 1 hora para acelerar o processo de extração. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado através de uma mecha de algodão estéril. 1 μL de solução límpida obtida contendo os óleos extraídos foi analisado por cromatografia gasosa. A composição química do extrato foi analisada num cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus; Shimadzu). Foi utilizada uma coluna Rtx-5MS[®] (Restek) de 30m x 0,25mm. A programação da temperatura do forno começou numa temperatura inicial de 70°C , mantida por 3 min, seguida por um aumento de $6^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 300°C . O injetor foi operado no modo *split* (1:10), à temperatura de 240°C , a interface e o detector de massas operaram a 300°C . Utilizou-se hélio como gás de

arraste, com fluxo de $1,53 \text{ mL min}^{-1}$. Uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C_9H_{20} ; $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$: ... $\text{C}_{25}\text{H}_{52}$ e $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$) foi injetada nas mesmas condições das amostras. A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros de massa obtidos com os do banco de dados da NIST 9.0 (correlação > 97%) e confirmado pelo seu índice de retenção (Índice de Kováts) calculado para cada constituinte e comparado aos dados na literatura (ADAMS, 2007).

8 RESULTADOS

8.1 ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE DNA

Para a análise de citometria de fluxo foram utilizadas folhas e raízes da planta matriz diploide usada para a indução de poliploidia, das plantas tetraploides e mixoploides obtidas após o tratamento com colchicina (Figura 3). O conteúdo de DNA das plantas tetraploides variou de 5,10 a 5,17 (média = $5,14 \pm 0,03$ pg). Esse valor é correspondente ao dobro do conteúdo de DNA da planta matriz diploide ($2,56 \pm 0,06$ pg). As plantas que inicialmente eram mixoploides, após o tratamento com colchicina, apresentaram conteúdo de DNA entre 3,91 a 3,99 (média = $3,97 \pm 0,03$ pg). Esse valor corresponde ao valor aproximado observado para acessos naturais de *L. alba* que possuem três genomas ($2n=45$, Figura 3). Histogramas representativos da planta matriz diploide e das plantas tetraploides e triploides sintéticas são mostrados na figura 4.

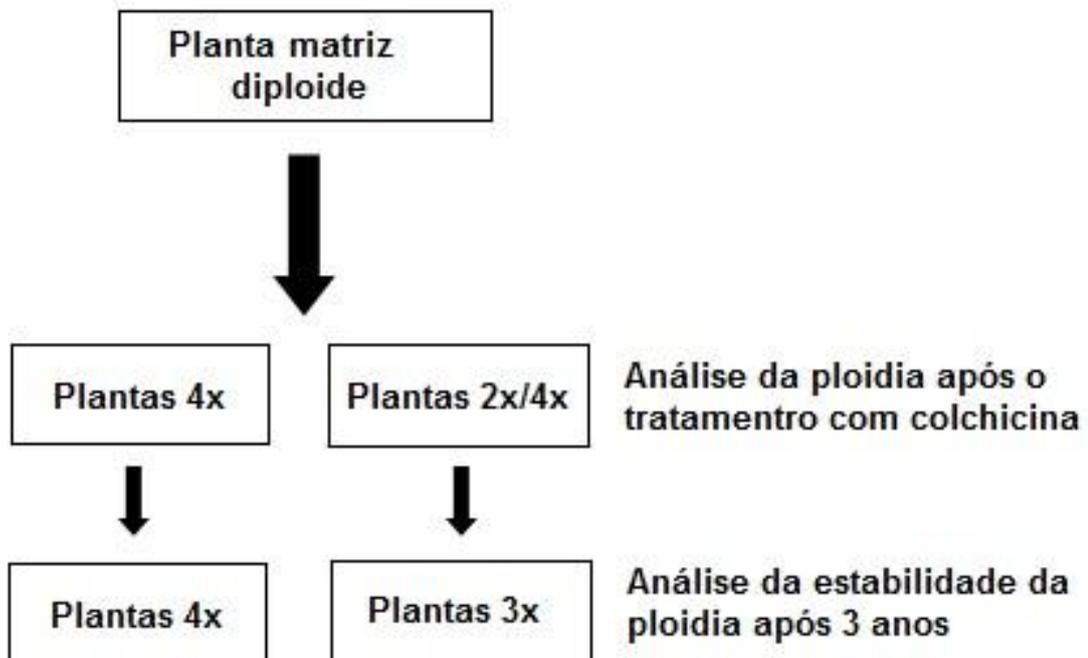


Figura 3. Esquema ilustrativo das análises de ploidia das plantas poliploides sintéticas obtidas após tratamento com colchicina de um acesso diploide de *L. alba*.

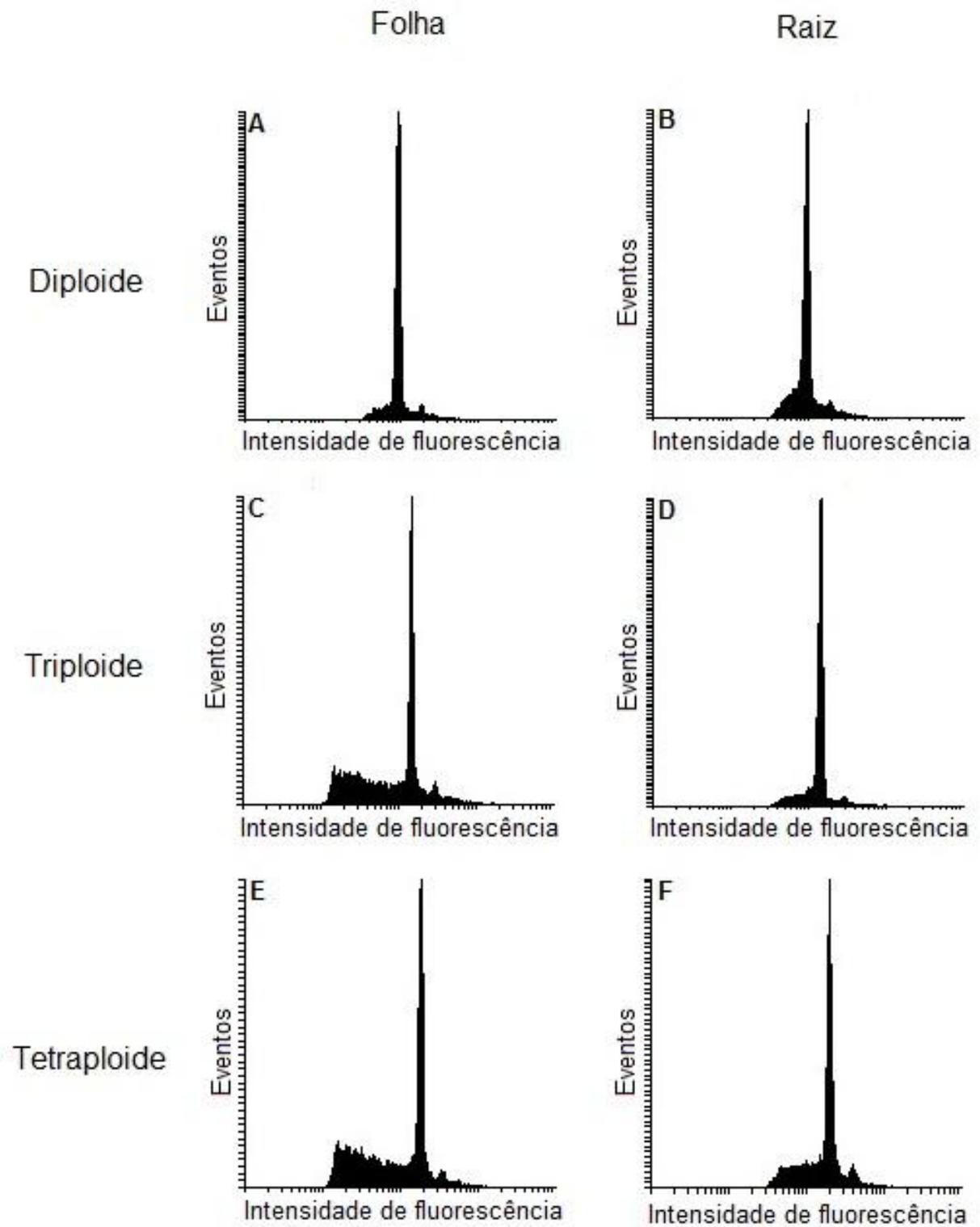


Figura 4. Histogramas representativos de núcleos de folhas e raízes da planta matriz diploide e das plantas poliploides sintéticas. O eixo x representa a intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos e o eixo y o número de núcleos analisados. A-B: planta matriz diploide, C-D: planta triploide sintética, E-F: planta tetraploide sintética.

8.2 NÚMERO CROMOSSÔMICO E HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

Para confirmar os resultados obtidos com a citometria de fluxo, o complemento cromossômico da planta matriz diploide e das plantas poliploides sintéticas foi analisado em metáfases mitóticas de meristemas radiculares para a contagem do número cromossômico e para quantificar o número de sítios de DNAr 45S. A planta matriz diploide apresentou $2n=30$ cromossomos e seis sítios de DNAr 45S, as plantas tetraploides ($2n=60$) apresentaram o dobro de sítios de DNAr 45S observados na planta matriz diploide e as plantas triploides ($2n=45$) apresentaram nove sítios. O número cromossômico da planta matriz diploide e das plantas poliploides sintéticas pode ser confirmado na figura 5. Metáfases mitóticas mostrando os sítios de DNAr 45S representativas de cada uma das plantas são apresentadas na figura 6.

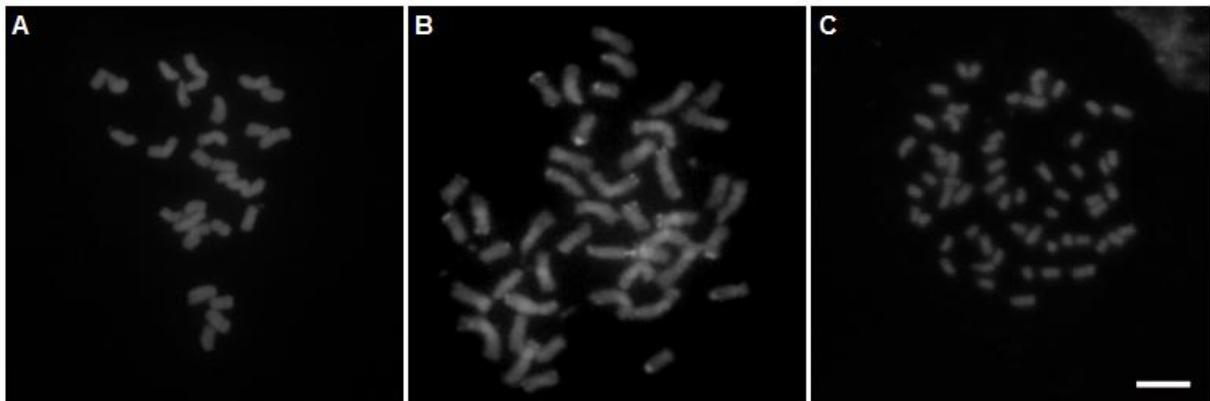


Figura 5. Métafases representativas da planta matriz diploide ($2n=30$) (A), planta sintética triploide ($2n=45$) (B), planta sintética tetraploide ($2n=60$) (C). Barra = 5 μm

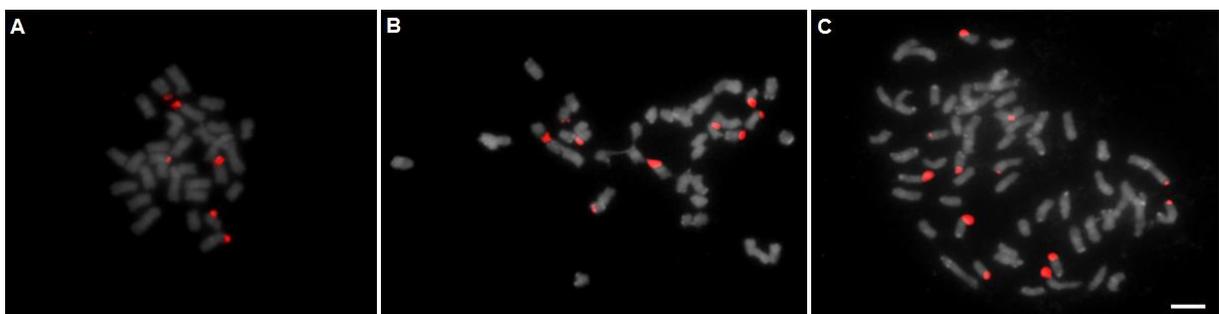


Figura 6. Métafases representativas da hibridização fluorescente *in situ* com a sonda 45S. (A) planta matriz diploide ($2n=30$), (B) planta sintética triploide ($2n=45$) (C) planta sintética tetraploide ($2n=60$) Barra = 5 μm

8.3 PERFIL MOLECULAR POR MARCADORES ISSR

Para comparar a estrutura genética da planta matriz diploide com as plantas poliploides geradas pelo tratamento com colchicina, 11 *primers* foram usados na análise de marcadores ISSR. Um total de 55 bandas foram obtidas, com média de cinco bandas por *primer*. Cada *primer* produziu um conjunto de produtos de amplificação com tamanhos variando de 200 a 800 pares de bases. O número de bandas para cada *primer* variou de três (UBC-859) a sete (UBC-826 e UBC-857, Tabela 3). O polimorfismo entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas foi contabilizado quando o fragmento estava presente/ausente no genótipo parental, mas ausente/presente nos poliploides sintéticos. Um exemplo do padrão de bandejamento obtido com os primers ISSR é mostrado na figura 7.

Tabela 3. *Primers* de ISSR utilizados para comparar a planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas, incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_a), número total de bandas (N_b), variação no número de bandas (V_b), tamanho das bandas em pares de base (T_{pb}).

<i>Primer</i> ISSR	Sequencia (5'-3')	T_a °C	N_b	V_b	T_{pb}
UBC-826	ACACACACACACACC	52,8	7	5-7	200-700
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAYC	50,2	6	4-6	200-500
UBC-854	TCTCTCTCTCTCTCRG	50	5	1-4	300-700
UBC-818	CACACACACACACAG	51	4	3-4	300-600
UBC-827	ACACACACACACACCG	53	4	3-4	300-600
UBC-830	TGTGTGTGTGTGTGG	52,7	4	2-4	200-500
UBC-847	CACACACACACACARC	53,1	5	1-3	400-800
UBC-857	ACACACACACACACYG	54,3	7	4-4	200-700
UBC-859	TGTGTGTGTGTGTGRC	54,5	3	2-3	300-500
UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAYC	48,5	5	4-5	300-800
UBC-829	TGTGTGTGTGTGTGC	54,5	5	2-4	400-800

O número de bandas polimórficas entre a planta matriz diploide e as plantas triploides variou de 24 a 31, e entre a planta matriz diploide e as plantas tetraploides variou de 1 a 3. Quatro das seis plantas triploides sintéticas apresentaram polimorfismos para todos os *primers* usados (11 *primers*). As plantas

tetraploides apresentaram polimorfismo para 1 ou 2 *primers*. Os marcadores revelaram grande percentual de modificações genéticas nas plantas sintéticas triploides e menos alterações nos indivíduos tetraploides. O percentual de polimorfismos entre a planta matriz diploide e as plantas triploides variou de 43,63 a 56,36 % e entre a planta matriz diploide e as plantas tetraploides variou de 1,81 a 5,45 % (Tabela 4). Nas plantas triploides sintéticas os polimorfismos são decorrentes da perda de bandas e também pelo surgimento de novas bandas. O padrão de banda (1/0), banda presente na planta matriz diploide e ausente nas plantas triploides, foi menos recorrente que o padrão (0/1), banda ausente na planta matriz diploide e presente nas plantas triploides. Os percentuais de cada tipo de polimorfismo correspondem a 30% e 14,5%, respectivamente. Nas plantas tetraploides ocorreu apenas o polimorfismo do tipo (0/1), banda ausente na planta matriz diploide e presente nas plantas tetraploides.

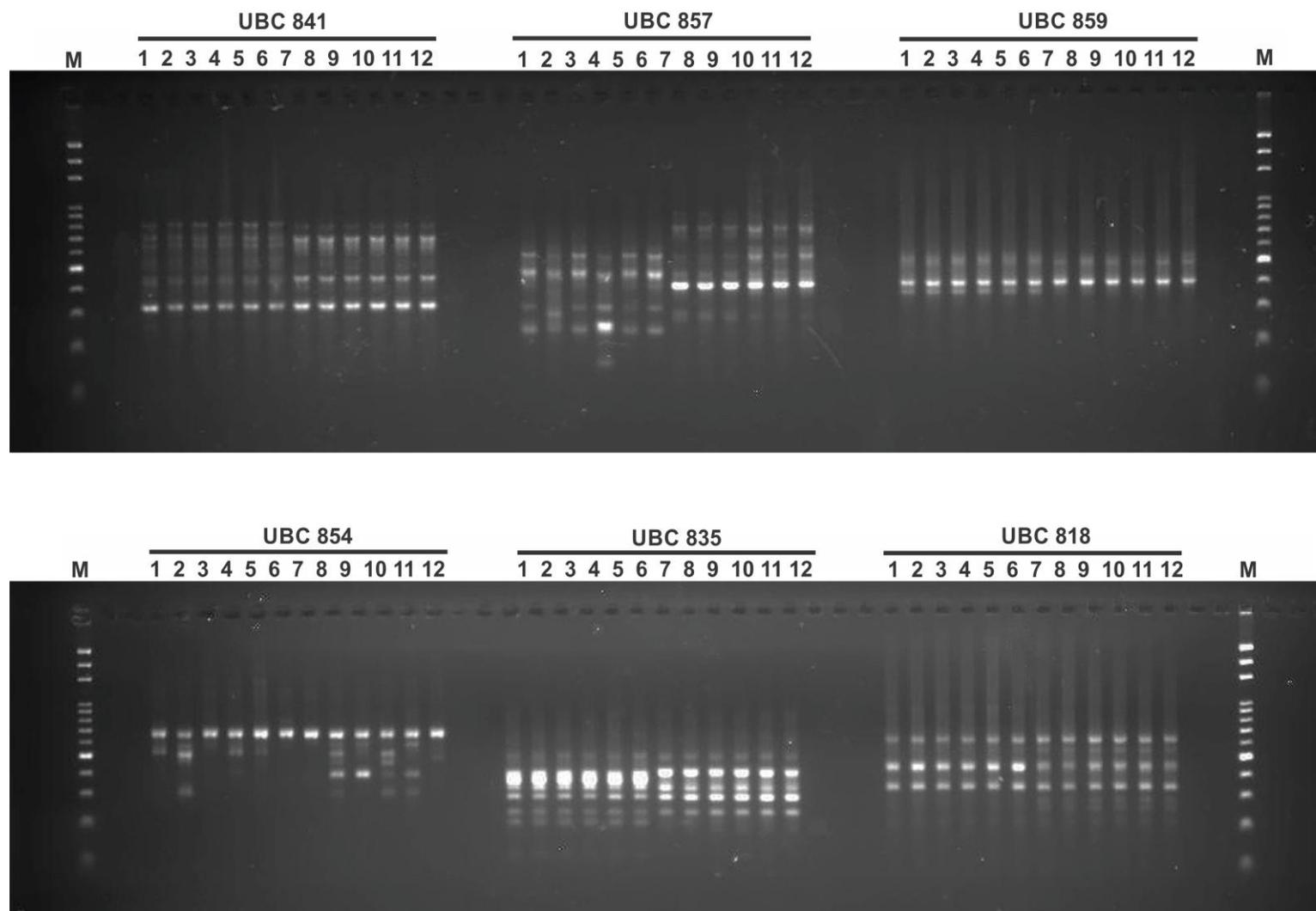


Figura 7. Padrão de bandas obtido com *primers* de ISSR em *L. alba*. Os números de 1 a 6 correspondem a plantas triploides sintéticas, o número 7 corresponde a planta matriz diploide, os números de 8 a 12 correspondem a plantas tetraploide sintéticas. M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabela 4. Padrão de bandas comparativo em *L. alba*, entre a planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas obtido com onze *primers* de ISSR.

Amostras	<i>Primer</i>											Nº de <i>primers</i> polimórficos	Total de bandas polimórficas	Taxa de polimorfismo (%)
	Número de bandas polimórficas/total de bandas													
	UBC 830	UBC 826	UBC 827	UBC 847	UBC 829	UBC 841	UBC 857	UBC 859	UBC 854	UBC 818	UBC 835			
Planta 1	2/4	3/7	2/4	3/5	3/5	1/5	7/7	1/3	2/5	1/4	2/6	11	27	49,09%
Planta 2	2/4	3/7	2/4	3/5	3/5	1/5	4/7	1/3	2/5	1/4	2/6	11	24	43,63%
Planta 3	2/4	3/7	2/4	4/5	3/5	1/5	7/7	1/3	0/5	1/4	2/6	10	26	47,27%
Planta 4	2/4	3/7	2/4	4/5	3/5	1/5	6/7	1/3	1/5	1/4	2/6	11	26	47,27%
Planta 5	2/4	3/7	2/4	4/5	3/5	1/5	7/7	1/3	1/5	1/4	2/6	11	31	56,36%
Planta 6	2/4	3/7	2/4	4/5	2/5	1/5	7/7	1/3	0/5	1/4	2/6	10	25	45,45%
Planta 8	0/4	0/7	0/4	0/5	0/5	0/5	0/7	0/3	3/5	0/4	0/6	1	3	5,45%
Planta 9	0/4	0/7	0/4	0/5	0/5	0/5	0/7	0/3	2/5	0/4	0/6	1	2	3,63%
Planta 10	0/4	0/7	0/4	0/5	0/5	0/5	1/7	0/3	2/5	0/4	0/6	2	3	5,45%
Planta 11	0/4	0/7	0/4	0/5	0/5	0/5	1/7	0/3	2/5	0/4	0/6	2	3	5,45%
Planta 12	0/4	0/7	0/4	0/5	0/5	0/5	1/7	0/3	0/5	0/4	0/6	1	1	1,81%

8.4 PERFIL MOLECULAR POR MARCADORES SSR

Os sete locos de SSR usados produziram um total de 25 alelos, com uma média de 3,5 alelos por loco. O tamanho dos alelos variou de 101 a 193 pares de bases (Tabela 5). Polimorfismos alélicos foram considerados quando um determinado alelo estava presente/ausente na planta matriz diploide, mas ausente/presente nas plantas poliploides sintéticas. Na figura 8 visualiza-se exemplos de perfis alélicos detectados nas plantas (diploide, triploide sintética e tetraploide sintética). No loco p473 foram detectados dois alelos (105 e 170 pb) na planta matriz diploide e em todas as plantas tetraploides. As plantas triploides, por sua vez, apresentaram apenas o alelo (105 pb). Esse resultado mostra que não ocorreu alteração do tamanho dos alelos nesse loco após o processo de poliploidização, mas o alelo (170 pb) foi aparentemente perdido nas plantas triploides.

O efeito de redução e/ou aumento no tamanho dos alelos ocorreu em todos os outros locos. No loco p484 a planta matriz diploide apresentou um único alelo (174 pb). Nas plantas triploides foi detectada uma redução de dois pares de bases nesse alelo (172 pb). Três plantas tetraploides apresentaram o mesmo alelo da planta matriz diploide (174 pb) e duas apresentaram o alelo (176 pb) com aumento de dois pares de bases. No loco p229 o alelo (148 pb) sofreu uma redução de 36 pares de bases nas plantas tetraploides.

O alelo 148 pb foi o único observado apenas na planta matriz diploide. Apenas dois alelos (101 e 155 pb) foram encontrados em todas as 12 plantas analisadas. O alelo 112 pb do loco p440 estava presente em todas as plantas triploides sintéticas, na planta matriz diploide e em uma das plantas tetraploides sintéticas. A planta matriz diploide apresentou dez alelos sendo três compartilhados com as plantas triploides e sete com as plantas tetraploides. Todas as plantas triploides apresentaram 13 alelos, sendo que dez correspondem a alelos novos. Uma pequena diferença entre as plantas triploides foi detectada no loco p60. O alelo (163 pb) não foi detectado nas plantas 4 e 5. Essas duas plantas foram as únicas a apresentarem o alelo com 167 pb. A planta tetraploide 11 apresentou oito alelos e em todas as outras plantas tetraploides foram detectados 11 alelos. Dois alelos

novos foram detectados nas plantas 8 e 11, quatro nas plantas 9 e 10, e três na planta 12 (Tabela 6).

Tabela 5. *Primers* de SSR utilizados para comparar a planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas, incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_a), fluorocromo usada na marcação do *primer* (F), número de alelos detectados (N_a), tamanho dos alelos em pares de base (T_{pb}).

<i>Primer</i> SSR	Sequencia (5'-3')	T_a °C	F	N_a	T_{pb}
p77F	*AAGGTCACGTAAACATACCG	56	FAM	2	182-193
p77R	AGGAGAAGCATGAGCATGTA				
p432F	*GTCTTCGTCGTCGTCATT	56	FAM	4	101-168-170-180
p432R	CAATATAGTCGCCTGTGTCTC				
p229F	*GAGGAAGTTTCCTGTACCAGT	50	HEX	5	112-148-152-158-186
p229R	GTGTACAGAGAGATGGCAAAG				
p440F	*GCAAACACTAGTGAAAGATGTC	50	HEX	5	112-130-160-183-191
p440R	CCAAACACTCACTGCTTTTAC				
p473F	*GAAACAATATCTCTCGTGTGC	59	FAM	2	105-170
p473R	GGTAGCTTCCGAGAAAACA				
p484F	*GCCTAGTCAATCTTGGACAAT	55	HEX	3	172-174-176
p484R	TTGTCATCGAGACTTATCTCC				
p60F	*TAGGAGTGGGGTTTCTATTTTC	57	HEX	4	153-155-163-167
p60R	CGTTACAGCTTGGTTAGAATG				

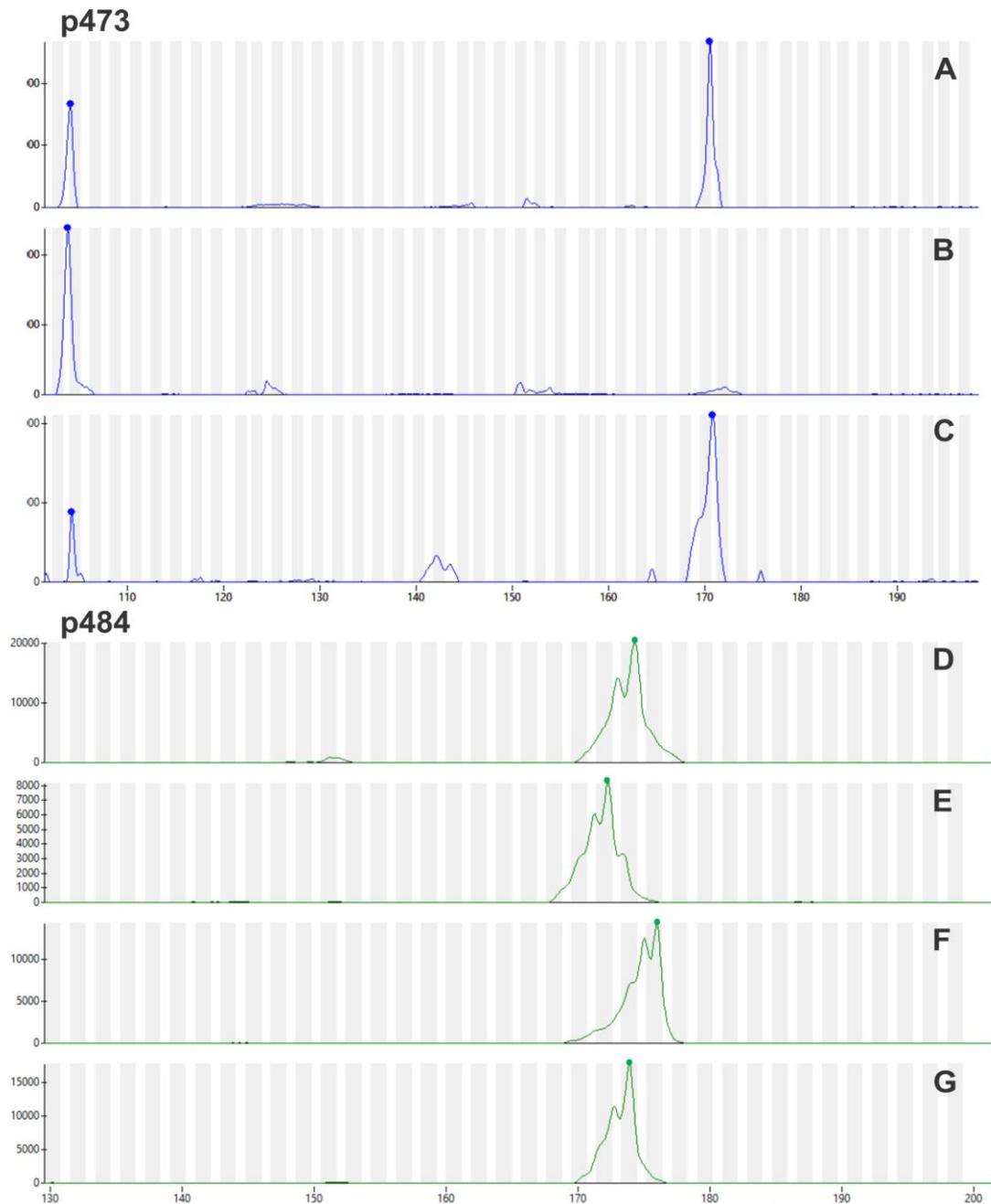


Figura 8. Eletroferogramas representativos dos locos p473 e p484. Loco p473 – (A) planta matriz diploide: dois alelos (105 e 170 pb), (B) planta triploide sintética: um alelo (105 pb), (C) planta tetraploide sintética: dois alelos (105 e 170 pb). Loco p848 – (D) planta matriz diploide: um alelo (174 pb), (E) planta triploide sintética: um alelo (172 pb), (F) planta tetraploide sintética: um alelo (176 pb), (G) planta tetraploide sintética: um alelo (174 pb). O eixo y indica a intensidade de fluorescência e o eixo x indica o tamanho dos alelos em pares de bases.

Tabela 6. Distribuição alélica de sete locos de microssatélites entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas. Plantas 1 a 6 (triploides sintéticas), planta 7 (diploide matriz), plantas 8 a 12 (tetraploides sintéticas).

Loco	Alelo	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	Planta 6	Planta 7	Planta 8	Planta 9	Planta 10	Planta 11	Planta 12
p77	182	X	X	X	X	X	X						
	193							X	X	X	X		X
p432	101							X	X	X	X	X	X
	168	X	X	X	X	X	X						
p229	170							X	X	X	X	X	X
	180	X	X	X	X	X	X						
p440	112								X	X	X		X
	148							X					
p473	152	X	X	X	X	X	X						
	158							X	X	X	X		X
p484	186	X	X	X	X	X	X						
	112	X	X	X	X	X	X	X	X				
p60	130									X	X	X	X
	160								X	X	X	X	X
p473	183	X	X	X	X	X	X						
	191	X	X	X	X	X	X						
p484	105	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	170							X	X	X	X	X	X
p60	172	X	X	X	X	X	X						
	174							X	X			X	X
p60	176									X	X		
	153	X	X	X	X	X	X						
p60	155	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	163	X	X	X			X						
p60	167				X	X							

8.5 SIMILARIDADE GENÉTICA

A partir das matrizes de similaridade genética, obtidas pelo coeficiente de Jaccard gerado por meio dos dados de ISSR e SSR, construiu-se um dendrograma para cada um dos marcadores (Figura 9). Os coeficientes de similaridade variaram de 0,46 a 0,98, com média de 0,68 para os dados de ISSR e de 0,08 a 1, com média de 0,47 para os dados de SSR. Com base na similaridade média dois grupos foram formados.

No dendrograma obtido com os dados de ISSR (Figura 9A), observa-se no grupo 1 a planta matriz diploide e as plantas tetraploides sintéticas com variação de similaridade de 0,92 a 0,97 entre os indivíduos do grupo, e similaridade média de 0,93. O grupo 2 é composto pelas plantas triploides sintéticas e o coeficiente de similaridade entre os indivíduos do grupo variou de 0,8 a 0,98, com similaridade média do grupo de 0,91. Considerando todas as plantas analisadas, o menor valor de similaridade (0,46) foi observado entre plantas tetraploides e triploides e o maior (0,98) foi observado entre as plantas triploides.

No dendrograma obtido com os dados de SSR (Figura 9B) no grupo 1 observou-se a planta matriz diploide e as plantas tetraploides sintéticas com coeficiente de similaridade variando de 0,6 a 0,64 entre os indivíduos do grupo e com similaridade média de 0,63. O grupo 2, composto pelas plantas triploides sintéticas, apresentou coeficiente de similaridade igual a 1 entre todos os indivíduos do grupo. Considerando todas as plantas, o menor valor de similaridade genética (0,08) foi observado entre as plantas triploides e as plantas tetraploides e o maior (1,0) foi observado entre as plantas triploides.

A similaridade média calculada com os dados de ISSR entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas foi de 0,93 considerando as plantas tetraploides e de 0,49 considerando as plantas triploides. Os dados de SSR mostraram uma similaridade média de 0,63 entre a planta matriz diploide e as plantas tetraploides e de 0,14 entre a planta matriz diploide e as plantas triploides.

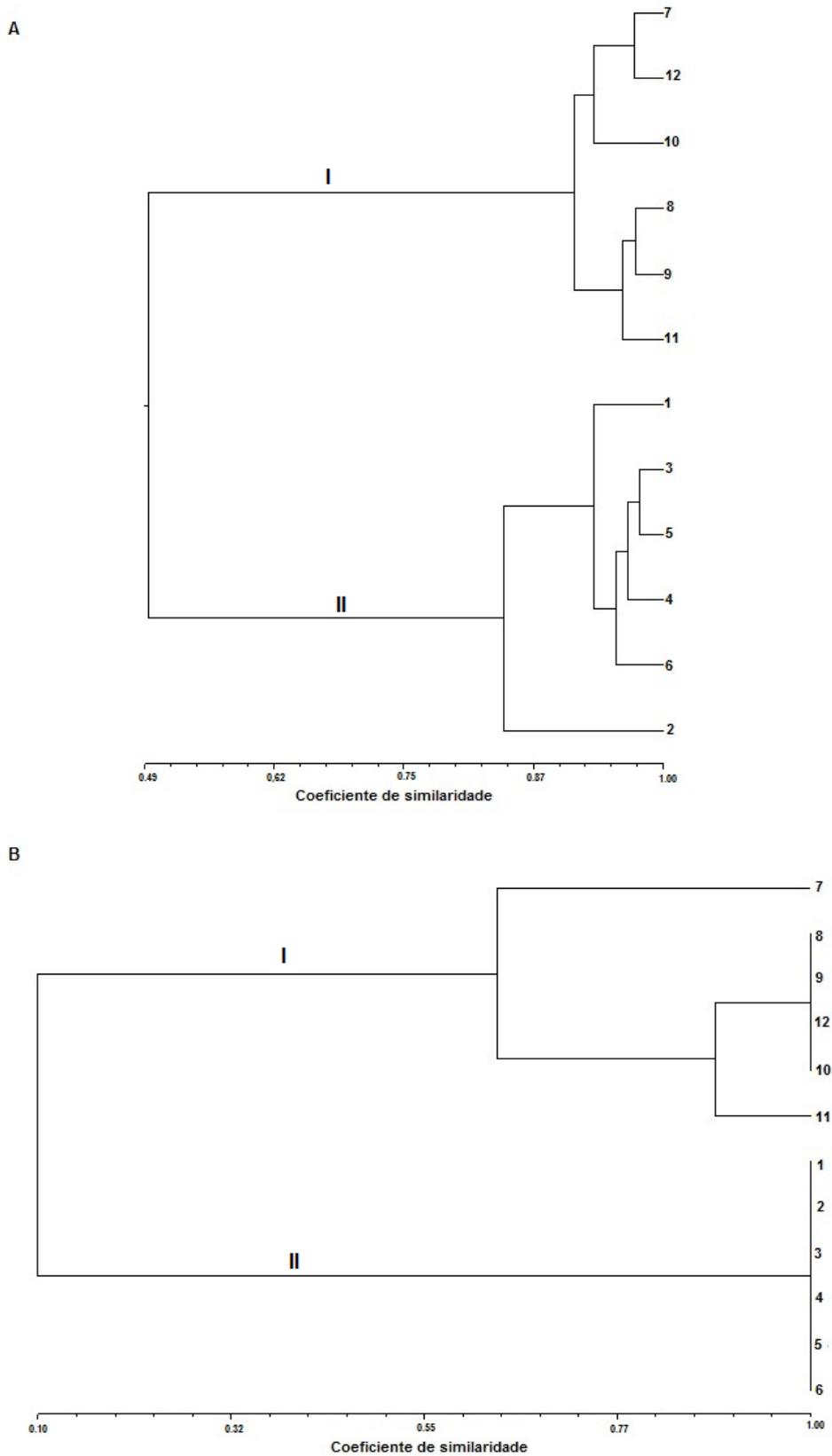


Figura 9. Dendrogramas de similaridade genética por UPGMA com coeficientes Jaccard de 12 acessos de *L. alba*. 1-6 plantas triploides sintéticas, 7 planta matriz diploide, 8-12 plantas tetraploides sintéticas. (A) Dendrograma obtido a partir dos dados de 11 *primers* de ISSR. (B) Dendrograma obtido a partir dos dados de 7 *primers* de SSR.

8.6 PERFIL DO DE ÓLEO ESSENCIAL

A microextração de óleo essencial de *L. alba* com o solvente hexano possibilitou a identificação dos componentes majoritário do óleo essencial das plantas poliploides sintéticas. Os principais constituintes detectados na análise do óleo essencial por meio da cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa foram o citral (neral + geranial) e linalol. No anexo A são apresentados todos os constituintes detectados na análise. A figura 10 mostra o percentual de neral e linalol na planta matriz diploide, nas plantas triploides e tetraploides sintéticas. O óleo essencial da planta matriz diploide apresentou 77,51% de citral. Todas as plantas tetraploides sintéticas produziram citral como componente majoritário, com o percentual variando de 52,71 a 77,04%. O componente citral também foi detectado no óleo essencial de algumas plantas triploides sintéticas mas não como componente majoritário. O constituinte linalol, por outro lado, foi detectado como componente majoritário em todas as plantas triploides sintéticas. O percentual de linalol no óleo essencial dessas plantas variou de 20,3 a 54,13%. Este constituinte foi detectado em apenas uma planta tetraploide sintética (planta 10) que apresentou baixo percentual de linalol (2,82%) na composição de seu óleo essencial.

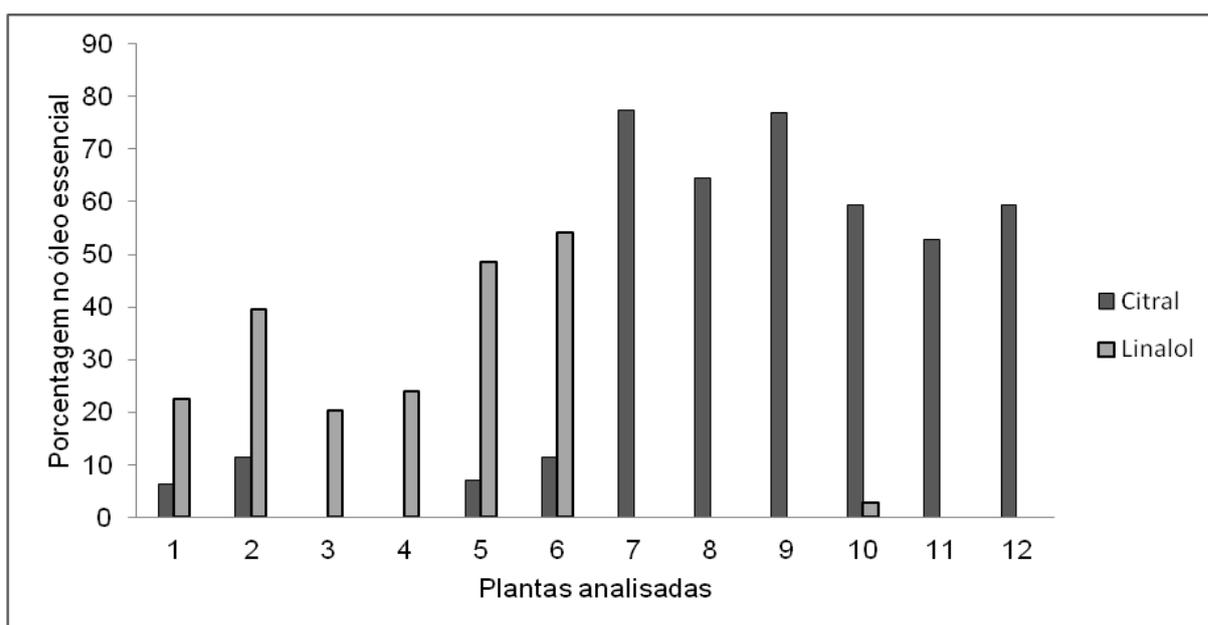


Figura 10. Gráfico representativo do percentual de citral e linalol detectados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa na planta matriz diploide (7), nas plantas triploides sintéticas (1-6) e nas plantas tetraploides sintéticas (8-12).

9 DISCUSSÃO

9.1 ESTABILIDADE DO NÍVEL DE PLOIDIA

O nível da ploidia de plantas poliploides sintéticas deve ser periodicamente verificado para garantir a manutenção de plantas poliploides estáveis (VÄINÖLÄ, 2000; HARBARD et al, 2012; BLASCO et al., 2015). A estabilidade da ploidia de tetraploides sintéticos de *L. alba* foi confirmada em plantas com aproximadamente três anos de idade estabelecidas em casa de vegetação. Dois órgãos vegetais (folha e raiz) foram usados na análise de citometria de fluxo para eliminar qualquer hipótese de ocorrência de quimeras setoriais nas plantas tetraploides sintéticas. Os 60 cromossomos e os doze sítios de DNAr 45S observados nas metáfases das plantas tetraploides confirmam os resultados obtidos por meio da citometria de fluxo. Tetraploides sintéticos estáveis foram relatados em *Eriobotrya japonica* (BLASCO et al., 2015) e em *Rhododendron* (VÄINÖLÄ, 2000). Por outro lado, instabilidade da ploidia de plantas tetraploides sintéticas foi observada em *Acacia mangium*. Duas plantas tetraploides foram reclassificadas como diploides e duas como mixoploides após a transferência das plantas da casa de vegetação para o campo (HARBARD et al, 2012). Estes resultados revelam que a resposta ao processo de duplicação pode variar entre espécies e, provavelmente, em função dos procedimentos de produção das plantas sintéticas e da manutenção das mesmas.

Vanstechelman et al. (2010) sugerem que as plantas poliploides sintéticas sejam reanalisadas após o procedimento de micropropagação *in vitro*. De acordo com os autores muitas quimeras setoriais não são detectadas em uma primeira análise de ploidia e, portanto, plantas, inicialmente, classificadas como tetraploides podem ser quimeras setoriais. A estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo de raízes em tetraploides sintéticos de *Spathiphyllum wallisii* mostrou que algumas plantas tetraploides apresentaram células diploides e/ou mixoploides nas raízes. Quimeras setoriais também foram observadas em plantas tetraploides sintéticas de *Centella asiatica*, inicialmente confirmadas por meio da estimativa da

quantidade de DNA em folhas e contagem cromossômica em meristemas radiculares. Dois ciclos de multiplicação resultaram em plantas tetraploides, diploides e mixoploides (KAENSAKSIRI et al., 2011). As plantas tetraploides sintéticas de *L. alba*, analisadas nesse trabalho, foram micropropagadas antes da aclimatização (RIBEIRO, 2015). A análise de citometria de fluxo em folhas e raízes não identificou ploidias diferentes nas plantas analisadas, descartando a possibilidade de ocorrência quimeras setoriais.

Uma consequência comum dos tratamentos de indução de poliploidia em plantas é a ocorrência de mixoploidia. As plantas mixoploides são consideradas subprodutos indesejados nos procedimentos de indução de poliploides (KANCHANAPOOM e KOARAPATCHAIKUL, 2012; REGALADO et al., 2017; SALMA et al., 2017). Alguns pesquisadores optam por descartar as plantas mixoploides devido à instabilidade da ploidia dessas plantas (CARVALHO et al., 2005; PRAÇA et al., 2009; VIEHMANNOVÁ et al., 2009; HANNWEG et al., 2013; JAVADIAN et al., 2017). A instabilidade das plantas mixoploides resulta da competição entre as células originais e as poliploides (REGALADO et al., 2017). A taxa de proliferação das células diploides é normalmente maior do que das células poliploides (ALLUM et al., 2007) o que pode resultar na conversão das plantas mixoploides para a condição diploide.

Poucos trabalhos investigam a estabilidade das plantas mixoploides. Em *Rhododendron* a maioria das plantas mixoploides manteve a condição de mixoploidia, um terço retornou ao estado diploide e apenas uma planta tornou-se tetraploide (VÄINÖLÄ, 2000). A conversão de plantas mixoploides à condição diploide e tetraploide também foi relatada em *Acacia mangium* (HARBARD et al., 2012). Plantas mixoploides estáveis foram relatadas na espécie *Spathiphyllum wallisii* após micropropagação *in vitro* (VANSTECHELMAN et al., 2010).

As plantas mixoploides obtidas em *L. alba* e utilizadas no presente trabalho, apresentaram células diploides e tetraploides inicialmente após o tratamento de indução. Essas plantas foram micropropagadas, aclimatizadas e estabelecidas em casa de vegetação (RIBEIRO, 2015). Após 18 meses essas plantas, estabelecidas em casa de vegetação, foram analisadas por citometria de fluxo para investigar a estabilidade da ploidia. Um resultado surpreendente foi observado. As plantas que eram mixoploides com células diploides e tetraploides

apresentaram um único pico em G1. A quantificação do conteúdo de DNA dessas plantas e a análise de ploidia mostrou que as plantas apresentavam quantidade de DNA compatíveis com aquela observada em triploides naturais. As análises de citometria de fluxo foram realizadas periodicamente (a cada 6 meses) para confirmar a estabilidade da ploidia observada (triploide). A triploidia foi detectada em análises de citometria de fluxo tanto em folhas como em raízes. Esses resultados excluem possíveis quimeras de ploidia nessas plantas. A contagem cromossômica em metáfases de meristemas radiculares permitiu observar $2n=45$ cromossomos com nove sítios de DNAr 45S confirmando os resultados observados pela citometria de fluxo.

O surgimento dessas plantas triploides a partir de mixoploides (diploide/tetraploide) é uma incógnita. Uma hipótese foi formulada para tentar explicar o surgimento dessas plantas. A separação das gemas axilares para a micropropagação das plantas mixoploides exigiria uma alta taxa de multiplicação das células (diploides e tetraploides). Durante esse processo as células tetraploides teriam perdido um conjunto cromossômico (15 cromossomos). Possivelmente estas células adquiriram alguma vantagem em relação às células diploides. Um aspecto interessante dessa conversão de mixoploidia em triploidia que ocorreu nas plantas sintéticas é a ocorrência de acessos triploides e mixoploides naturais em *L. alba*. Os mixoploides naturais possuem células $2n$ com número cromossômico variando de 12 a 60, porém células com número cromossômico próximo a 45 foram observadas com maior frequência (PIERRE et al., 2011; REIS et al., 2014). Esses resultados nos levam a pensar que a estabilidade da triploidia em *L. alba* pode estar sob controle genético.

Em aloploiploides a eliminação de cromossomos e de conjunto cromossômico é um evento bastante comum. As possíveis e principais causas desta eliminação cromossômica são a inativação de centrômeros, a formação de fuso multipolar, falhas durante o ligamento das fibras do fuso ao cinetócoro e a ocorrência de não disjunção cromossômica na anáfase impedindo a correta separação das cromátides (ISHII et al., 2016; DOS REIS et al., 2016). Um ou mais desses erros de divisão celular podem ser responsáveis pela formação das plantas triploides obtidas nesse trabalho. Curioso é a perda de um conjunto cromossômico que corresponde ao número de cromossomos do conjunto haploide de um diploide natural.

Embora não seja um evento comum, há relatos do surgimento de plantas triploides a partir de tratamentos de indução de tetraploidia. Em *Pyrus communis*, plantas triploides foram obtidas pelo tratamento *in vitro* de explantes foliares com colchicina (SUN et al., 2009). O tratamento de meristemas apicais com colchicina gerou plantas triploides em álamo (EWALD et al., 2009). Plântulas germinadas de *Rosa chinensis* tratadas com trifluralina originaram plantas triploides e aneuploides (3x-1) (ZLESÁK et al., 2005). Nenhum dos autores citados acima apresentou explicação para o surgimento das plantas triploides obtidas nos tratamentos de indução de tetraploidia.

9.2 REORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Os eventos de reorganização do genoma após a poliploidização incluem perda de sequências de DNA, amplificação ou compactação de sequências repetitivas, deleção, inserção, inversão, duplicação e translocação de segmentos cromossômicos (TAYALÉ e PARISOD, 2013).

Nesse trabalho, dois marcadores moleculares, ISSR e SSR, foram usados para comparar a sequência genômica da planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas. Os 11 *primers* de ISSR detectaram um alto percentual de polimorfismos (43,63 a 56,36 %) entre a planta matriz diploide e as plantas triploides sintéticas. A comparação entre a planta matriz diploide e as plantas tetraploides sintéticas mostrou uma taxa de polimorfismo variando de 1,81 a 5,45 %. Esses polimorfismos são em sua maioria pela presença de fragmentos nas plantas poliploides sintéticas que não foram observados na planta matriz diploide. A poliploidização induzida por colchicina também resultou em alterações no tamanho dos alelos de microssatélite quando comparados à planta matriz diploide. O surgimento de novos alelos ocorreu nas plantas triploides e tetraploides. Em média, 77% dos alelos detectados nas plantas triploides correspondem a alelos novos. Nas plantas tetraploides o percentual de alelos novos variou de 18 a 36%.

Os polimorfismos detectados com os marcadores ISSR e o surgimento de alelos novos nas plantas poliploides sintéticas podem ser considerados como

decorrente do evento de poliploidização, uma vez que este evento é o único diferencial entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas. As plantas triploides apresentaram maior taxa de polimorfismo com os marcadores ISSR e maior número de alelos de microssatélites novos do que as plantas tetraploides. Esse resultado pode ser consequência da eliminação de um conjunto cromossômico combinado com o choque genômico resultante do evento de poliploidização. A permanência de um conjunto triploide, naturalmente mais instável do que plantas com número par de cromossomos, pode também auxiliar na explicação deste resultado.

Assim como foi observado em *L. alba*, a poliploidização induzida com antimetabólitos causou um percentual considerável de reorganização genômica em outras espécies. Na espécie *Chrysanthemum lavandulifolium*, a análise com marcadores SRAP mostrou que a reorganização genômica após a poliploidização resultou em 1,1% de perda de fragmentos da planta parental e 1,6% de surgimento de novos fragmentos. Em *Paspalum notatum* os marcadores RAPD e AFLP permitiram detectar 9,20 e 9,90% de modificações genéticas (respectivamente) após a poliploidização. A frequência de perda de bandas da planta matriz diploide foi significativamente superior ao ganho de novas bandas (MARTELOTTO et al., 2007). Na espécie *Citrullus lanatus* a poliploidização resultou em aproximadamente 40% de locos polimórficos com os marcadores ISSR e SRAP (WANG et al., 2009).

Um resultado interessante sobre reorganização genômica foi observado em *Eragrostis curvula*. Sucessivas mudanças no nível de ploidia foram acompanhadas de rápidas modificações genéticas detectadas por marcadores RAPD e AFLP. Quatro genótipos da espécie com material genético comum e diferentes níveis de ploidia foram usados para investigar modificações genéticas decorrentes da poliploidização. A série de genótipos consistiu de uma planta tetraploide, uma planta dihaploide (obtida após cultura *in vitro* de inflorescências imaturas da planta tetraploide) e duas plantas tetraploides (obtidas após tratamento de sementes da planta dihaploide com colchicina). O percentual de 29,77% de polimorfismos genômicos detectado entre os genótipos foi considerado resultado do evento de poliploidização. Um número significativo de marcadores moleculares mostrou um comportamento reversível após as sucessivas mudanças de ploidia. De acordo com os autores, a estrutura genética da planta tetraploide original foi

recuperada quando a tetraploidia foi restaurada, e, portanto, as estruturas genéticas das plantas eram típicas de uma determinada ploidia (MECCHIA et al., 2007).

Em oposição aos resultados observados em *L. alba* e nas outras espécies citadas acima, a poliploidização induzida não acarretou reorganização genômica nas espécies *Solanum commersonii*, *Solanum bulbocastanum* e em *Citrus limonia*. Aversano et al. (2013; 2015) usaram marcadores SSR e ISSR para analisar as espécies *Solanum commersonii* e *Solanum bulbocastanum*. Em nenhuma das espécies os locos testados (SSR e ISSR) mostraram polimorfismos entre a planta parental diploide e as plantas tetraploides sintéticas. De acordo com os autores os resultados revelam que alterações estruturais devidas à duplicação cromossômica não afetaram o genoma de ambas as espécies nos locos analisados. Resultado semelhante foi observado em *Citrus limonia*. A análise da constituição genética de genótipos diploides e tetraploides sintéticos foi comparada também usando marcadores moleculares SSR. Os resultados mostraram que os perfis de marcadores eram idênticos entre genótipos (ALLARIO et al., 2011).

Em função do alto percentual de polimorfismo genético observado, em *L. alba*, entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas detectados com os marcadores ISSR e SSR, a análise de agrupamento UPGMA foi realizada para averiguar a similaridade genética entre as plantas. A planta matriz diploide foi agrupada com as plantas tetraploides, sendo que e as plantas triploides formaram um grupo separado. Resultado semelhante foi observado na análise de acessos naturais triploides de *L. alba* na qual a análise de similaridade genética reuniu todos os acessos triploides em um mesmo grupo (LOPES, 2015).

A comparação da similaridade genética entre a planta matriz diploide e as plantas tetraploides e triploides mostrou que as plantas triploides são mais divergentes geneticamente da planta matriz diploide. Esse resultado pode ser consequência dos rearranjos genômicos que ocorreram em função da eliminação de um conjunto cromossômico que culminou na formação das plantas triploides. O valor de similaridade média de 0,91 obtido com os dados de ISSR e de 1,0 obtido com os dados de SSR indica que as seis plantas triploides analisadas nesse trabalho são provenientes de um mesmo evento de poliploidização. Os procedimentos de repicagem e de aclimatização podem ter contribuído para a seleção de plantas mais estáveis na nova condição triploide.

9.3 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

O método convencional de extração de óleo essencial por meio da hidrodestilação geralmente demanda uma alta quantidade de massa foliar, em torno de 10 gramas. Quando pouca massa foliar está disponível, o solvente hexano torna-se uma alternativa rápida e eficiente para extrair óleos essenciais. Silva et al. (2010) compararam as técnicas de extração de óleo essencial por hidrodestilação e fração hexânica em seis espécies de Verbenaceae. Os autores detectaram poucas diferenças entre a composição do óleo essencial hidrodestilado e aquela observada após a extração utilizando a fração hexânica. De acordo os autores, a análise da fração hexânica pode ser utilizada, como alternativa, para analisar os compostos voláteis do óleo essencial. A análise da microextração do óleo essencial de *L. alba* com hexano realizada neste trabalho resultou nos mesmos constituintes majoritários relatados por Viccini et al. (2014) que utilizaram a hidrodestilação como método de extração de óleo essencial.

A análise do metabolismo de plantas autoploidoides sugere que a poliploidia pode causar alterações tanto qualitativa como quantitativa, resultado de alterações nos mecanismos que regulam a biossíntese de compostos individuais. A atividade metabólica pode ser aumentada através da expressão alterada dos genes, o que leva a alterações na concentração de metabólitos secundários (FASANO et al., 2016). Evidências do impacto da duplicação genômica nos perfis metabólicos de diferentes espécies têm sido relatadas em diversos estudos (CARUSO et al., 2011; DEGHAN et al., 2012; TROJAK-GOLUCH e SKOMRA, 2013; XU et al., 2014; GOMES et al., 2014; TAVAN et al., 2015; IANNICELLI et al., 2016).

Iannicelli et al. (2016) avaliaram o efeito da poliploidização na produção de óleo essencial de *Lippia integrifolia*. A composição do óleo essencial foi qualitativamente similar, mas mostrou diferenças quantitativas. O conteúdo de monoterpenos foi de 23% na planta matriz diploide e 45,2% nas plantas tetraploides. Gomes et al. (2014) também relataram alteração quantitativa na produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* com aumento de 50% nas plantas tetraploides em comparação às diploides. Em *Thymus persicus* a poliploidia resultou em aumento de até 140,67% no conteúdo de triterpenoides. De acordo com os autores, os

resultados indicam que esta característica fitoquímica é fortemente influenciada pelo nível de ploidia da planta (TAVAN et al., 2015). Por outro lado, em *Humulus lupulus* o conteúdo total de óleo essencial foi significativamente mais baixo nos tetraploides do que nos diploides. No entanto, houve aumento significativo na proporção de alguns componentes do óleo essencial como humuleno e limoneno (TROJAK-GOLUCH e SKOMRA, 2013).

Os poliploides sintéticos de *L. alba* não apresentaram alterações nos componentes majoritários do óleo essencial quando comparados a aqueles observados nas plantas naturais. As plantas tetraploides sintéticas apresentaram o mesmo composto majoritário da planta matriz diploide (cital) e as plantas triploides, por sua vez, apresentaram o linalol como composto majoritário. As plantas analisadas nesse trabalho, diploide, triploide e tetraploide têm o mesmo material genético básico diferindo apenas na dosagem gênica. Assim, a alteração qualitativa do perfil metabólico observado nas plantas triploides pode ser interpretada como alterações dos mecanismos metabólicos que regulam a biossíntese desses compostos em função da mudança de ploidia.

Os resultados do presente trabalho corroboram os achados de Viccini et al. (2014) que relataram uma associação entre o nível de ploidia e o perfil químico em acessos naturais de *L. alba*. Dos 37 acessos analisados, 11 eram triploides e apresentaram um alto percentual de linalol (46,50-79,27%) e baixo percentual de citral. Os 26 acessos restantes, 16 diploides e 10 tetraploides, apresentaram-se ricos no componente citral (44,51-90,00%) e com baixo teor de linalol.

Os dois resultados, com as plantas naturais (Viccini et al., 2014) e sintéticas, quando avaliados conjuntamente, sugerem fortemente que a mudança no nível de ploidia leva a uma alteração na biossíntese dos constituintes do óleo essencial. Os resultados observados por Viccini et al. (2014), embora fosse homogêneo, considerando que todos os triploides apresentaram o mesmo perfil químico, foram observados em genótipos diferentes. Os resultados aqui observados envolvem plantas com mesmo *background* genético uma vez foram obtidas por duplicação cromossômica e reforçam a contribuição da alteração do nível de ploidia para que haja alteração na via de formação dos componentes do óleo essencial. Fatos como esse não foram até o momento relatados na literatura o que torna *L. alba* um modelo único para se estudar a influência do tamanho do genoma na

produção de constituintes químicos, abrindo novas possibilidades de obtenção e uso dos mesmos.

10 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostram a plasticidade e a adaptação genômica da espécie *L. alba* diante de diferentes tipos de estresse. Diferentes acessos da espécie, representando os cinco números cromossômicos relatados para espécie, foram investigados em relação à estabilidade genômica sob condições de longo período de cultivo *in vitro* (7 anos), situação considerada estressante em função das condições da cultura de tecidos. Nove dos 22 acessos analisados sofreram redução no tamanho do genoma. Os marcadores moleculares ISSR permitiram detectar polimorfismos de sequência de nucleotídeos em 19 acessos. O percentual de polimorfismo variou de 1,61 a 33,87%. Essa variação na taxa de polimorfismo e a ausência de polimorfismo em alguns acessos indica que os acessos responderam diferentemente às condições de cultivo *in vitro*.

A estabilidade genômica da espécie também foi investigada sob outra condição de estresse, o choque genômico causado pela poliploidização. A análise da estabilidade da ploidia das plantas que passaram pelo procedimento de indução de poliploida (plantas tetraploides e mixoploides) mostrou que as plantas tetraploides mantiveram a estabilidade da ploidia após três anos. Por outro lado, o resultado das análises de ploidia em folha e raiz das plantas mixoploides mostrou que essas plantas têm um conteúdo de DNA correspondente a plantas triploides. A contagem cromossômica confirmou a presença de quatro genomas (60 cromossomos) nas plantas tetraploides e três genomas (45 cromossomos) nas plantas triploides.

A comparação do genoma da planta matriz diploide com as plantas poliploides sintéticas por meio de marcadores ISSR e SSR mostrou que as plantas poliploides sintéticas estão passando pelo processo de reorganização genômica. Os marcadores detectaram maior nível de reorganização genômica nas plantas triploides do que nas tetraploides, possivelmente consequência da eliminação de um conjunto cromossômico que culminou na formação das plantas triploides. Essas plantas, portanto, apresentaram menor similaridade genética com a planta matriz diploide.

A comparação do perfil químico entre a planta matriz diploide e as plantas poliploides sintéticas revelou similaridade no perfil químico das plantas tetraploides sintéticas e da planta matriz diploide, ambas apresentando o citral como

componente majoritário. Uma alteração qualitativa no perfil químico foi observada nas plantas triploides, quando comparadas à planta matriz diploide. As plantas triploides apresentaram o linalol como componente majoritário evidenciando a influência do nível de ploidia na biossíntese dos constituintes do óleo essencial.

A instabilidade genômica detectada em acessos de *L. alba* após sete anos de cultura *in vitro* pode ser devido à consequência da instabilidade genômica natural da espécie combinada com o fator de estresse, cultura *in vitro* a longo prazo. A conversão das plantas mixoploide à condição triploide, a reorganização genômica detectada com os marcadores ISSR e SSR e a alteração qualitativa no perfil químico das plantas triploides podem ser interpretados como resultante dos efeitos da poliploidização, uma vez que o número de genomas é o único fator que diferencia a planta matriz diploide das plantas poliploides sintéticas.

Assim, pode-se concluir:

- A redução do tamanho do genoma e os polimorfismos dos marcadores ISSR observados em alguns acessos indicam que o cultivo *in vitro* de longo prazo, provavelmente associado à instabilidade natural do genoma de *L. alba*, pode provocar variação genômica na espécie;
- Plantas tetraploides sintéticas de *L. alba* mantiveram o nível de ploidia estável após três anos do tratamento de indução de poliploidia;
- A conversão das plantas mixoploides sintéticas para triploidia resultou em estabilidade da ploidia triploide no período de 18 meses de análise;
- Plantas poliploides sintéticas de *L. alba* apresentaram alterações genômicas nos marcadores ISSR e SSR indicando a ocorrência de reorganização genômica em função da poliploidização;
- A semelhança do perfil químico entre acessos de *L. alba* naturais e sintéticos reforçam a hipótese de associação do nível de ploidia com o perfil químico na espécie.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4 ed. Carol Stream: Allured, 2007.

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.

AGARWAL, T.; GUPTA, A. K.; PATEL, A. K.; SHEKHAWAT, N. S. Micropropagation and validation of genetic homogeneity of *Alhagi maurorum* using SCoT, ISSR and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 120, n. 1, p. 313-323, 2015.

ALAN, A. R.; ZENG, H.; ASSANI, A.; SHI, W. L.; MCRAE, H. E.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Assessment of genetic stability of the germplasm lines of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huangqin) in long-term, in vitro maintained cultures. *Plant Cell Reports*, v. 26, n. 8, p. 1345-1355, 2007.

ALLARIO, T. et al. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 8, p. 2507–2519, 2011.

ALLUM, J. F.; BRINGLOE, D. H.; ROBERTS, A. V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Reports*, v. 26, n. 11, p. 1977-1984, 2007.

ARIF, I. A.; BAKIR, M. A.; KHAN, H. A.; AL FARHAN, A. H.; AL HOMAIDAN, A. A.; BAHKALI, A. H.; SHOBRAK, M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 5, p. 2079-2096, 2010.

ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Concentrações de BAP sobre a proliferação in vitro de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) NE Brown]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. spe, p. 149-153, 2012.

AVERSANO, R.; CARUSO, I.; ARONNE, G.; DE MICCO, V.; SCOGNAMIGLIO, N.; CARPUTO, D. Stochastic changes affect *Solanum* wild species following autopolyploidization. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 2, p. 625-635, 2013.

AVERSANO, R.; ERCOLANO, M. R.; CARUSO, I.; FASANO, C.; ROSELLINI, D.; CARPUTO, D. Molecular tools for exploring polyploid genomes in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 8, p. 10316-10335, 2012.

AVERSANO, R.; SCARANO, M. T.; ARONNE, G.; CARUSO, I.; D'AMELIA, V.; DE MICCO, V.; FASANO, C.; TERMOLINO, P.; CARPUTO, D. Genotype-specific

changes associated to early synthesis of autotetraploids in wild potato species. *Euphytica*, v. 202, n. 2, p. 307-316, 2015.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.

BAIRU, M. W.; FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv.'Zelig'). *Scientia Horticulturae*, v. 108, n. 4, p. 347-351, 2006.

BATISTA, D. S. et al. Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 52, n. 3, p. 276-282, 2016.

BATISTA, D. S. et al. Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 128, n. 2, p. 357-368, 2017.

BHATIA, R.; SINGH, K. P.; SHARMA, T. R.; JHANG, T. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, n. 1, p. 131-135, 2011.

BICKMORE, W. A. Karyotype analysis and chromosome banding. *Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-7, 2001.

BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. P. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, v. 23, n. 3, p. 415-420, 2015.

BLANK, A. F. et al. Chemical diversity in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown germplasm. *The Scientific World Journal*, v. 2015, p. 1-11, 2015.

BLASCO, M.; BADENES, M. L.; NAVAL, M. M. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 2, n. 120, p. 453-461, 2015.

BOROKINI, T. I. The state of ex-situ conservation in Nigeria. *International journal of conservation science*, v. 4, n. 2, 2013.

CAMÊLO, L. C. A. Caracterização de germoplasma e sazonalidade em ervacideira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

CAMPOS, V. R. Biologia reprodutiva em acessos de *Lippia alba* (MILL.) N.E. Brown (Verbenaceae) 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

CAO, Z.; SUI, S.; CAI, X.; YANG, Q.; DENG, Z. Somaclonal variation in 'Red Flash' caladium: morphological, cytological and molecular characterization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 126, n. 2, p. 269-279, 2016.

- CARMONA-MARTÍN, E.; REGALADO, J. J.; RAGHAVAN, L.; ENCINA, C. L. In vitro induction of autooctoploid asparagus genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 121, n. 1, p. 249-254, 2015.
- CARUSO, I.; LEPORE, L.; DE TOMMASI, N.; DAL PIAZ, F.; FRUSCIANTE, L.; AVERSANO, R.; GARRAMONE, R.; CARPUTO, D. Secondary metabolite profile in induced tetraploids of wild *Solanum commersonii* Dun. *Chemistry and Biodiversity*, v. 8, n. 12, p. 2226-2237, 2011.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. *Heredity*, v. 70, p. 515-519, 1993.
- CARVALHO, J. F. R.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C., In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 80, n. 1, p. 69-75, 2005.
- CASSELLS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 64, n. 2-3, p. 145-157, 2001.
- CHEN, Z. J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science*, v. 15, n. 2, p. 57-71, 2010.
- CHIES, C. E.; BRANCO, C. S.; SCOLA, G.; AGOSTINI, F.; GOWER, A. E.; SALVADOR, M. Antioxidant effect of *Lippia alba* (Miller) NE Brown. *Antioxidants*, v. 2, n. 4, p. 194-205, 2013.
- COHEN, H.; FAIT, A.; TEL-ZUR, N. Morphological, cytological and metabolic consequences of autopolyploidization in *Hylocereus* (Cactaceae) species. *BMC Plant Biology*, v. 13, n. 1, p. 173, 2013.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 11, p. 836-846, 2005.
- COSTA, R. et al. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP molecular markers to reveal and classify Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm variations. *Plos One*, v. 11, n. 4, p. 1-15, 2016.
- CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, v. 2, n. 2, p. 73-95, 2013.
- CURRAIS, L.; LOUREIRO, J.; SANTOS, C.; CANHOTO, J. M. Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 114, n. 2, p. 149-159, 2013.
- DAI, F.; WANG, Z.; LUO, G.; TANG, C. Phenotypic and transcriptomic analyses of autotetraploid and diploid mulberry (*Morus alba* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 9, p. 22938-22956, 2015.

DANN, A. L.; WILSON, C. R. Comparative assessment of genetic and epigenetic variation among regenerants of potato (*Solanum tuberosum*) derived from long-term nodal tissue-culture and cell selection. *Plant Cell Reports*, v. 30, n. 4, p. 631-639, 2011.

DAR, T. H.; RAINA, S. N.; GOEL, S. Molecular analysis of genomic changes in synthetic autotetraploid *Phlox drummondii* Hook. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 110, n. 3, p. 591-605, 2013.

DE LA PUENTE, R.; GONZÁLEZ, A. I.; RUIZ, M. L.; POLANCO, C. Somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 44, n. 5, p. 419-426, 2008.

DE STORME, N.; MASON, A. Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology*, v. 1, p. 10-33, 2014.

DEHGHAN, E.; HÄKKINEN, S. T.; OKSMAN-CALDENTY, K. M.; AHMADI, F. S. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in vitro hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 110, n. 1, p. 35-44, 2012.

DEL POZO, J. C.; RAMIREZ-PARRA, E. Whole genome duplications in plants: an overview from *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 22, p. 6991-7003, 2015.

DEVI, S. P.; KUMARIA, S.; RAO, S. R.; TANDON, P. Single primer amplification reaction (SPAR) methods reveal subsequent increase in genetic variations in micropropagated plants of *Nepenthes khasiana* Hook. f. maintained for three consecutive regenerations. *Gene*, v. 538, n. 1, p. 23-29, 2014.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. A. N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, 2007.

DOS REIS, G. B.; ISHII, T.; FUCHS, J.; HOUBEN, A.; DAVIDE, L. C. Tissue-specific genome instability in synthetic interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* (Napier grass) and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) is caused by micronucleation. *Chromosome Research*, v. 24, n. 3, p. 285-297, 2016.

DOYLE, J. J. DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

EWALD, D.; ULRICH, K.; NAUJOKS, G.; SCHRÖDER, M. B. Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early

marker for selecting polyploids in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 99, n. 3, p. 353-357, 2009.

FASANO, C.; DIRETTO, G.; AVERSANO, R.; D'AGOSTINO, N.; DI MATTEO, A.; FRUSCIANTE, L.; GIULIAN, G.; CARPUTO, D. Transcriptome and metabolome of synthetic *Solanum* autotetraploids reveal key genomic stress events following polyploidization. *New Phytologist*, v. 210, n. 4, p. 1382-1394, 2016.

FEYISSA, T.; WELANDER, M.; NEGASH, L. Genetic stability, ex vitro rooting and gene expression studies in *Hagenia abyssinica*. *Biologia Plantarum*, v. 51, n. 1, p. 15-21, 2007.

FU, C.; LI, L.; WU, W.; LI, M.; YU, X.; YU, L. Assessment of genetic and epigenetic variation during long-term *Taxus* cell culture. *Plant Cell Reports*, v. 31, n. 7, p. 1321-1331, 2012.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science*, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GAO, R.; WANG, H.; DONG, B.; YANG, X.; CHEN, S.; JIANG, J.; ZHANG, Z.; LIU, C.; ZHAO, N.; CHEN, F. Morphological, genome and gene expression changes in newly induced autopolyploid *Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 10, p. 1690, 2016.

GIORGETTI, L.; CASTIGLIONE, M. R. Oil palm in vitro regeneration: microdensitometric analysis during reproduction and development. *Caryologia*, v. 69, n. 1, p. 5-11, 2016.

GIRI, C. C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 126, n. 1, p. 1-18, 2016.

GOMES, S. S. L.; SALDANHA, C. W.; NEVES, C. S.; TREVIZANI, M.; RAPOSO, N. R. B.; NOTINI, M. M.; SANTOS, M. O.; CAMPOS, J. M. S.; OTONI, W. C.; VICCINI, L. F. Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, n. 1, p. 45-56, 2014.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2014.

GUERRA, M. Hybridization in situ: princípios Básicos. In: GUERRA, M. (Org.) FISH: conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2004.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, FUNPEC, 2002.

GUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. In vitro micropropagation of *Lippia alba*. *Current Science-Bangalore*, v. 81, n. 2, p. 206-209, 2001.

- HANCI, F.; GÖKÇE, A. F. Molecular characterization of Turkish onion germplasm using SSR markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 52, n. 2, p. 71-76, 2016.
- HANNWEG, K.; SIPPEL, A.; BERTLING, I. A simple and effective method for the micropropagation and in vitro induction of polyploidy and the effect on floral characteristics of the South African iris, *Crocasmia aurea*. *South African Journal of Botany*, v. 88, p. 367-372, 2013.
- HARBARD, J. L.; GRIFFIN, A. R.; FOSTER, S.; BROOKER, C.; KHA, L. D.; KOUTOULIS, A. Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. *Forestry*, v. 85, n. 3, p. 427-436, 2012.
- HAYWARD, A. C.; TOLLENAERE, R.; DALTON-MORGAN, J.; BATLEY, J. Molecular marker applications in plants. In: BATLEY, J. (Org.). *Plant Genotyping: Methods and Protocols*. Springer: New York, 2015 cap. 2, p. 13-27.
- 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.
- HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.
- HOHLENWERGER, J. C. et al. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. *Ciência Rural*, v. 47, n. 3, p. 1-4, 2017.
- HUANG, H. P.; GAO, S. L.; CHEN, L. L.; WEI, K. H. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Dioscorea zingiberensis*. *Pharmacognosy Magazine*, v. 6, n. 21, p. 51, 2010.
- HUANG, W. J.; NING, G. G.; LIU, G. F.; BAO, M. Z. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. *Biologia Plantarum*, v. 53, n. 1, p. 159-163, 2009.
- HUFTON, A. L.; PANOPOULOU, G. Polyploidy and genome restructuring: a variety of outcomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 19, n. 6, p. 600-606, 2009.
- IANNICELLI, J. et al. Effect of polyploidization in the production of essential oils in *Lippia integrifolia*. *Industrial Crops and Products*, v. 81, p. 20-29, 2016.
- ISHII, T.; KARIMI-ASHTIYANI, R.; HOUBEN, A. Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, v. 67, p. 421-438, 2016.
- JACKSON, A. L.; CHEN, R.; LOEB, L. A. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 21, p. 12468-12473, 1998.
- JAVADIAN, N.; KARIMZADEH, G.; SHARIFI, M.; MOIENI, A.; BEHMANESH, M. In vitro polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and

expression of the related genes in *Linum album* (Linaceae). *Planta*, v. 245, n. 6, p. 1165-1178, 2017.

JEZLER, C. N.; DE OLIVEIRA, A. R.; BATISTA, R. S.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, D. D. C.; COSTA, L. C. D. B. *Lippia alba* morphotypes cidreira and melissa exhibit significant differences in leaf characteristics and essential oil profile. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 23, n. 2, p. 217-223, 2013.

JIANG, J.; GILL, B. S.; WANG, G-L.; RONALD, P. C.; WARD, D. C. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, n. 10, p. 4487-4491, 1995.

JIAO, Y. et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, v. 473, n. 7345, p. 97-100, 2011.

JIBINABAI, N.; SUNILKUMAR, T.; SAJI, A.; ANTONY, V. T. In vitro regeneration of *Lippia alba* (Mill.) NEBr. An ethnobotanical useful plant. *International Journal of Bioassays*, v. 3, n. 07, p. 3119-3121, 2014.

JOSHI, P.; DHAWAN, V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. *Biologia Plantarum*, v. 51, n. 1, p. 22-26, 2007.

KAENSAKSIRI, T.; SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; PRATHANTURARUG, S. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 107, n. 2, p. 187, 2011.

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, v. 43, n. 2-3, p. 179-188, 2000.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KANCHANAPOOM, K.; KOARAPATCHAIKUL, K. In vitro induction of tetraploid plants from callus cultures of diploid bananas (*Musa acuminata*, AA group) 'Kluai Leb Mu Nang' and 'Kluai Sa'. *Euphytica*, v. 183, n. 1, p. 111-117, 2012.

KASSO, M.; BALAKRISHNAN, M. Ex situ conservation of biodiversity with particular emphasis to ethiopia. *ISRN Biodiversity*, v. 2013, p. 1-11, 2013.

KATO, A.; VEGA, J. M.; HAN, F.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, n. 2, p. 148-154, 2005.

KIROV, I.; DIVASHUK, M.; VAN LAERE, K.; SOLOVIEV, A.; KHRUSTALEVA, L. An easy "SteamDrop" method for high quality plant chromosome preparation. *Molecular Cytogenetics*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2014.

- KOZYRENKO, M. M.; ARTYUKOVA, E. V.; BOLTENKOV, E. V.; LAUVE, L. S. Somaclonal variability of *Iris pseudacorus* L. judged by RAPD and cytogenetic analyses. Russian Journal of Biotechnology, v.2, p. 13-23, 2004.
- KRISHNA, H.; ALIZADEH, M.; SINGH, D.; SINGH, U.; CHAUHAN, N.; EFTEKHARI, M.; SADH, R. K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 Biotech, v. 6, n. 1, p. 1-18, 2016.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. Scientia Horticulturae, v. 168, p. 88-107, 2014.
- KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics, v. 2, n. 4, p. 141, 2009.
- LAKSHMANAN, V.; VENKATARAMAREDDY, S. R.; NEELWARNE, B. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. Electronic Journal of Biotechnology, v. 10, n. 1, p. 106-113, 2007.
- LARGIA, M. J. V.; SHILPHA, J.; POTHIRAJ, G.; RAMESH, M. Analysis of nuclear DNA content, genetic stability, Bacoside A quantity and antioxidant potential of long term in vitro grown germplasm lines of *Bacopa monnieri* (L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 120, n. 1, p. 399-406, 2015.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W, R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.
- LEROY, X. J.; LEON, K.; CHARLES, G.; BRANCHARD, M. Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. Plant Cell Reports, v. 19, n. 11, p. 1102-1107, 2000.
- LINACERO, R.; ALVES, E. F.; VÁZQUEZ, A. M. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. Theoretical and Applied Genetics, v. 100, n. 3-4, p. 506-511, 2000.
- LOPES, J. M. L. Desenvolvimento de marcadores de microssatélites e diversidade genética em acessos de *Lippia alba* (MILL.) NE Br.(Verbenaceae). 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- LOUREIRO, J. C. M.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Boletim de Biotecnologia, p. 18-29, 2007.
- LUZ, J. M. Q.; SANTOS, V. A.; RODRIGUES, T. M.; ARRIGONI BLANK, M. F.; ASMAR, S. A. Estabelecimento in vitro e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 16, n. 2, p. 444-449, 2014.
- MADLUNG, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. Heredity, v. 110, n. 2, p. 99-104, 2013.

MADLUNG, A.; WENDEL, J. F. Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 140, n. 2-4, p. 270-285, 2013.

MANICA-CATTANI, M. F.; ZACARIA, J.; PAULETTI, G.; ATTI-SERAFINI, L.; CHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, n. 2, p. 375-380, 2009.

MARTELOTTO, L. G.; ORTIZ, J. P. A.; STEIN, J.; ESPINOZA, F.; QUARIN, C. L.; PESSINO, S. C. Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. *Plant Science*, v. 172, n. 5, p. 970-977, 2007.

MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L. D.; SANTOS, I. R. I. Manual de curadores de germoplasma - vegetal: conservação in vitro. Embrapa, Brasília, 2010.

MECCHIA, M. A.; OCHOGAVÍA, A.; SELVA, J. P.; LASPINA, N.; FELITTI, S.; MARTELOTTO, L. G.; SPANGENBERG, G.; ECHENIQUE, v.; PESSINO, S. C. Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *Journal of Plant Physiology*, v. 164, n. 8, p. 1051-1061, 2007.

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.

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, 2011.

MISHRA, K. K.; FOUGAT, R. S.; BALLANI, A.; VINITA, T.; YACHANA, J.; MADHUMATI, B. Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *International Journal of Pure and Applied Biosciences*, v. 2, n. 1, p. 169-188, 2014.

MO, X. Y.; LONG, T.; LIU, Z.; LIN, H.; LIU, X. Z.; YANG, Y. M.; ZHANG, H. Y. AFLP analysis of somaclonal variations in *Eucalyptus globulus*. *Biologia Plantarum*, v. 53, n. 4, p. 741-744, 2009.

MOGHE, G. D.; SHIU, S-H. The causes and molecular consequences of polyploidy in flowering plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1320, n. 1, p. 16-34, 2014.

MSOGOYA, T. J.; GROUT, B. W.; ROBERTS, A. Reduction in genome size and DNA methylation alters plant and fruit development in tissue culture induced off-type banana (*Musa* spp.). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, v. 3, p. 1450-1456, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology*, v. 15, p. 473-479, 1962.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? *ASM Science Journal*, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

NGEZAHAYO, F.; LIU, B. Axillary bud proliferation approach for plant biodiversity conservation and restoration. *International Journal of Biodiversity*, v.4, p. 1-9, 2014.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry Part A*, v. 73, n. 7, p. 581-598, 2008.

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

PEIXOTO, M. G. et al. In vitro conservation and leaf anatomy of different chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. *Bioscience Journal*, v. 33, n. 1, 2017.

PENG, X.; ZHANG, T.; ZHANG, J. Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 122, n. 1, p. 67-77, 2015.

PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 12, p. 5222-5226, 1994.

PIERRE, P. M.; 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. 993-1006, 2011.

PIGNATTA, D.; DILKES, B. P.; YOO, S. Y.; HENRY, I. M.; MADLUNG, A.; DOERGE, R. W.; CHEN, J.; COMAI, L. Differential sensitivity of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome and enhancers to the effects of genome doubling. *New Phytologist*, v. 186, n. 1, p. 194-206, 2010.

PNIEWSKI, T.; CZYŻ, M.; WYRWA, K.; BOCIĄG, P.; KRAJEWSKI, P.; KAPUSTA, J. Micropropagation of transgenic lettuce containing HBsAg as a method of mass-scale production of standardised plant material for biofarming purposes. *Plant Cell Reports*, v. 36, n. 1, p. 49-60, 2017.

PRAÇA, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. A practical and reliable procedure for in vitro induction of tetraploid tomato. *Scientia Horticulturae*, v. 122, n. 3, p. 501-505, 2009.

PRADO, M. J.; RODRIGUEZ, E.; REY, L.; GONZÁLEZ, M. V.; SANTOS, C.; REY, M. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 103, n. 1, p. 49-59, 2010.

PRASAD, A.; SHUKLA, S.P.; MATHUR, A.; CHANOTIYA, C.S.; MATHUR, A.K. Genetic fidelity of long-term micropropagated *Lavandula officinalis* Chaix.: an important aromatic medicinal plant. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v. 120, n. 2, p. 803-811, 2015.

RAJASEKHARAN, P. E.; SAHIJRAM, L. In vitro conservation of plant germplasm. In: BAHADUR et al. (Orgs.). Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology, India: Springer, 2015. cap. 22, p. 417-443.

RAMAKRISHNAN, M.; CEASAR, S. A.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Efficient plant regeneration from shoot apex explants of maize (*Zea mays*) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by ISSR markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 119, n. 1, p. 183-196, 2014.

REGALADO, J. J.; CARMONA-MARTÍN, E.; QUEROL, V.; VELÉZ, C. G.; ENCINA, C. L.; PITTA-ALVAREZ, S. I. Production of compact petunias through polyploidization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 129, n. 1, p. 61-71, 2017.

RÊGO, M. D.; RÊGO, E. R.; BRUCKNER, C. H.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 107, n. 3, p. 451-459, 2011.

REIS, A. C. Mapeamento cromossômico de DNA satélite e comportamento meiótico no complexo poliploide *Lippia alba* (Mill) N. E Br. 2017. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

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* (Mill) N. E. Br. (Verbenaceae): a new tropical autopolyploid complex? American Journal of Botany, v. 101, n. 6, p. 1002-1012, 2014.

RIBEIRO, C. V. Indução de poliploidia em *Lippia alba* (MILL.) N. E Br. (Verbenaceae). 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

ROCHA, D. S. Divergência genética e química em germoplasma de *Lippia alba* utilizando marcadores microssatélites e óleo essencial. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas.

ROHLF, F. J. NTSYS-Pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Manual Applied Biostatistics, New York. 2000.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J. R.; BOLLAMMA, K. T. Invited Review: Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, v. 39, n. 6, p. 551-556, 2003.

SALMA, U.; KUNDU, S.; MANDAL, N. Artificial polyploidy in medicinal plants: Advancement in the last two decades and impending prospects. Journal of Crop Science and Biotechnology, v. 20, n. 1, p. 9-19, 2017.

SAN JOSÉ, M. C.; JANEIRO, L. V.; CORREDOIRA, E. Simple strategy for the in vitro conservation of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. germplasm. Trees, v. 29, n. 2, p. 539-549, 2015.

- SANTOS, V. A. Estabelecimento in vitro, aclimatização e conservação in vitro de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). 2010. 37 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, v. 243, n. 2, p. 281-296, 2016.
- SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 25, p. 2540-2568, 2006.
- SHARMA, S. K.; BRYAN, G. J.; WINFIELD, M. O.; MILLAM, S. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta*, v. 226, n. 6, p. 1449-1458, 2007.
- SHILPHA, J.; SILAMBARASAN, T.; LARGIA, M. J. V.; RAMESH, M. Improved in vitro propagation, solasodine accumulation and assessment of clonal fidelity in regenerants of *Solanum trilobatum* L. by flow cytometry and SPAR methods. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 117, n. 1, p. 125-129, 2014.
- SILVA, P. S.; VICCINI, L. F.; SINGULANI, J. L.; SIQUEIRA, E. P. D.; ZANI, C. L.; ALVES, T. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 6, p. 843-849, 2010.
- SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; DA SILVA LEDO, C. A.; DE SOUZA, E. H.; DA SILVA, P. H.; DE CARVALHO COSTA, M. A. P.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 127, n. 1, p. 123-133, 2016.
- SLIWINSKA, E.; THIEM, B. Genome size stability in six medicinal plant species propagated in vitro. *Biologia Plantarum*, v. 51, n. 3, p. 556-558, 2007.
- SMÝKAL, P.; VALLEDOR, L.; RODRIGUEZ, R.; GRIGA, M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, v. 26, n. 11, p. 1985-1998, 2007.
- SOLTIS, D. E.; BUGGS, R. J.; 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. The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, p. 561-588, 2009.
- SOUZA, S. M.; SILVA, P. S.; TORRES, G. A.; VICCINI, L. F. Chromosome banding and essential oils composition of Brazilian accessions of *Lippia alba* (Verbenaceae). *Biologia*, v. 64, n. 4, p. 711-715, 2009.
- SOUZA, B. M.; MOLFETTA-MACHADO, J. B.; FRESCHI, L.; FIGUEIRA, A.; PURGATTO, E.; BUCKERIDGE, M. S.; SLUYS, M. V.; MERCIER, H. Axillary bud development in pineapple nodal segments correlates with changes on cell cycle gene

expression, hormone level, and sucrose and glutamate contents. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 46, n. 3, p. 281-288, 2010.

SPOELHOF, J. P.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research. *Journal of Systematics and Evolution*, v. 9999, n. 9999, p. 1-13, 2017.

SUN, Q.; SUN, H.; LI, L.; BELL, R. L. In vitro colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, 'Fertility'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 84, n. 5, p. 548-552, 2009.

TAMAYO-ORDÓÑEZ, M. C.; ESPINOSA-BARRERA, L. A.; TAMAYO-ORDÓÑEZ, Y. J.; AYIL-GUTIÉRREZ, B.; SÁNCHEZ-TEYER, L. F. Advances and perspectives in the generation of polyploid plant species. *Euphytica*, v. 209, n. 1, p. 1-22, 2016.

TAVAN, M.; MIRJALILI, M. H.; KARIMZADEH, G. In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, v. 122, p. 573-583, 2015.

TAVARES, E. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L.; LEITÃO, S. G. Kinetin enhanced linalool production by in vitro plantlets of *Lippia alba*. *Journal of Essential Oil Research*, v. 16, n. 5, p. 405-408, 2004.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, v. 4, p. 204-212, 2011.

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.

THORAT, A. S.; SONONE, N. A.; CHOUDHARI, V. V.; DEVARUMATH, R. M.; BABU, K. H. Plant regeneration from cell suspension culture in *Saccharum officinarum* L. and ascertaining of genetic fidelity through RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

TROJAK-GOLUCH, A.; SKOMRA, U. Artificially induced polyploidization in *Humulus lupulus* L. and its effect on morphological and chemical traits. *Breeding Science*, v. 63, n. 4, p. 393-399, 2013.

TSUKAYA, H. Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from *Arabidopsis* genetics. *PLoS One*, v. 8, n. 12, p. 1-7, 2013.

US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLÍS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PENA, C. In vitro culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, n. 2, p. 187-201, 2014.

VÄINÖLÄ, A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*, v. 112, n. 3, p. 239-244, 2000.

VANSTECHELMAN, I.; EECKHAUT, T.; VAN HUYLENBROECK, J.; VAN LABEKE, M. C. Histogenic analysis of chemically induced mixoploids in *Spathiphyllum wallisii*. *Euphytica*, v. 174, n. 1, p. 61-72, 2010.

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

VIEHMANNOVÁ, I.; CUSIMAMANI, E. F.; BECHYNE, M.; VYVADILOVÁ, M., GREPLOVÁ, M. In vitro induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 97, n. 1, p. 21-25, 2009.

VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. D. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

VIVES, K.; ANDÚJAR, I.; LORENZO, J. C.; CONCEPCIÓN, O.; HERNÁNDEZ, M., ESCALONA, M. Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, p. 1-5, 2017.

VRÁNA, J.; CÁPAL, P.; BEDNÁŘOVÁ, M.; DOLEŽEL, J. Flow cytometry in plant research: a success story. In: NICK, P.; OPATRNÝ, Z. (Orgs.). *Applied Plant Cell Biology*. Berlin: Springer, 2014. Cap. 12, p. 395-430.

WANG, C. G.; LI, H.; XUE, Z. Y.; CHEN, C. B.; GU, Y.; SUN, D. L.; SONG, W. Q. Marker-based analysis of genome structure and DNA methylation in a watermelon (*Citrullus lanatus*) ploidy series. *Botanical Studies*, v. 50, n. 4, p. 389-402, 2009.

WIDORETNO, W. In vitro induction and characterization of tetraploid Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 125, n. 2, p. 261-267, 2016.

WU, J. et al. Comparative cytological and transcriptomic analysis of pollen development in autotetraploid and diploid rice. *Plant Reproduction*, v. 27, n. 4, p. 181-196, 2014.

XU, C-G et al. A comparative study of bioactive secondary metabolite production in diploid and tetraploid *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 116, n. 3, p. 323-332, 2014.

YAHRAUS, T.; CHANDRA, S.; LEGENDRE, L.; LOW, P. S. Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiology*, v. 109, n. 4, p. 1259-1266, 1995.

YAN, J.; ZHANG, J.; SUN, K.; CHANG, D.; BAI, S.; SHEN, Y.; HUANG, L.; ZHANG, Z.; ZAHNG, Y.; DONG, Y. Ploidy level and DNA content of *Erianthus arundinaceus* as determined by flow cytometry and the association with biological characteristics. *Plos One*, v. 11, n. 3, p. 1-14, 2016.

- YANG, W. R.; ZHANG, Q. X.; PAN, H. T.; SUN, M. In vitro regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. *Propagation of Ornamental Plants*, v. 10, n. 2, p. 59-66, 2010.
- YANG, X.; YE, C. Y.; CHENG, Z. M.; TSCHAPLINSKI, T. J.; WULLSCHLEGER, S. D.; YIN, W.; XIA, X.; TUSKAN, G. A. Genomic aspects of research involving polyploid plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, n. 3, p. 387-397, 2011.
- YOUNIS, A.; RAMZAN, F.; HWANG, Y. J.; LIM, K. B. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Reports*, v. 34, n. 9, p. 1477-1488, 2015.
- YU, Z.; HAAGE, K.; STREIT, V. E.; GIERL, A.; RUIZ, R. A. T. A large number of tetraploid *Arabidopsis thaliana* lines, generated by a rapid strategy, reveal high stability of neo-tetraploids during consecutive generations. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 118, n. 6, p. 1107-1119, 2009.
- YU, Z.; HABERER, G.; MATTHES, M.; RATTEI, T.; MAYER, K. F.; GIERL, A.; TORRES-RUIZ, R. A. Impact of natural genetic variation on the transcriptome of autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 41, p. 17809-17814, 2010.
- ZHANG, J. et al. How genetic variation is affected by geographic environments and ploidy level in *Erianthus arundinaceus*? *Plos One*, v. 12, n. 5, p.1-12, 2017.
- ZHANG, X.; DENG, M.; FAN, G. Differential transcriptome analysis between *Paulownia fortunei* and its synthesized autopolyploid. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 3, p. 5079-5093, 2014.
- ZHOU, H-W.; ZENG, W-D.; YAN, H-B. In vitro induction of tetraploids in cassava variety 'Xinxuan 048' using colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 128, p. 723-729, 2017.
- ZLESAK, D. C.; THILL, C. A.; ANDERSON, N. O. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings. *Euphytica*, v. 141, n. 3, p. 281-290, 2005.

12 ANEXO A

Tabela 7. Principais componentes detectados no óleo essencial de *L.alba*. 1-6 (plantas triploides sintéticas), 7 (planta matriz diploide), 8-12 (plantas tetraploides sintéticas). Tr (tempo de retenção)

Planta	Tr	%	Componentes
1			
	6,133	5,97	eucaliptol
	7,433	22,53	linalol
	8,617	4,49	felandren-8-ol
	9,008	6,55	2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol
	9,100	3,39	2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol
	9,242	9,16	2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol
	9,783	2,58	neral
	10,233	3,76	geranial
	11,150	11,58	2,6-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol
	12,100	3,76	1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-Ciclohexano
	12,567	6,74	cariofileno
	12,683	4,15	germacreno B
	12,892	2,31	beta-farneseno
	13,408	10,33	germacreno D
	14,442	2,70	gama-elemeno
2			
	6,134	7,16	eucaliptol
	7,396	39,57	linalol
	8,597	5,94	alfa-felandren-8-ol
	9,226	15,55	e,e-2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol
	9,774	4,30	neral
	10,230	7,15	geranial
	11,135	20,33	terpenediol
3			
	6,136	7,91	eucaliptol
	7,360	20,30	linalol
	8,292	5,65	3-Isopropilcumeno
	8,655	4,50	p-diisopropilbenzeno
	11,119	5,74	(S)-(-)-ácido citronélico, metil ester
	12,109	7,98	1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-ciclohexano
	12,572	12,25	terpenediol
	12,689	11,45	gama-elemeno
	12,900	6,96	beta-farneseno
	13,418	17,26	germacreno D

Continuação

4		
7,430	23,83	linalol
8,609	7,90	p-menta-1,5-dien-8-ol
8,992	9,05	terpenediol
9,241	11,47	2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol
11,157	17,59	(S)-(-)- ácido citronélico, metil ester
12,099	5,85	1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-Ciclohexano
12,560	7,42	cariofileno
12,679	5,16	germacreno B
13,403	11,73	germacreno D
5		
6,138	6,23	eucaliptol
7,393	48,61	linalol
8,604	5,15	p-menta-1,5-dien-8-ol
9,230	15,05	2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol
10,233	6,88	geranial
11,133	18,08	(S)-(-)-ácido citronélico, metil ester
6		
6,136	5,12	eucaliptol
7,382	54,13	linalol
8,312	15,07	1,2-epoxi-p-menth-8-ene
8,994	3,71	terpenediol
9,781	4,38	neral
10,235	7,02	geranial
11,137	10,57	(S)-(-)-ácido citronélico, metil ester
7		
5,190	10,42	1-octen-3-ol
9,795	34,26	neral
10,258	43,25	geranial
11,119	12,07	(S)-(-)-ácido citronélico, metil ester
8		
9,547	6,25	neril alcool
9,767	24,15	neral
9,946	15,11	geranil alcool
10,223	40,44	geranial
11,108	8,06	terpene epoxide
12,560	5,99	cariofileno
9		
5,155	3,96	<i>mushroom</i> alcool
9,567	4,89	neril alcool
9,784	28,09	neral
9,968	14,11	geranil alcool
10,253	48,95	geranial

Continuação

10		
5,220	5,58	<i>mushroom</i> alcool
7,390	2,82	linalol
8,279	3,86	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-Piran-4-one
9,580	6,37	neril alcool
9,798	23,98	neral
9,982	16,66	geranil alcool
10,265	35,48	geranial
11,124	5,25	(S)-(-)-ácido citronélico, metil éster
11		
5,140	6,44	<i>mushroom</i> alcool
9,518	5,92	geraniol
9,572	8,81	neril alcool
9,797	23,29	neral
9,986	17,57	geranil alcool
10,275	29,42	geranial
11,115	8,55	(S)-(-)-ácido citronélico, metil éster
12		
9,608	8,10	neril alcool
9,819	15,58	neral
10,001	17,55	geranil alcool
10,273	43,84	geranial