

CAPÍTULO 5

**O cariótipo e o epigenoma na
genética da conservação**

Wellington Ronildo Clarindo
Adelson Lemes da Silva Júnior
Marciane da Silva Oliveira

A genética da conservação se fundamenta em dados acerca da diversidade genética e epigenética das diferentes espécies eucariotas. Tais diversidades podem ser percebidas, mensuradas e comparadas a partir de dados do cariótipo (citogenética) e do epigenoma (epigenética). O cariótipo envolve o número e a morfometria de cromossomos – consequentemente, também o kariograma – e o mapeamento de regiões cromossômicas (eucromatina, heterocromatina, restrições secundárias etc.) e sequências do genoma (genes, elementos móveis, microssatélites etc.). A caracterização do cariótipo permite conhecer o genoma de uma espécie eucariota, assim como compará-lo com outros cariótipos de táxons relacionados. Assim, dados sobre o cariótipo têm impacto na citotaxonomia, nos estudos evolutivos e filogenéticos e nos programas de melhoramento.

Além do cariótipo, o epigenoma também vem sendo investigado, especialmente com relação às suas variações. A epigenética contempla as variações químicas que podem ocorrer na base nitrogenada citosina da molécula de DNA, assim como em aminoácidos das alças das histonas. As mudanças químicas na citosina e/ou nos aminoácidos das alças das histonas promovem alterações nos níveis de compactação da cromatina (a eucromatina, com nível de baixa compactação, e a heterocromatina, com nível elevado de compactação), e, consequentemente, nos níveis de expressão gênica. Essas variações podem resultar em variações fenotípicas. Neste capítulo, trataremos dos conceitos e dos aspectos gerais do cariótipo e do epigenoma, da relevância de ambos

para a diversidade genética e epigenética, e, com efeito, para a conservação e o uso sustentável da diversidade.

O cariótipo na genética da conservação

Variações “ômicas” (genoma, epigenoma, transcriptoma e metaboloma) ocorrem entre indivíduos de diferentes espécies (variações interespecíficas), assim como entre indivíduos de uma mesma espécie (variações intraespecíficas). Portanto, destacaremos neste capítulo as diferenças entre os indivíduos para o genoma nuclear e o epigenoma. Nesse recorte, o conceito genético de clone é importante: “população de células ou organismos geneticamente idênticos, formados por meio de sucessivos ciclos celulares a partir de uma célula única ou de um organismo ancestral” (RIEGER, MICHAELIS; GREE, 1976; KING; STANSFIELD, 2002).

A partir das observações e avaliações do genoma, epigenoma e fenótipo (caracteres fisiológicos, morfológicos, reprodutivos e comportamentais), surge a genética da conservação. As alterações genéticas e epigenéticas podem resultar em mudanças fenotípicas ou, até mesmo, em uma nova característica. Num contexto genético e evolutivo, as variações genéticas e epigenéticas podem ser categorizadas conforme o nível e o efeito em um determinado ambiente, sendo: ausentes, neutras, deletérias e benéficas. Ausência de variação designa que não há variação genética, mas sinaliza a possibilidade de modificações epigenéticas essenciais, as quais podem desencadear o processo morfogênico. A variação neutra aponta que há variação no genoma e epigenoma,

mas sem variação fenotípica e sem mudanças no valor adaptativo. A variação neutra também inclui a variação deletéria, suprimida por outra variação no genoma ou epigenoma, ou por genes supressores. A variação genética e epigenética deletéria denota a variação que resulta em diminuição do valor adaptativo. Por fim, a variação benéfica designa a variação que aumenta o valor adaptativo (WANG; WANG, 2012).

A caracterização do genoma e do epigenoma é fundamental para identificar e mensurar a diversidade genética e epigenética, bem como para compreensão das causas da variação fenotípica interespecífica e intraespecífica e para o planejamento das estratégias de conservação genética. Esse olhar permite selecionar os espécimes (indivíduos, germoplasmas) divergentes para multiplicá-los e conservá-los. A avaliação e a seleção são conduzidas por diversos procedimentos que vêm sendo empregados com foco no cariótipo, no conteúdo de DNA nuclear e nas oscilações nos níveis globais de metilação da citosina da molécula de DNA.

A diversidade genética do cariótipo é anotada pela caracterização e contagem do número de cromossomos por meio da citogenética clássica e da citogenética molecular. A citogenética é área do conhecimento que se dedica ao estudo do cariótipo, isto é, de estrutura, organização, comportamento e evolução dos cromossomos. Com esses propósitos, a citogenética se caracteriza como uma ciência que associa a biologia celular à genética, fornecendo informações acerca da peculiaridade do cariótipo de diferentes espécies de fungos

(WIELOCH, 2006; RAJU, 2009), animais invertebrados e vertebrados (Figura 1) (MICOLINO et al., 2019; REINSALU et al. 2019) e plantas (Figura 2) (SADER et al., 2019; FERREIRA et al., 2020).

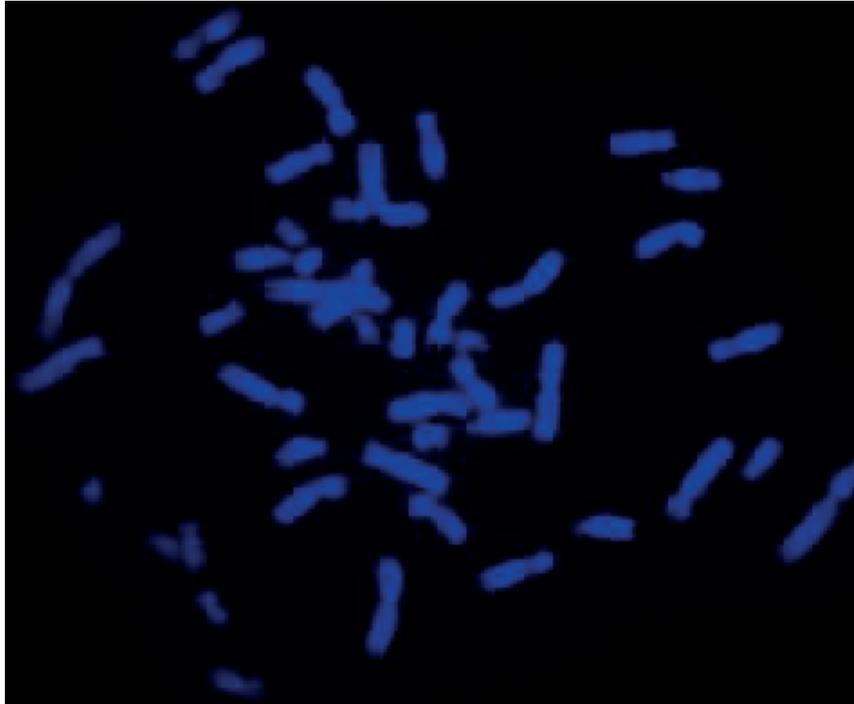


Figura 1: O cariótipo humano, *Homo sapiens*, com $2n = 2x = 46$ cromossomos. O cariótipo humano é diploide, apresentando 22 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (XX ou XY). Barra = 5 μm

Fonte: imagem gerada a partir de estudos conduzidos no Laboratório de Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em 12/05/2014.

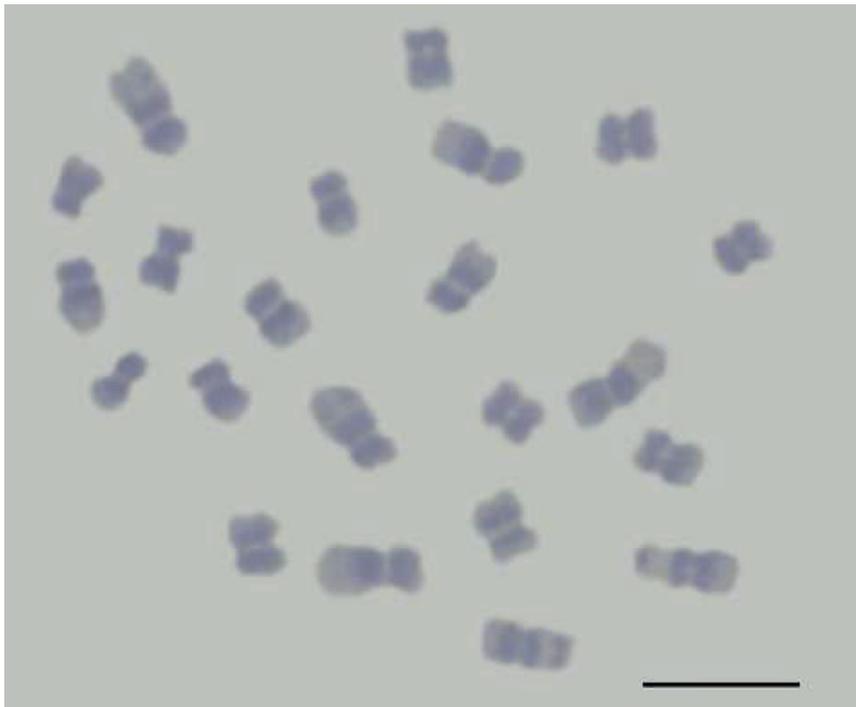


Figura 2: Cromossomos mitóticos metafásicos do café conilon, *Coffea canephora*, uma das espécies de maior importância agrônômica para o Brasil. O cariótipo de *C. canephora* possui $2n = 2x = 22$ cromossomos, sendo 11 pares de cromossomos. Barra = 5 μm
Fonte: imagem gerada a partir de estudos conduzidos no Laboratório de Citogenética e Citometria da UFV, em 05/11/2015.

As investigações citogenéticas se concentram no estudo dos cromossomos mitóticos metafásicos (WIELOCH, 2006; RAJU, 2009; SADER et al., 2019; FERREIRA et al., 2020), assim como dos cromossomos bivalentes em paquíteno, formados a partir do par homólogo unido pelo complexo sinaptonêmico (WALLING et al., 2006). Nessas investigações, diferentes técnicas são empregadas para caracterizar os cromossomos mitóticos e meióticos no que diz respeito à sua morfologia, organização e função e quanto à sua diversidade e evolução.

Para obter os cromossomos, tecidos somáticos apresentando células proliferativas são resgatados para tratamento com antitubulínicos, que promovem a parada do ciclo celular na metáfase mitótica. Além dos cromossomos mitóticos, cromossomos meióticos também podem ser obtidos por meio dos tecidos reprodutivos, os quais possuem os meiócitos. Nesse processo, lâminas são preparadas a partir desses materiais e observadas ao microscópio. Dessa forma, o número de cromossomos em metáfase (metáfase mitótica, conforme as Figuras 1 e 2) ou de bivalentes em paquíteno (prófase I da meiose I) é determinado e, comparativamente, são definidas as alterações cromossômicas numéricas, as quais são classificadas como euploidias ou aneuploidias (SATTler et al., 2016). O número de cromossomos mitóticos ou o número de cromossomos bivalentes é a primeira informação que pode ser acessada na visualização do cariótipo de uma espécie. Esse dado permite comparar células de um mesmo indivíduo, de indivíduos de uma mesma espécie e de espécies diferentes. Portanto, o número de cromossomos é um dado empregado para apontar se há diversidade genética cariotípica.

Já a caracterização morfométrica dos cromossomos e, principalmente, a aplicação de técnicas de bandeamento e de citogenética molecular, permitem comparar o cariótipo de diferentes espécies e identificar alterações cromossômicas estruturais, tais como deleções, duplicações, inversões e translocações. Nesse sentido, a primeira etapa da caracterização do cariótipo envolve a mensuração do tamanho total de cada cromossomo e dos braços curto e longo (Figura 3). Por meio desses dados, a classe cromossômica é determinada

e os cromossomos classificados em metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos ou telocêntricos (GUERRA, 1986).

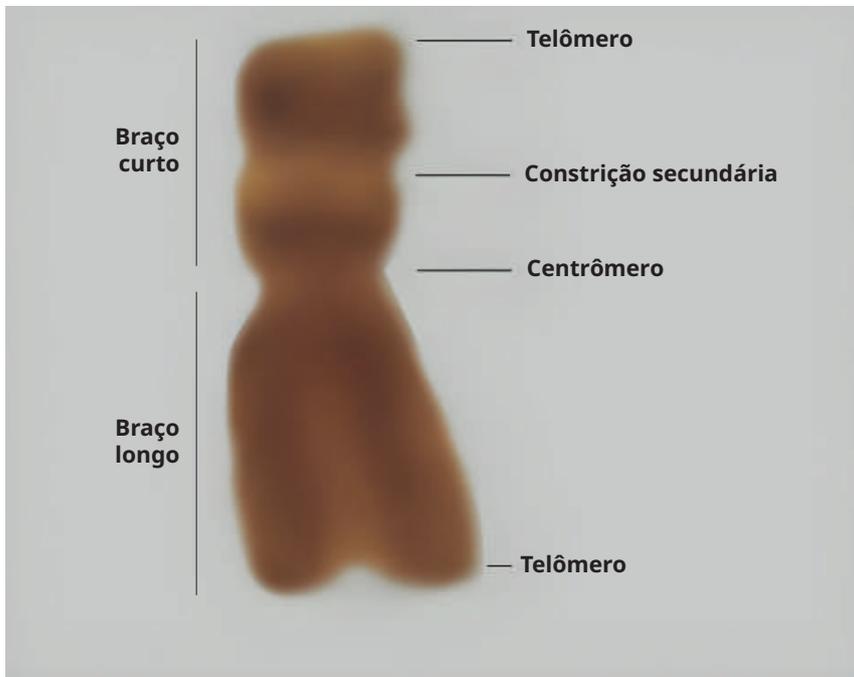


Figura 3: Cromossomo mitótico metafásico com destaque às suas diferentes porções. Barra = 5 μm

Fonte: imagem gerada a partir de estudos conduzidos no Laboratório de Citogenética e Citometria da UFV, em 05/11/2015.

As técnicas de bandeamento cromossômico são empregadas para produção de padrões de bandas nos cromossomos mitóticos e meióticos. As técnicas de bandeamento se baseiam nas propriedades químicas dos corantes ou fluorocromos e das macromoléculas orgânicas que constituem o cromossomo (DNA, RNAs, histonas, enzimas, outras proteínas etc.). As técnicas de bandeamento revelam padrões distintos de coloração nos cromossomos: as bandas. Por sua vez, são informações que ampliam a capacidade de caracterização,

permitindo a identificação de pares de homólogos e de rearranjos cromossômicos ocorridos durante a diversificação do cariótipo (Figura 4). Com atuação ao longo de todo o comprimento do cromossomo (telômero a telômero), as técnicas de bandeamento proporcionam uma análise comparativa entre cromossomos de um mesmo cariótipo ou de espécies diferentes (MICOLINO et al., 2019; REINSALU et al., 2019).

A Figura 4 explicita cromossomos mitóticos metafásicos do milho *Zea mays*, com $2n = 2x = 20$ cromossomos, corados com o fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (à esquerda). Um cromossomo submetacêntrico do milho com destaque para suas diferentes porções e para a região de *knob*, a qual é uma porção de heterocromatina rica em bases nitrogenadas adenina e timina e, por esse motivo, é uma porção preferencialmente corada pelo DAPI (Banda DAPI+) (à direita).

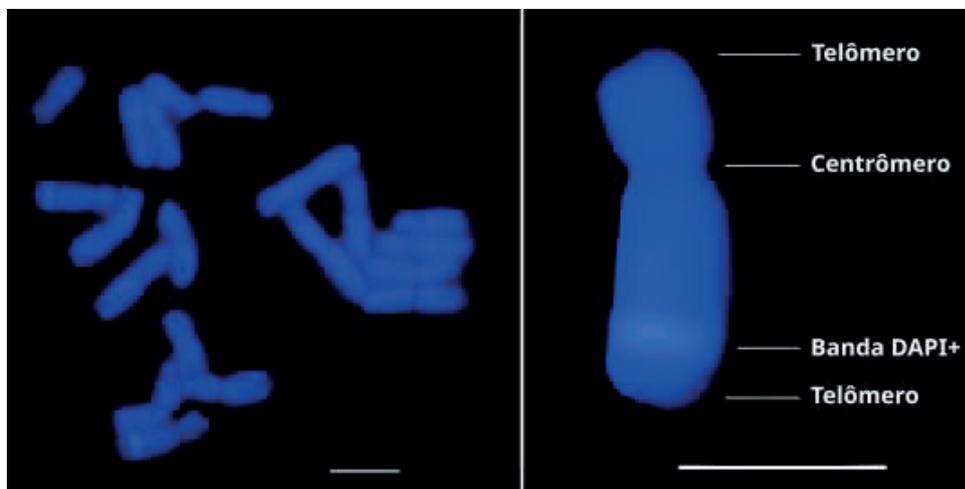


Figura 4: Cromossomos mitóticos metafásicos do milho *Zea mays*.

Barra = 5 μ m

Fonte: imagem gerada a partir de estudos conduzidos no Laboratório de Citogenética e Citometria da UFV, em 07/03/2018.

Por meio do bandeamento cromossômico, é possível diferenciar:

1. As porções de heterocromatina constitutiva (banda C), que constituem o centrômero, por exemplo;
2. As porções de eucromatina e heterocromatina (banda G, banda Q ou banda R) ao longo de todo o comprimento cromossômico, do telômero do braço curto ao telômero do braço longo;
3. A região organizadora do nucléolo (banda NOR), a qual é o sítio cromossômico dos genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA).

A integração entre a citogenética e a biologia molecular resultou na citogenética molecular, que também é empregada para identificação e mapeamento da diversidade cariotípica e para a compreensão dos fenômenos genéticos e evolutivos relacionados a essa diversidade. As técnicas de hibridização *in situ* (citogenética molecular) são usadas para detecção e/ou localização de sequências de ácidos nucleicos (sequências-alvo) nos cromossomos e consistem no pareamento da sonda (sequência de nucleotídeos marcados), geralmente de DNA, a uma sequência-alvo no cromossomo. Portanto, as técnicas de hibridização *in situ* se baseiam na complementaridade das bases nitrogenadas e no fato de a sonda ser antisenso em relação à sequência-alvo (TESSADORI; VAN DRIEL; FRANZ, 2004).

A citogenética molecular tem ampliado consideravelmente o nível de análise e o campo de atuação da citogenética, ao gerar dados que permitem:

1. Identificar os pares de homólogos das espécies que possuem cromossomos de tamanho e morfologia semelhantes (cariótipo homomórfico);
2. Localizar sequências de DNA específicas, auxiliando a comparação dos cariótipos em estudos de citotaxonomia e as investigações da estrutura, função e evolução dos cromossomos;
3. Construir mapas físicos dos cromossomos;
4. Identificar possíveis rearranjos cromossômicos estruturais e as relações de parentesco entre espécies.

A citometria de fluxo é outra possibilidade de verificação de mudanças do cariótipo com base no nível de ploidia de DNA (1C, 2C, 3C, 4C, nC) e/ou do conteúdo de DNA nuclear (em picogramas ou pares de base). Uma das vantagens da citometria de fluxo frente à contagem do número de cromossomos é a análise de um número consideravelmente maior de indivíduos em um curto espaço de tempo. Adicionalmente, milhares de núcleos referentes às inúmeras células podem ser analisados em uma única execução. Adicionada a rapidez e acurácia, a citometria de fluxo pode ser executada a partir de um pequeno fragmento de qualquer tecido, proliferativo ou não proliferativo, constituído de células nucleadas. Dessa forma, a citometria de fluxo é empregada para detecção precoce do nível de ploidia de DNA e do conteúdo de DNA

nuclear nos estágios iniciais de desenvolvimento do indivíduo. Portanto, a citometria de fluxo se destaca por possibilitar a identificação e a seleção precoce da diversidade genética nuclear.

O nível de ploidia de DNA e o tamanho do genoma nuclear, determinados por meio da citometria de fluxo, evidenciam variações intraespecíficas e interespecíficas, as quais são fundamentais para alinhar as estratégias de conservação. Ademais, esses dados também fazem parte de estudos taxonômicos e evolutivos, que correlacionam essas variações com as características adaptativas das espécies e com a distribuição geográfica (TULER et al., 2019).

Epigenética na genética da conservação

Assim como as alterações genéticas (número e estrutura dos cromossomos e sequência de DNA), mudanças epigenéticas existem entre células de um mesmo indivíduo e entre indivíduos diferentes. Nesse contexto, há apontamentos que reportam que a diversidade biológica vai “muito além da sequência de DNA”. A epigenética é caracterizada por oscilações na conformação da cromatina, levando células com o mesmo genótipo a expressarem fenótipos contrastantes (expressividade variável, penetrância incompleta, plasticidade fenotípica). O remodelamento da cromatina (eucromatina/menos compactado ↔ heterocromatina/mais compactado) é resultado de modificações químicas envolvendo a base nitrogenada citosina (C) do DNA e/ou em aminoácidos das alças das histonas (H2A, H2B, H3 e H4) que constituem o nucleossomo.

A herança epigenética (epimarcas) promove diferenciação celular e plasticidade do desenvolvimento nas diferentes espécies de fungos, animais e vegetais. A herança epigenética se dá por meio das divisões celulares (ciclo celular/mitose e meiose), da metilação da citosina do DNA, das modificações químicas dos aminoácidos das histonas e da atividade de RNAs não codificantes. Apesar de incipientes, por exemplo, em insetos, dados têm demonstrado o papel das variações epigenéticas na geração de diversidade fenotípica, tanto na morfologia quanto no papel do inseto (GLASTAD; HUNT; GOODISMAN, 2019).

Nos genomas eucariotos, a citosina é a base nitrogenada frequentemente modificada. A metilação dessa base nitrogenada do DNA promove:

1. Mudanças nos padrões de expressão gênica, especialmente quando ocorre na região promotora dos genes;
2. Silenciamento ou ativação dos elementos móveis do genoma (transposons e retrotransposons);
3. Interações cromossômicas entre regiões pericentroméricas e em outras regiões heterocromáticas das porções intersticiais dos cromossomos (ZHANG; LANG; ZHU, 2018).

A variação nos padrões de metilação da citosina do DNA tem sido avaliada e mensurada especialmente para comparar genótipos idênticos com fenótipos divergentes e/ou para verificar o impacto de fatores estressores ambientais bióticos e abióticos. Os métodos mensuram, principalmente, a proporção das citosinas metiladas no genoma global ou nas

sequências regulatórias e/ou transcritas dos genes. Os dados de metilação da citosina podem ser integrados aos dados do transcriptoma e do metaboloma, permitindo o entendimento das diferenças fenotípicas sob condições ambientais particulares. Em uma revisão realizada por Schulz e demais autores (2013), os estudiosos buscaram análises alternativas, que investigaram os diferentes tipos de metilação e a sua relação com aspectos ecológicos e processos evolutivos. Esse estudo também evidenciou que o polimorfismo de amplificação sensível à metilação é importante para pesquisas que se dedicam à população ou à espécie.

Outro mecanismo envolvido na epigenética são as modificações químicas das histonas. A acessibilidade dos fatores de transcrição da RNA polimerase (I, II ou III) ao DNA pode ser alterada pelas modificações nos níveis de compactação da cromatina, promovidas por mudanças químicas nos aminoácidos das alças das histonas. Entre as alterações ocorrentes, podem ser listadas a metilação, acetilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação e sumoilação dos radicais dos aminoácidos lisina e fosforilação dos radicais dos aminoácidos serina e treonina, tanto nas histonas H2A, H2B, H3 e H4 quanto em histonas variantes, como H3.1, H3.3 e HTZ.1. Além de interferir na expressão gênica e conseqüentemente no fenótipo, padrões distintos de fosforilação das histonas variantes foram identificados simultaneamente em cromossomos mitóticos metafásicos de *Lathyrus sativus* e *Pisum sativum*, com destaque para o papel da epigenética também na estrutura e organização dos cromossomos (NEUMANN et al., 2016).

Os mecanismos epigenéticos são altamente dinâmicos, modulando a expressão gênica. Padrões aberrantes de metilação da citosina do DNA, por exemplo, podem levar a anormalidades no desenvolvimento em espécies animais e vegetais. Portanto, a avaliação da paisagem epigenética pode ser crucial para a compreensão de fenótipos variantes e para o estabelecimento das estratégias de conservação genética. Ademais, as alterações fenotípicas, causadas nos indivíduos pelas marcas epigenéticas, podem ter valor adaptativo, pois podem ter efeito transgeracional, como na paramutação e *imprinting* genômico. Portanto, mesmo que os descendentes já não se encontrem expostos aos estresses abióticos ou bióticos dos ancestrais, as alterações epigenéticas ainda podem ser encontradas (BARBOSA et al., 2018). Nesse contexto, estudos epigenéticos permitem compreender a diversidade biológica nos diferentes ambientes e interpretar as mudanças no epigenoma sob as flutuações ambientais.

O impacto das variações epigenéticas tem sido reportado em diferentes estudos. Por exemplo, o microbioma intestinal é relevante à biologia de diferentes espécies animais – inclusive de humanos – por influenciar, por exemplo, a biossíntese de neurotransmissores e a interação com as funções cerebrais por meio do eixo intestino-cérebro. Bengesser e demais autores (2019) relataram que a diversidade do microbioma bacteriano representa um fator ambiental interno, que pode influenciar os níveis de metilação da citosina de diferentes genes, como do gene *arntl*, que possui locus no cromossomo 11p15.3 em humanos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406>), regulando a expressão da monoamina oxidase A.

É amplamente conhecida a inativação do cromossomo X, que pode influenciar entre 75% e 85% dos genes, aproximadamente, em um cariótipo XX em diferentes espécies, como a humana. Recentemente, os mecanismos epigenéticos têm sido demonstrados entre células com cariótipo XX e células com cariótipo XY, assim como os papéis na compensação de dose (efeito de dose) relacionada aos genes com loci no cromossomo X. As mudanças epigenéticas no cromossomo X são mediadas por RNAs não codificantes, e têm sido consideradas essenciais durante o desenvolvimento embrionário (sobrevivência) dos indivíduos XX e, certamente, em indivíduos com cariótipo XXY/XXX (LODA; COLLOMBET; HEARD , 2022).

Na genética da conservação, assim como em outras áreas da genética, evolução e ecologia, muitos autores investigam e decifram os mecanismos que contribuem para a variação fenotípica das diferentes espécies e seus efeitos nas interações ecológicas e na dinâmica evolutiva. A variação fenotípica determina a capacidade das plantas de se adaptarem a ambientes em mudança e colonizar novos habitats. Nas últimas décadas, pesquisas sobre epigenética de plantas mostraram que a variação epigenética está relacionada à variação fenotípica, e algumas marcas epigenéticas conduzem a grandes mudanças fenotípicas nas plantas. Além disso, os epigenomas vegetais são altamente diversificados, dinâmicos e podem responder rapidamente a uma variedade de fatores estressores bióticos e abióticos. Por fim, a variação epigenética pode responder à seleção e, portanto, desempenhar um papel na evolução adaptativa (BOQUETE; MUYLE; ALONSO, 2021).

Desafios e perspectivas: um olhar para a diversidade cariotípica e epigenética

Em alguns contextos, a conservação de germoplasmas é um dos principais objetivos, especialmente para preservar a diversidade genética e epigenética de espécies de relevância econômica e/ou ecológica. Nesses casos, mudanças genéticas e epigenéticas são indesejáveis e, por isso, a aplicação de técnicas de avaliação do genoma e epigenoma devem ser periodicamente empregadas. Por outro lado, a baixa variabilidade genética de alguns germoplasmas tornam promissoras as estratégias que modificam o genoma e o epigenoma, gerando novos germoplasmas de uma espécie. Em todos os cenários, a caracterização genética e/ou epigenética, do cariótipo aos níveis de metilação, significa compreender as causas das mudanças fenotípicas e verificar o sucesso das estratégias empregadas.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, João *et al.* O papel da epigenética na compreensão das respostas dos organismos dulçaquícolas às flutuações ambientais: teria Lamarck razão? **CAPTAR**, v. 7, n. 1, p. 39-54, mar. 2018.
- BENGESESSER, Susanne A. *et al.* Epigenetics of the molecular clock and bacterial diversity in bipolar disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 101, p. 160-166, mar. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453018306747?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- BOQUETE, M. Teresa; MUYLE, Aline; ALONSO, Conchita. Plant epigenetics: phenotypic and functional diversity beyond the DNA sequence. **American Journal of Botany**, v. 108, n. 4, p. 553-558, abr. 2021. Disponível em: <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajb2.1645>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- FERREIRA, Darley Aparecido T. *et al.* Karyotype and nuclear DNA content variation in *Passiflora* L. **Scientia Horticulturae**, v. 272, n. 109532, p. 1-12, out. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423820303605>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- GLASTAD, Karl M.; HUNT, Brendan G.; GOODISMAN, Michael A. D. Epigenetics in insects: genome regulation and the generation of phenotypic diversity. **Annual Review of Entomology**, v.64, p. 185-203, jan. 2019. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-011118-111914>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- GUERRA, Marcelo S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 741-743, 1986. Disponível em: https://www.ege.fcen.uba.ar/wp-content/uploads/2014/05/Review-Nomenclature-Levan_rev-Brasil-Genet_1986.pdf. Acesso em: 20 jan. 2023.

LODA, Agnese; COLLOMBET, Samuel; HEARD, Edith. Gene regulation in time and space during X-chromosome inactivation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, p. 231-249, 2022.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-021-00438-7>. Acesso em: 20 jan. 2023.

MICOLINO, Ricardo *et al.* Chromosomal dynamics in space and time: evolutionary history of *Mycetophylax* ants across past climatic changes in the Brazilian Atlantic coast. **Scientific Reports**, v. 9, n. 18800, p. 1-13, dez. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-55135-5>. Acesso em: 20 jan. 2023.

NEUMANN, Pavel *et al.* Epigenetic histone marks of extended metapolycentric centromeres of *Lathyrus* and *Pisum* chromosomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 234, p. 1-11, mar. 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00234/full>. Acesso em: 20 jan. 2023.

RAJU, Namboori B. *Neurospora* as a model fungus for studies in cytogenetics and sexual biology at Stanford. **Journal of Biosciences**, v. 34, p. 139-159, mar. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12038-009-0015-5>. Acesso em: 20 jan. 2023.

REINSALU, Olavi *et al.* A dual colour FISH method for routine validation of sexed *Bos taurus* semen. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 104, p. 1-8, abr. 2019. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-1839-3>. Acesso em: 20 jan. 2023.

SADER, Mariela A. *et al.* The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 1, p. 7-21, jan. 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14772000.2018.1546777>. Acesso em: 20 jan. 2023.

SATTLER, Mariana C.; CARVALHO, Carlos R.; CLARINDO, Wellington R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v. 243, n. 2, p. 281-296, fev. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-015-2450-x>. Acesso em: 20 jan. 2023.

SCHULZ, Benjamin; ECKSTEIN, R. Lutz; DURKA, Walter. Pontuação e análise de polimorfismos de amplificação sensíveis à metilação para estudos epigenéticos populacionais. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 4, p. 642-653, abr. 2013.

TESSADORI, Frederico; VAN DRIEL, Roel; FRANSZ, Paul. Cytogenetics as a tool to study gene regulation. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 3, p. 147-153, mar. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138504000263>. Acesso em: 20 jan. 2023.

TULER, Amélia C. *et al.* Diversification and geographical distribution of *Psidium* (Myrtaceae) species with distinct ploidy levels. **Trees**, v. 33, p. 1101-1110, abr. 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00468-019-01845-2>. Acesso em: 20 jan. 2023.

WALLING, Jason G. *et al.* Chromosome-level homeology in paleopolyploid soybean (*Glycine max*) revealed through integration of genetic and chromosome maps. **Genetics**, v. 172, n. 3, p. 1893-1900, mar. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article/172/3/1893/6060571?login=true>. Acesso em: 20 jan. 2023.

WANG, Qin Meo; WANG, Li. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. **Plant Cell Rep**, v. 31, n. 9, p. 1535-1547, set. 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-012-1281-5>. Acesso em: 20 jan. 2023.

WIELOCH, Wioletta. Chromosome visualisation in filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 1, p. 1-8, out. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701206001862?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jan. 2023.

ZHANG, Huiming; LANG, Zhaobo; ZHU, Jian-Kang. Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 489-506, maio 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0016-z#:~:text=other%20developmental%20processes.,DNA%20methylation%20dynamics,genomic%20regions%20by%20distinct%20pathways>. Acesso em: 20 jan. 2023.