

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Carine Lugato Silva de Andrade

“Indução de Poliploidia em *Oncidium crispum*”

Juiz de Fora

2025

Carine Lugato Silva de Andrade

“Indução de Poliploidia em *Oncidium crispum*”

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Coorientador: Ms. Thalita Bordignon da Cunha

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lugato Silva de Andrade, Carine.

Indução de Poliploidia em *Oncidium crispum* / Carine Lugato Silva de Andrade. -- 2025.

49 p.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Coorientadora: Thalita Bordignon da Cunha

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2025.

1. Indução de poliploidia. 2. Orchidaceae. 3. Duplicação cromossômica. I. Facio Viccini, Lyderson, orient. II. Bordignon da Cunha, Thalita, coorient. III. Título.

Carine Lugato Silva de Andrade

Indução de Poliploidia em *Oncidium crispum*

Dissertação apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 25 de Agosto de 2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **LYDERSON FACIO VICCINI**
Data: 16/09/2025 18:13:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
 **THALITA BORDIGNON DA CUNHA**
Data: 17/09/2025 11:28:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ms. Thalita Bordignon da Cunha

Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
 **SAULO MARÇAL DE SOUSA**
Data: 17/09/2025 07:30:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Saulo Marçal de Souza

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais, Angélica e Amarildo, que com sabedoria e carinho sempre me mostraram o caminho a seguir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e pelas oportunidades que me foram proporcionadas ao longo desta jornada.

À minha mãe, Angélica, pelo apoio incondicional, incentivo e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, e ao meu pai, Amarildo, por me ensinar a valorizar os estudos e estar sempre disposto a ajudar quando mais precisei.

Aos meus avós, por acreditarem em mim e serem um alicerce constante, e a todos os familiares, cuja presença e ensinamentos tornaram essa trajetória mais segura e significativa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lyderson, por compartilhar seu conhecimento, guiar-nos em todos os momentos, bons ou difíceis, e oferecer soluções eficazes sempre que necessário.

À minha coorientadora, Thalita, que me acompanhou desde o início no laboratório, ensinando todas as técnicas e transmitindo grande conhecimento. Esse trabalho não seria possível sem toda a sua contribuição.

À minha companheira de Iniciação Científica, Ana Alice, que tornou os longos períodos de análise no microscópio mais descontraídos.

Aos amigos do laboratório, por serem companhias gentis e agradáveis, sempre tranquilos de se trabalhar, dispostos a ajudar e generosos em compartilhar seus conhecimentos, ensinando técnicas e contribuindo para o aprendizado coletivo.

Um agradecimento especial ao Elyabe, por sua disponibilidade, paciência e auxílio em todas as técnicas e atividades realizadas.

Agradeço aos professores e colaboradores do Departamento de Genética da UFJF, com como aos docentes do curso de Ciências Biológicas, cuja contribuição foi fundamental para a minha formação. Sinto-me muito privilegiada por ter tido a oportunidade de aprender com cada um de vocês. Registro também minha gratidão à Universidade Federal de Juiz de Fora e à Coordenação de Ciências Biológicas pela oportunidade de concluir esta etapa, assim como à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

“Não são as dificuldades que nos definem, mas a forma como escolhemos enfrentá-las”
-(inspirado em Epicteto)

RESUMO

A produção de poliploides por meios artificiais tem sido amplamente utilizada em programas de melhoramento vegetal, sendo considerada vantajosa sob os pontos de vista genético, agrônomico e evolutivo. Em grande parte dos casos, a duplicação cromossômica induzida promove a ampliação das combinações gênicas disponíveis, resultando em um aumento da variabilidade genética e possibilitando o surgimento de fenótipos com características agronomicamente desejáveis. A poliploidização artificial é, portanto, uma ferramenta estratégica no desenvolvimento de novas cultivares com valor comercial agregado, especialmente no setor ornamental. Este trabalho teve como objetivo a indução e caracterização comparativa de poliploides artificiais em *Oncidium crispum*, utilizando tratamentos in vitro com colchicina em duas concentrações (0,05% e 0,1%) por períodos de 4 e 7 dias. A indução de poliploidia foi avaliada por meio de técnicas citogenéticas, incluindo a contagem cromossômica clássica, com o uso do fluorocromo DAPI e a citometria de fluxo para estimativa do conteúdo genômico. Os indivíduos controle apresentaram 58 cromossomos e média de 3,58 pg de DNA, os poliploides induzidos exibiram 116 cromossomos e cerca de 6,76 pg de DNA. Além disso, foi realizada uma análise comparativa do padrão de metilação do DNA entre plantas diploides, poliploides e mixoploides, por meio de enzimas sensíveis à metilação e marcadores ISSR (MS-ISSR). Os resultados indicaram que a metilação da citosina interna do DNA estava ausente nos diploides, mas presente em poliploides e mixoploides, enquanto a metilação da citosina externa foi observada apenas em diploides, sugerindo uma modificação significativa no perfil epigenético decorrente da duplicação genômica. Não houve diferença estatística significativa na metilação total entre diploides e poliploides. Este estudo reforça a viabilidade da indução de poliploidia em *O. crispum* para fins de melhoramento ornamental e destaca a importância de análises integradas citogenéticas e epigenéticas para a compreensão das consequências moleculares da poliploidia em plantas ornamentais.

palavras-chave: duplicação cromossômica, orquídea, colchicina, *Oncidium crispum*, metilação do DNA

ABSTRACT

The production of polyploids by artificial means has been widely used in plant breeding programs and is considered advantageous from genetic, agronomic, and evolutionary perspectives. In most cases, induced chromosome doubling promotes the expansion of available gene combinations, resulting in increased genetic variability and enabling the emergence of phenotypes with agronomically desirable traits. Artificial polyploidization is, therefore, a strategic tool in the development of new cultivars with added commercial value, especially in the ornamental sector. This study aimed to induce and comparatively characterize artificial polyploids in *Oncidium crispum* using *in vitro* treatments with two concentrations (0.05% and 0.1%) of colchicine for periods of 4 and 7 days. Polyploidy induction was evaluated using cytogenetic techniques, including classical chromosome counting with the fluorochrome DAPI and flow cytometry to estimate genomic content. Control individuals had 58 chromosomes and an average of 3.58 pg of DNA, while induced polyploids had 116 chromosomes and approximately 6.76 pg of DNA. Furthermore, a comparative analysis of the DNA methylation pattern between diploid, polyploid, and mixoploid plants was performed using methylation-sensitive enzymes and ISSR markers (MS-ISSR). The results indicated that internal DNA cytosine methylation was absent in diploids but present in polyploids and mixoploids, while external cytosine methylation was observed only in diploids, suggesting a significant modification in the epigenetic profile resulting from genome duplication. There was no statistically significant difference in total methylation between diploids and polyploids. This study reinforces the feasibility of inducing polyploidy in *O. crispum* for ornamental breeding purposes and highlights the importance of integrated cytogenetic and epigenetic analyses for understanding the molecular consequences of polyploidy in ornamental plants.

Keywords: chromosome doubling, orchid, colchicine, *Oncidium crispum*, DNA methylation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Inflorescência de *Oncidium crispum* (Orchidaceae). Fotografia de Mauro Rosim, 2013.....
19
- Figura 2** – Plantas controle de *Oncidium crispum* em fase de aclimatização, mantidas sob cobertura com saco ziplock
32
- Figura 3** – Plantas controle de *Oncidium crispum* em estágio avançado de aclimatização, mantidas sem cobertura plástica (saco ziplock)
32
- Figura 4** – Mudanças de *Oncidium crispum* cultivadas em substrato, mantidas em casa de vegetação
33
- Figura 5** – A: Planta controle; B: Planta diploide submetida ao tratamento de duplicação, porém sem alteração no nível de ploidia (0,05% por 7 dias); C: Planta poliploide obtida após tratamento com 0,1% por 7 dias; D: Planta mixoploide resultante do tratamento com 0,1% por 4 dias 33
- Figura 6** – Diferença morfológica entre indivíduos poliploides e diploides cultivados in vitro. A: Indivíduo poliploide obtido por tratamento com 0,1% de colchicina por 4 dias; B: Indivíduo controle (diploide)
34
- Figura 7** – Histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo. A: Indivíduo diploide; B: Indivíduo poliploide artificial 35

Figura 8 – Metáfases representativas de *Oncidium crispum*: A – citótipo diploide ($2n = 58$);
B – citótipo tetraploide ($2n = 116$)
36

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA de *Oncidium crispum*
digeridas com as enzimas *MspI* e *HpaII* e amplificadas com primers ISSR universais. Gel
superior: C – controle; P – poliploide; M – DNA digerido com *MspI*; H – DNA digerido com
HpaII; 1–3 – diferentes indivíduos 36

Figura 10 - Gráfico demonstrando porcentagem de metilação observada para as citosinas
interna e
externa.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégia utilizada para interpretar os diferentes padrões de bandas e quantificar o percentual de metilação do genoma de diploides e tetraploides sintéticos de *Oncidium crispum*

.....30

Tabela 2- Total de indivíduos de diferentes ploidias obtidos para cada tratamento.....35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Orchidaceae.....	19
1.2	<i>Oncidium crispum</i>	20
1.3	Cultura de tecidos vegetais.....	21
1.4	Poliploidia.....	21
1.5	Poliploidia artificial.....	23
1.6	Metilação do DNA.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Obtenção de plantulas de <i>Oncidium crispum</i>	26
3.2	Indução de poliploides sintéticos.....	26
3.3	Avaliação do efeito da colchicina no desenvolvimento e estabilidade genômica	27
3.4	Caracterização cromossômica de plantas diploides e poliploides sintéticos.....	27
3.5	Caracterização do padrão de metilação do DNA de plantas diploides e poliploides sintéticos de <i>Oncidium crispum</i>	28
3.5.1	Extração do DNA genômico.....	29
3.5.2	Análise do perfil de metilação do DNA usando enzimas sensíveis a metilação ISSR (MS-ISSR).....	30
3.6	Aclimação de mudas de <i>Oncidium crispum</i>	32
4.	RESULTADOS.....	35
4.1	Estimativa da quantidade de DNA e avaliação da estabilidade genômica de <i>Oncidium crispum</i>	35
4.2	Caracterização cromossômica de plantas diploides e poliploides sintéticos de <i>Oncidium crispum</i>	36
4.3	Caracterização do padrão de metilação do DNA de plantas diploides e poliploides de <i>Oncidium crispum</i>	38
5.	DISCUSSÃO.....	38

6.CONCLUSÃO.....42

REFERÊNCIAS.....44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Orchidaceae

As orquídeas são as plantas que compõem a família Orchidaceae, pertencente à ordem Asparagales. Consideradas uma das famílias mais fascinantes, complexas e diversas do reino vegetal, as Orchidaceae destacam-se não apenas pela beleza exótica de suas flores, mas também por sua ampla distribuição geográfica, adaptabilidade ecológica e relevância econômica e científica (Chase et al., 2015; Givnish et al., 2015). Estima-se que a família compreenda aproximadamente 800 gêneros e entre 28.000 a 35.000 espécies descritas, além de mais de 100.000 híbridos artificiais desenvolvidos por melhoristas e colecionadores ao redor do mundo. Essa diversidade impressionante torna as orquídeas uma das maiores famílias de angiospermas conhecidas, superando grupos inteiros de plantas em riqueza de espécies e complexidade morfológica (Dressler, 1993).

As orquídeas ocorrem em quase todos os continentes, com exceção das regiões polares, predominando principalmente em ecossistemas tropicais úmidos, como as florestas da Amazônia, Mata Atlântica, Sudeste Asiático e regiões da África Central (Cribb et al., 2003; Govaerts et al., 2021). Contudo, também estão presentes em ambientes áridos, de altitude e até mesmo temperados, demonstrando uma notável capacidade de adaptação. Essa versatilidade ecológica é favorecida por características únicas, como o desenvolvimento de estruturas vegetativas modificadas (pseudobulbos, rizomas, raízes com velame), a simbiose com fungos micorrízicos na germinação das sementes e sofisticados mecanismos de polinização que envolvem, muitas vezes, coevolução com polinizadores específicos (Rasmussen, 1995; Arditti, 1992).

Além de sua importância ecológica e evolutiva, as orquídeas possuem grande valor ornamental, medicinal, cosmético e alimentício. Espécies como *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Dendrobium* e *Oncidium* são amplamente cultivadas e comercializadas no mundo todo, constituindo um mercado bilionário que movimentava dezenas de bilhões de dólares anualmente (Soto Arenas & Dressler, 2010; Swarts & Dixon, 2009). Outras espécies como a *Vanilla planifolia*, são exploradas economicamente para a produção da baunilha, um dos aromas naturais mais utilizados na indústria alimentícia (Walsh et al., 2017). A crescente demanda por essas plantas impulsionou avanços nas técnicas de cultivo in vitro, propagação clonal, hibridização e manipulação genética, o que permitiu não apenas a expansão do setor ornamental, mas também a conservação ex situ de espécies ameaçadas (Teixeira da Silva & Dobránszki, 2014; Chen et al., 2021). No entanto, o intenso comércio ilegal, a destruição de habitats e as mudanças climáticas representam ameaças significativas à diversidade natural de

Orchidaceae, exigindo estratégias de conservação integradas que considerem tanto a preservação da biodiversidade quanto o uso sustentável dos seus recursos genéticos (Swarts e Dixon, 2009; Fay, 2018).

Atualmente, os avanços na biologia das orquídeas e biotecnologias têm contribuído substancialmente para o desenvolvimento de novas cultivares e híbridos com múltiplos valores ornamentais, contribuindo para o mercado em rápido crescimento e demanda por variedades exóticas. De 2007 a 2012, o custo de estacas de orquídeas frescas e brotos negociados foi estimado em 483 milhões de dólares americanos (DE, L.C., et al, 2015). Sua importância multifacetada na floricultura, no setor de alimentos e na medicina contribuiu substancialmente para a comercialização de orquídeas, com um mercado global multimilionário (DE, L.C., et al, 2015). A crescente demanda por variedades exóticas e a conservação de espécies ameaçadas exigem novas tecnologias científicas, que podem produzir plantas com novas variedades de flores, tolerância ao estresse biótico / abiótico e propagação eficiente (Hossain, M.M, 2013). Novas fronteiras na ciência das plantas se concentraram em estudos avançados em orquídeas, incluindo manipulações genéticas, estudos de proteoma e genômica funcional, entre outros para os resultados desejados (Kisana, B.; 2018.).

1.2 *Oncidium crispum*

Entre as orquídeas, *Oncidium crispum* (figura 1) é uma espécie epífita nativa da região sudeste do Brasil, amplamente valorizada e comercializada em floriculturas devido ao seu elevado valor ornamental (Cardoso, 2014; Borba & Semir, 1998). Essa espécie destaca-se pela sua inflorescência exuberante, caracterizada por flores de coloração marrom com manchas amarelas contrastantes, as quais florescem predominantemente entre os meses de junho e agosto, período que coincide com condições ambientais favoráveis à sua reprodução (Silva et al., 2017). As flores emergem da base dos pseudobulbos, estruturas especializadas que armazenam água e nutrientes, e que produzem duas a três folhas coriáceas durante seu ciclo vegetativo, conferindo à planta uma morfologia adaptada a ambientes epífitos, sujeitos a variações hídricas (Pridgeon et al., 2005; Cardoso, 2014).

O grande potencial de *O. crispum* para programas de melhoramento genético reside na sua ampla utilização em cruzamentos interespecíficos com outras espécies dos gêneros *Oncidium*, *Miltonia* e *Brassia*, com o intuito de originar híbridos que reúnam características ornamentais desejáveis, tais como diversidade na coloração floral, resistência a pragas e doenças, e maior durabilidade das flores (Bateman et al., 2003; Borba & Semir, 1998).

Estudos recentes têm explorado a plasticidade genética dessa espécie, destacando sua capacidade de adaptação e resposta fenotípica à variações ambientais e ao cultivo *in vitro*, o que reforça seu potencial para a criação de cultivares comerciais de alto valor (Silva et al., 2017; Teixeira da Silva et al., 2015).

Assim, *Oncidium crispum* representa não apenas um importante recurso para a floricultura comercial, mas também um modelo promissor para estudos genéticos e de melhoramento em orquídeas epífitas.



Figura 1 – *Oncidium crispum* (Lodd. ex Lindl.). Foto de Mauro Rosim.
Acesso: <https://www.flickr.com/photos/rosim/11343125026/in/photostream/>

1.3 Cultura de tecidos vegetais

A micropropagação *in vitro* constitui uma abordagem eficiente, prática e amplamente utilizada para a multiplicação de orquídeas, sendo especialmente vantajosa para a germinação de sementes dessa família, que, em condições naturais, apresentam baixíssima taxa de sucesso devido à ausência de endosperma e à dependência de fungos micorrízicos para o desenvolvimento inicial (Arditti & Ernst, 1993).

Além de sua aplicação direta na multiplicação clonal, a micropropagação fornece uma plataforma ideal para ensaios biotecnológicos, como indução de poliploidia, transformação genética, seleção de variantes somaclonais e manipulação epigenética, sendo uma base essencial para programas de melhoramento genético em orquídeas (Teixeira da Silva et al., 2015). Essa técnica também representa uma ferramenta estratégica para a conservação de espécies ameaçadas, promovendo a preservação *ex situ* de germoplasma, reduzindo a coleta

predatória e permitindo a reintrodução em habitats naturais (Nongdam & Chongtham, 2011; Zeng et al., 2016).

Diversas espécies raras e ameaçadas já foram propagadas com sucesso por meio de métodos *in vitro*, como *Paphiopedilum armeniacum*, *Bulbophyllum nipondhii*, *Paphiopedilum insigne* e *Anoectochilus elatus*, demonstrando o potencial da técnica para a conservação da biodiversidade (Chen et al., 2004; Gantait et al., 2021).

Nas últimas décadas, a cultura de tecidos vegetais se consolidou como ferramenta-chave para a rápida multiplicação e conservação *ex situ* de orquídeas, utilizando uma ampla variedade de explantes, incluindo segmentos de caule, nós apicais, meristemas, raízes, rizomas e até talos florais (Martin & Madassery, 2006; Roy et al., 2010). A composição dos meios de cultura é um fator crítico para o sucesso da germinação e regeneração *in vitro*, sendo frequentemente ajustada conforme o tipo de explante, espécie, e objetivo experimental (Arditti, 2008). A combinação adequada de nutrientes, reguladores de crescimento e condições ambientais específicas pode otimizar significativamente a eficiência da micropropagação.

1.4 Poliploidia

A poliploidia é um fenômeno genômico caracterizado pela presença de múltiplos conjuntos completos de cromossomos, resultando em organismos com três ou mais séries cromossômicas (Otto & Whitton, 2000). Trata-se de um dos principais mecanismos responsáveis pela especiação e evolução das plantas superiores (angiospermas e gimnospermas), sendo especialmente comum em angiospermas (Soltis & Soltis, 2009; Wood et al., 2009).

Esse fenômeno pode ocorrer por meio da formação de gametas não reduzidos, que mantêm o número diploide de cromossomos, ou pela duplicação espontânea do zigoto antes ou durante as primeiras divisões celulares (Ramsey & Schemske, 1998; Comai, 2005). Plantas poliploides que surgem desses eventos podem ser mantidas em populações naturais, uma vez que frequentemente exibem vantagens adaptativas, como maior vigor, tolerância a estresses ambientais, plasticidade fenotípica e maior variabilidade genética (Van de Peer et al., 2017; Levin, 2002). Esses fatores contribuem para que as poliploidias sejam eventos evolutivos bem-sucedidos, facilitando a colonização de novos habitats e o aumento da diversidade biológica.

Ao contrário do que se supunha no passado, a origem da maioria das espécies poliploides é múltipla, significando que diferentes indivíduos poliploides independentes

podem surgir em uma mesma espécie, aumentando a diversidade genética dentro do grupo poliploide (Soltis et al., 2010). O processo de poliploidização é dinâmico e recorrente, e provoca profundas alterações genéticas e epigenéticas no genoma dos organismos afetados (Chen, 2007; Madlung, 2013).

Além das alterações genéticas, a poliploidia está associada a mudanças morfológicas importantes. O aumento do número cromossômico geralmente se traduz em um aumento do volume nuclear, que se reflete em células maiores e, conseqüentemente, em órgãos de maior tamanho (Cavalier-Smith, 1985; Beaulieu et al., 2008). Este fenômeno, conhecido como “efeito do tamanho do genoma”, pode resultar em plantas poliploides maiores, com folhas, flores e raízes maiores, além de diferenças fisiológicas como maior tolerância a estresses bióticos e abióticos (Leitch & Bennett, 2004; Suda et al., 2015).

Segundo Simioni (2004), é esperado que plantas poliplóides apresentem superioridade em relação às plantas diplóides em diversos aspectos morfofisiológicos, genéticos e adaptativos. Essa vantagem está associada ao fato de que muitas características fenotípicas de importância adaptativa e agrônômica são controladas por múltiplos genes localizados em diferentes cromossomos. Dessa forma, a duplicação genômica amplia a base genética disponível, promovendo o acúmulo de alelos favoráveis e aumentando a variabilidade genética, o que pode resultar em fenótipos com maior plasticidade e desempenho adaptativo (Leitch & Leitch, 2008; Van de Peer et al., 2017).

Durante o processo evolutivo de espécies poliploides, os efeitos de mutações individuais podem ser minimizados quando considerados isoladamente; no entanto, seu impacto coletivo pode gerar alterações significativas em características poligênicas, possibilitando o surgimento de novos padrões fenotípicos sob a ação da seleção natural (Comai, 2005; Otto & Whitton, 2000). Além disso, o aumento do nível de ploidia está diretamente relacionado à capacidade de mascarar mutações deletérias. Isso ocorre devido ao efeito “tamponante” da poliploidia, que se refere à presença de múltiplas cópias gênicas capazes de compensar ou silenciar mutações nocivas, preservando a funcionalidade do organismo (Silva Jr., 2008; Chen, 2007).

Essa tolerância genética aumenta não apenas a robustez das plantas frente a estresses ambientais, mas também sua viabilidade reprodutiva, principalmente em habitats instáveis ou em processos de colonização de novos nichos ecológicos (Soltis et al., 2014). Adicionalmente, os poliplóides tendem a apresentar maior vigor híbrido (heterose), maior tamanho celular e, conseqüentemente, estruturas vegetativas e reprodutivas mais

desenvolvidas, o que pode favorecer sua competitividade em ambientes naturais e agrícolas (Beaulieu et al., 2008; Levin, 2002).

1.5 Poliploidia Artificial

A produção de poliploides por meios artificiais tem sido amplamente utilizada em programas de melhoramento vegetal, sendo considerada vantajosa sob os pontos de vista genético, agrônomico e evolutivo (Comai, 2005). Em grande parte dos casos, a duplicação cromossômica induzida promove a ampliação das combinações gênicas disponíveis, resultando em um aumento da variabilidade genética e possibilitando o surgimento de fenótipos com características agronomicamente desejáveis (Comai, 2005; Soltis et al., 2016). Tais características incluem maior vigor vegetativo, flores de maior porte, intensificação da coloração floral, maior espessura foliar e, em alguns casos, maior resistência a estresses bióticos e abióticos (Van de Peer et al., 2017; Chen, 2010).

A poliploidização artificial é, portanto, uma ferramenta estratégica no desenvolvimento de novas cultivares com valor comercial agregado, especialmente no setor ornamental. Na indústria de flores e plantas ornamentais, a obtenção de poliploides permite o aprimoramento de atributos estéticos como tamanho, forma e durabilidade das flores, aspectos essenciais para a competitividade no mercado internacional (Dhooghe et al., 2011).

1.6 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação química estável e herdável, que desempenha papel fundamental na regulação epigenética dos organismos e constitui o mecanismo epigenético mais bem caracterizado em plantas (Kaeppeler et al., 2000). Esse processo consiste na adição covalente de um grupo metil (CH_3) ao carbono 5 do anel da base nitrogenada citosina, principalmente em dinucleotídeos CpG, mas também pode ocorrer em contextos CpHpG e CpHpH (sendo H = A, T ou C), o que confere ao genoma vegetal uma complexidade epigenética superior à observada em animais (Law & Jacobsen, 2010; Laird, 2010).

Em plantas, a metilação do DNA está associada a diversos processos regulatórios, incluindo silenciamento de genes, repressão de elementos transponíveis, imprinting genômico, respostas a estresses ambientais, e desenvolvimento de tecidos específicos, como flores, folhas e raízes (Zhang et al., 2018). Genes relacionados à morfogênese e diferenciação celular são frequentemente regulados por mecanismos epigenéticos, sendo a metilação um

dos principais moduladores da sua ativação ou repressão transcricional (Quinga, 2013; Baulcombe & Dean, 2014).

Particularmente em plantas poliploides, alterações nos padrões de metilação são eventos comuns e relevantes. A duplicação genômica pode induzir instabilidade epigenética, resultando em reprogramação do epigenoma, o que, por sua vez, pode influenciar significativamente a expressão gênica, a adaptação evolutiva e a estabilidade do genoma duplicado (Chen, 2007; Parisod et al., 2010).

Diante disso, o estudo do padrão de metilação em plantas submetidas à poliploidização artificial torna-se uma ferramenta essencial para a compreensão da dinâmica epigenética associada à duplicação cromossômica.

2. OBJETIVOS

- Comparar indivíduos naturais (diploides) de *Oncidium crispum* com indivíduos poliploides artificiais obtidos por indução com colchicina;
- Avaliar a eficácia de diferentes tratamentos com colchicina (0,05% e 0,1% por 4 e 7 dias) na indução de poliploidia em *O. crispum* cultivado in vitro;
- Caracterizar geneticamente os indivíduos tratados, utilizando técnicas como: contagem cromossômica; bandeamento cromossômico (DAPI); análise de conteúdo de DNA por citometria de fluxo.
- Analisar comparativamente o padrão de metilação do DNA de indivíduos diploides, poliploides e mixoploides.
- Avaliar condições de porcentagem geral de metilação, porcentagem de metilação da citosina externa do DNA e porcentagem de metilação da citosina interna do DNA.
- Contribuir com dados inéditos para a espécie *O. crispum* e demonstrar o potencial da poliploidia artificial como estratégia para gerar indivíduos com valor ornamental e comercial superior.
- Fornecer um modelo aplicável ao melhoramento de outras espécies de orquídeas tropicais com interesse ornamental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de plântulas de *Oncidium crispum*

As cápsulas de *Oncidium crispum* utilizadas neste estudo foram provenientes de material comercial adquirido junto a produtores regionais e continham sementes maduras. Inicialmente, cada cápsula foi submetida a um processo de desinfestação, sendo imersa em água corrente por um período de 10 minutos, a fim de remover impurezas superficiais. Em seguida, as cápsulas foram transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v), permanecendo por 10 minutos para desinfecção química. Posteriormente, procedeu-se à remoção do agente desinfetante por meio de três lavagens sequenciais, empregando água destilada previamente esterilizada em autoclave (120 °C, 1,2 atm, 15 minutos).

Todas as etapas subsequentes foram conduzidas em condições assépticas, no interior de uma câmara de fluxo laminar horizontal. As cápsulas foram cuidadosamente abertas e pequenas frações das sementes foram extraídas e inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 200 mL. Cada frasco continha 50 mL de meio de germinação constituído por fertilizante hidrossolúvel B&G® (contendo macro e micronutrientes essenciais) solidificado com 0,7% de ágar (p/v). A preparação do meio incluiu a dissolução dos componentes em água destilada e a posterior esterilização em autoclave (120 °C, 1,2 atm, 15 minutos), assegurando a eliminação de contaminantes microbianos. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob controle ambiental. As condições de cultivo incluíram temperatura constante de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz, e densidade de fluxo de fótons de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2 Indução de poliploides sintéticos em *Oncidium crispum*

Os explantes utilizados nesta etapa foram obtidos a partir de plântulas provenientes da germinação *in vitro* das sementes de *Oncidium crispum*. Após atingirem tamanho adequado para manipulação, esses explantes foram transferidos para frascos contendo meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS), formulado com a adição de 2% (p/v) de sacarose como fonte de carbono, 0,7% (p/v) de ágar como agente geleificante e $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carvão ativado para adsorção de compostos fenólicos liberados pelos tecidos.

Para a indução da poliploidia, o meio foi suplementado com colchicina em duas concentrações distintas: 0,05% e 0,1% (p/v). O tratamento foi conduzido por dois períodos de

exposição diferentes — quatro e sete dias — visando avaliar a resposta dos explantes a diferentes intensidades e durações de contato com o agente antimitótico.

Cada combinação de concentração de colchicina e tempo de exposição constituiu um tratamento experimental. Para cada tratamento, foram inicialmente utilizados oito explantes, mantidos sob as mesmas condições assépticas empregadas nas etapas anteriores, a fim de evitar contaminações e assegurar a integridade do experimento.

3.3 Avaliação do efeito da colchicina no desenvolvimento e na estabilidade genômica

Após um período de seis meses de cultivo *in vitro*, as plântulas resultantes dos tratamentos com colchicina foram submetidas à análise de citometria de fluxo para determinação do nível de ploidia. Esse parâmetro continuou a ser monitorado periodicamente, em intervalos regulares de três meses, a fim de avaliar a estabilidade genômica ao longo do tempo. Para a preparação das amostras destinadas à citometria de fluxo, procedeu-se à obtenção de suspensões nucleares segundo o método descrito por Dolezel et al. (1998), com adaptações. Folhas jovens de cada planta foram maceradas manualmente sobre uma placa de Petri utilizando uma lâmina de aço descartável, em presença de 450 µL tampão isolamento WPB (Loureiro et al., 2007), que mantém a integridade dos núcleos. A suspensão obtida foi aspirada com auxílio de pipeta de plástico, filtrada sequencialmente através de duas camadas de gaze para retenção de fragmentos maiores e, posteriormente, passada por uma membrana de nylon com porosidade de 50 µm, visando a remoção de detritos celulares e resíduos de tecidos. O material filtrado recebeu a adição de iodeto de propídio ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), corante intercalante específico para DNA, permitindo a quantificação da fluorescência emitida durante a análise. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo modelo CytoFLEX (Beckman & Coulter). Os valores obtidos foram comparados com dados de referência previamente estabelecidos para as mesmas amostras antes do processo de indução da poliploidização, seguindo os procedimentos recomendados por Dolezel e Bartos (2005).

Após essa caracterização, os indivíduos classificados como mixoploides e poliploides, bem como as plantas do grupo controle, foram mantidos separados e individualizados para as etapas de avaliação subsequentes, garantindo rastreabilidade e precisão na comparação entre tratamentos.

3.4 Caracterização cromossômica de plantas diploides e poliploides sintéticos de *Oncidium crispum*

A caracterização cromossômica foi conduzida com base na análise de, no mínimo, cinco metáfases por indivíduo, abrangendo três plantas do grupo controle, três indivíduos poliploides e três mixoploides. A seleção dos exemplares considerou tanto a qualidade das metáfases obtidas quanto a disponibilidade de material adequado para a análise citogenética. Os meristemas radiculares foram submetidos inicialmente a um pré-tratamento com solução de NaCl 62,5 mM, mantidos a 4 °C por 15 horas, conforme descrito por De Oliveira (2015), com o objetivo de interromper o ciclo celular em metáfase. Em seguida, as raízes foram lavadas em água destilada para remoção do excesso de sal e imediatamente fixadas em solução de etanol e ácido acético (3:1, v/v) por um período mínimo de 12 horas, para preservação da integridade cromossômica. Para a digestão enzimática da parede celular, as amostras radiculares foram tratadas com solução contendo pectinase (20%) e celulase (2%), mantidas a 37 °C por quatro horas. As lâminas citogenéticas foram preparadas pela técnica de dissociação celular seguida de secagem ao ar, de acordo com Carvalho (1993; 1997). A etapa de bandeamento cromossômico sequencial seguiu o protocolo de Schweizer (1976), com pequenas modificações. As lâminas, previamente selecionadas e envelhecidas por um período mínimo de três dias, foram coradas com solução de cromomicina A₃ (CMA, Sigma™) a 0,5 mg·mL⁻¹, preparada em tampão McIlvaine contendo 0,5 mM de MgCl₂. A coloração foi realizada em câmara úmida, no escuro e à temperatura ambiente, por uma hora. Após a coloração, o excesso de CMA foi removido por lavagem com água destilada, e aplicaram-se 30 µL de solução de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 2 µg·mL⁻¹ em tampão McIlvaine pH 7,0), permanecendo em contato por 30 minutos. O excesso de DAPI também foi removido com água destilada, e as lâminas, após secagem, foram montadas e seladas com meio antifade e lamínulas. A observação dos cromossomos e a detecção dos sinais fluorescentes foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51, utilizando filtros específicos para os comprimentos de onda de excitação e emissão de cada corante. As imagens obtidas foram registradas com câmera digital Olympus DP72 acoplada ao microscópio, garantindo documentação visual de alta resolução para posterior análise.

3.5 Caracterização do padrão de metilação do DNA de plantas diploides e poliploides sintéticos de *Oncidium crispum*

A análise comparativa do padrão de metilação do DNA foi realizada com o objetivo de identificar possíveis alterações epigenéticas decorrentes do processo de indução de

poliploidia em *Oncidium crispum*. Para isso, foram selecionados nove indivíduos no total, distribuídos em três grupos experimentais: três plantas diploides (grupo controle), três poliploides e três mixoploides. A escolha dos exemplares considerou a qualidade e integridade do material vegetal disponível, de modo a assegurar resultados confiáveis nas análises moleculares. Cada amostra vegetal foi submetida às etapas laboratoriais subsequentes de extração de DNA, digestão com enzimas sensíveis à metilação e amplificação seletiva, seguindo protocolos adequados para a detecção e comparação do padrão de metilação entre os grupos. Esses procedimentos visaram determinar a presença, ausência ou variação nos sítios de metilação citosina-específicos, permitindo a avaliação do impacto da poliploidização sobre a regulação epigenética do genoma.

3.5.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações para otimizar o rendimento e a pureza do material genético. Foram coletados aproximadamente 10 a 20 g de folhas jovens e frescas de cada indivíduo, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para preservação da integridade molecular e inibição de atividades enzimáticas degradativas. O tecido foliar congelado foi macerado até obtenção de um pó fino, ainda em presença de nitrogênio líquido, e transferido para microtubos de 2 mL. A cada amostra foram adicionados 1 mL de tampão CTAB pré-aquecido, seguido de incubação a 65 °C por 30 minutos, visando promover a lise celular e a solubilização de componentes lipídicos e proteicos. Após a incubação, adicionaram-se 600 µL de uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) para remoção de proteínas e outros contaminantes orgânicos. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante obtido foi cuidadosamente transferido para novos microtubos. A este volume, adicionou-se 8% do volume de acetato de amônio (7,5 M) e 54% do volume de isopropanol gelado, promovendo a precipitação seletiva do DNA. As amostras foram homogeneizadas por inversão e mantidas a -20 °C por 30 minutos. O DNA precipitado foi recuperado por centrifugação (14.000 rpm, 10 minutos), e o sobrenadante descartado. Os pellets obtidos foram lavados sequencialmente com etanol gelado a 70% e 95%, cada lavagem seguida de centrifugação por 10 minutos, para remoção de sais e resíduos de solventes. O material genético purificado foi ressuscitado em 100 µL de água ultrapura estéril. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram verificadas por meio de espectrofotometria em

nanodrop (Nanodrop™) e por eletroforese em gel de agarose a 1%, permitindo a avaliação da integridade e pureza das amostras para posterior aplicação nas análises de metilação.

3.5.2 Análise do perfil de metilação do DNA utilizando enzimas sensíveis à metilação e marcadores ISSR (MS-ISSR)

A avaliação do padrão de metilação de citosinas no DNA genômico foi conduzida por meio da técnica de MS-ISSR (Methylation-Sensitive Inter Simple Sequence Repeat). O DNA previamente extraído e quantificado foi diluído em água ultrapura estéril até atingir a concentração de trabalho de 25 ng·μL⁻¹. Para cada amostra, aproximadamente 250 ng de DNA foram submetidos à digestão enzimática com 5 U de *HpaII* ou *MspI*, utilizando 1× tampão específico e água ultrapura, em volume final de 50 μL. As reações de digestão foram conduzidas a 37 °C por 2 horas. Em paralelo, alíquotas de DNA não digeridas foram mantidas para servir como controle da amplificação. Tanto as amostras digeridas quanto as não digeridas foram amplificadas por PCR com primers ISSR universais. Inicialmente, 15 primers foram avaliados, sendo selecionados os 5 mais polimórficos para as análises comparativas. As reações de PCR foram preparadas em volume final de 25 μL, contendo: 5 μL de tampão GoTaq® Flexi, 0,5 μM de primer, 0,15 mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 3 mM de MgCl₂ e 15 ng de DNA molde. O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida por ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento na temperatura específica para cada primer por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 2 minutos. Após 35 ciclos, foi realizada uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em géis de agarose a 2% preparados em tampão 1× TBE, contendo o corante intercalante SYBR® Safe DNA gel stain. A visualização foi realizada em transiluminador UV, e o tamanho dos fragmentos foi estimado com base em marcador de 100 pb (Amresco®).

Para a quantificação do percentual de metilação, os perfis de bandas foram transformados em uma matriz binária, atribuindo valor 1 para presença e 0 para ausência de cada fragmento de tamanho similar (Tabela 1). Apenas bandas reprodutíveis e consistentes foram consideradas, conforme critérios de Sasheva e Grossniklaus (2017). Os padrões de metilação foram avaliados comparando-se o grupo controle com os grupos tratados (poliploides e mixoploides) por meio do teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$). Foram realizadas três comparações independentes: (i) controle × poliploides; (ii) controle × mixoploides; e (iii) mixoploides × poliploides. Para cada comparação, analisaram-se três parâmetros: percentual de metilação da citosina externa, percentual de metilação da citosina interna e percentual total

de metilação (soma dos dois tipos). Nas comparações envolvendo o grupo controle, a média dos valores de metilação observados nos indivíduos diploides foi considerada como valor esperado, enquanto os valores obtidos nos indivíduos tratados foram considerados observados. Para a comparação entre mixoploides e poliploides, a média dos valores do grupo poliploide foi utilizada como valor esperado, e os valores do grupo mixoploide, como observados.

Tabela 1: Estratégia utilizada para interpretar os diferentes padrões de bandas e quantificar o percentual de metilação do genoma de diploides e tetraploides sintéticos de *Oncidium crispum*. DNAnd = DNA não digerido pelas enzimas de restrição.

Padro de bandas DNAnd // Msp I // Hpa II	Sítio de restrição	Interpretação
1//1//1	5'CCGG3'	Citosina não metilada
1//1//0	5'CmCGG3'	Metilação na citosina interna
1//0//1	5'mCCGG3'	Metilação na citosina externa
1//0//0	5'mCmCGG3'	Metilação em ambas as citosinas ou
	5'CCNG3'	mutação desconhecida

Fonte: Adaptado de Guevara et al. (2017).

3.6 Aclimatização de mudas de *Oncidium crispum*

Foram selecionadas plântulas com folhas bem desenvolvidas, apresentando comprimento médio de aproximadamente 5 cm, e sistema radicular ativo, com raízes de cerca de 3,5 cm, sem sinais de necrose ou desidratação. O procedimento de aclimatização iniciou-se com a retirada cuidadosa das plântulas dos frascos, seguida da lavagem das raízes em água corrente para a remoção completa dos resíduos de meio de cultura. As plântulas foram inicialmente transplantadas para copos descartáveis de 50 mL contendo água, mantidas dentro de sacos plásticos tipo ziplock para preservar a umidade (Figura 2). A aclimatação foi realizada de forma gradual: após uma semana, um dos lados do saco foi aberto; na semana seguinte, abriu-se o outro lado; e, na terceira semana, o saco foi totalmente removido (Figura

3). Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos plásticos de 2L, utilizando como substrato casca de pinus média previamente lavada e tratada (Figura 4 e Figura 5). Os vasos foram mantidos em ambiente protegido, submetidos a irrigação regular, e as plantas foram monitoradas quanto ao crescimento vegetativo, adaptação e ausência de sinais de estresse ou doenças.



Figura 2- Plantas de *Oncidium crispum* em fase de aclimatização, mantidas sob cobertura com saco ziplock para controle de umidade. Escala: 1cm.



Figura 3- Plantas controle de *Oncidium crispum* em estágio avançado de aclimatização, mantidas sem cobertura plástica (saco ziplock). Escala: 1cm.



Figura 4- Mudas de *Oncidium crispum* cultivadas em substrato, mantidas em casa de vegetação. Escala: 1,5 cm.

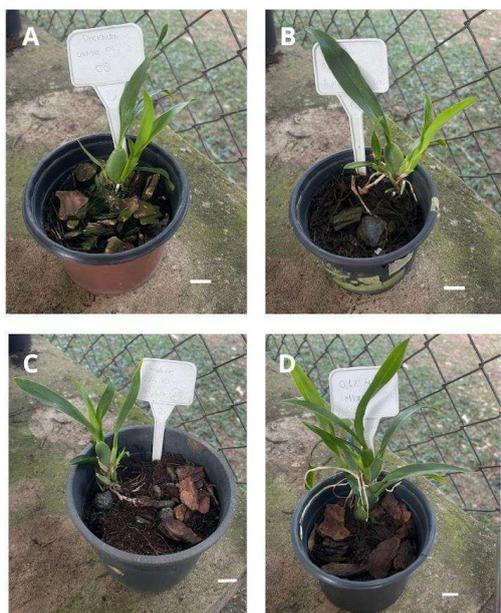


Figura 5- A: Planta controle; B: Planta diploide submetida ao tratamento de duplicação, porém sem alteração no nível de ploidia (0,05% por 7 dias); C: Planta poliploide obtida após tratamento com 0,1% por 7 dias; D: Planta mixoploide resultante do tratamento 0,1% por 4 dias. Escala: 1,5 cm.

4. RESULTADOS

4.1 Quantificação do conteúdo de DNA e verificação da estabilidade genômica em *Oncidium crispum*

A determinação do conteúdo de DNA nuclear foi conduzida tanto para plantas controle quanto para as submetidas aos diferentes tratamentos com colchicina, quando estas atingiram porte adequado para a análise por citometria de fluxo. Em todos os tratamentos avaliados, foi possível identificar indivíduos com ploidia original (diploides) (Figura 6.B) e indivíduos com duplicação cromossômica (poliploides) (Figura 6.A), evidenciando que a poliploidização foi efetivamente induzida. Além desses, também foram detectados indivíduos mixoploides.

Considerando o total de 266 plantas analisadas, 118 (44%) mantiveram o nível diploide, 82 (31%) apresentaram condição mixoploide e 66 (24,8%) exibiram conteúdo de DNA compatível com a tetraploidia, correspondendo a uma taxa de indução de poliploidia próxima a 25%. Entre os tratamentos, a aplicação de colchicina a 0,1% durante quatro dias apresentou maior eficiência na obtenção de poliploides (Tabela 2). Os poliploides artificiais apresentaram, em média, 6,76 pg de DNA, aproximadamente o dobro do valor encontrado para os indivíduos controle (3,58 pg) (Figura 7). Até o momento, todos os poliploides mantiveram a estabilidade de sua ploidia. No grupo dos mixoploides, nove plantas reverteram ao estado diploide e duas atingiram a condição tetraploide.

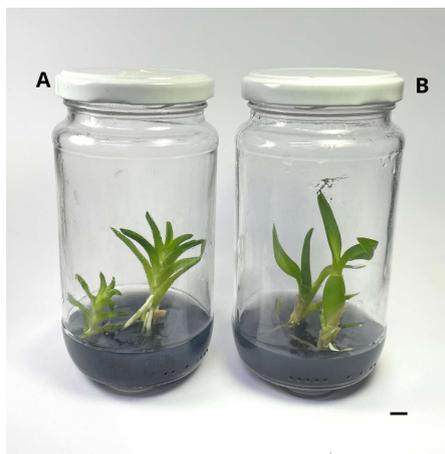


Figura 6- Diferença morfológica entre indivíduos poliploides e diploides cultivados in vitro. A: Indivíduo poliploidia obtido por tratamento com 0,1% de colchicina por 4 dias; B: Indivíduo controle (diploide). Escala: 1cm.

Tabela 2- Número de indivíduos obtidos em cada tratamento de indução de poliploidia

Tratamento	0,05%4D	0,05%7D	0,1%4D	0,1%7D	Total
2x (diploides)	16	23	39	40	118
4x (tetraploides)	3	10	30	23	66
Mix (mosaicos)	5	15	37	25	82
Total	24	48	106	88	266

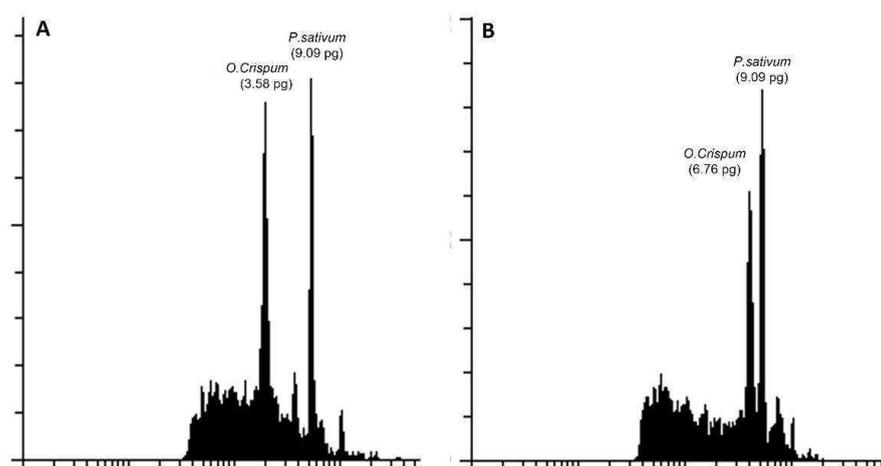


Figura 7- Histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo. A: Indivíduo diploide; B: Indivíduo poliploidia artificial.

4.2 Análise cromossômica de plantas diploides e poliploides sintéticos de *Oncidium crispum*

As observações citogenéticas revelaram que os indivíduos controle apresentaram número cromossômico de $2n = 58$ (Figura 8.A), enquanto os poliploides exibiram $2n = 116$

cromossomos (Figura 8.B), confirmando a duplicação cromossômica obtida via tratamento com colchicina.

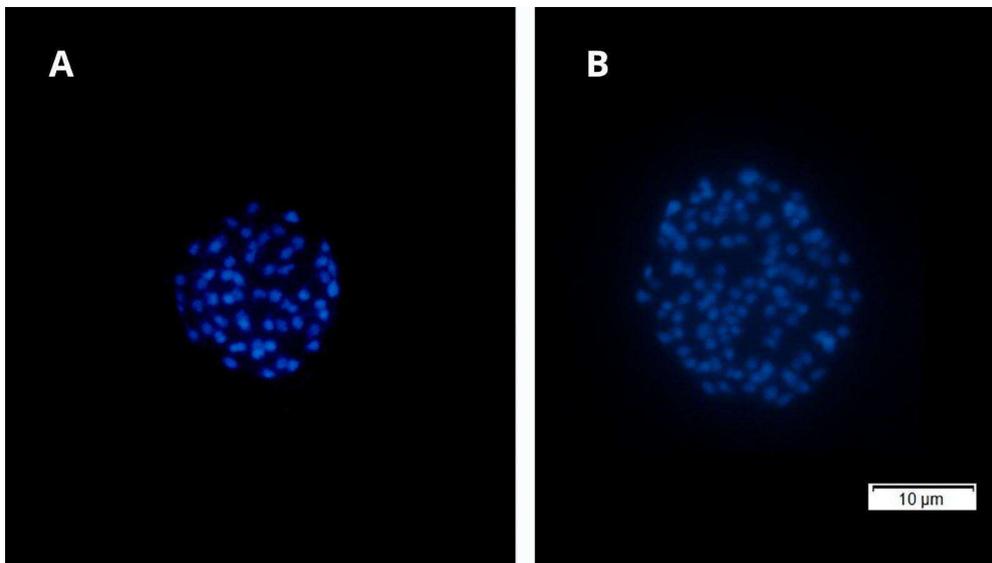


Figura 8- Metáfases representativas de *Oncidium crispum*: A: citótipo diploide ($2n = 58$); B: citótipo tetraploide ($2n = 116$).

4.3 Avaliação do padrão de metilação do DNA em plantas diploides, poliploides e mixoploides de *Oncidium crispum*

A análise do padrão de metilação (Figura 9) revelou diferenças entre os grupos. Nos indivíduos controle, não foi detectada metilação na citosina interna, característica que, por outro lado, esteve presente tanto nos poliploides quanto nos mixoploides (Figura 10). Em contrapartida, a metilação da citosina externa foi identificada apenas nos indivíduos diploides, estando ausente nas plantas submetidas à duplicação do DNA.

Quanto à porcentagem total de metilação (citosina interna + citosina externa), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre diploides e poliploides. Além disso, a porcentagem de metilação da citosina interna não diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre mixoploides e poliploides.

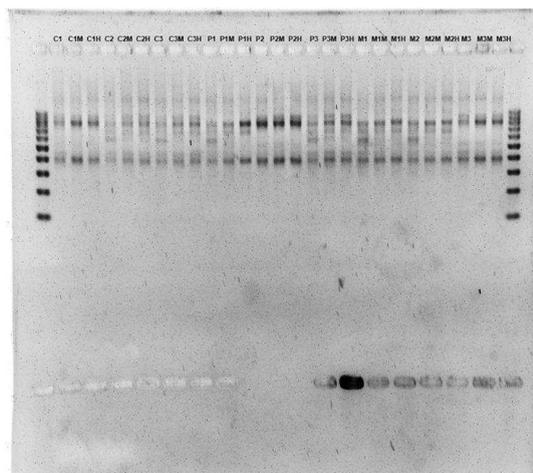


Figura 9- Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA de *Oncidium crispum* digeridas com as enzimas MspI e HpaI e amplificadas com primers ISSR universais. (Gel superior: C: controle; P: poliploide; M: DNA digerido com MspI; H: DNA digerido com HpaI; 1-3 representam diferentes indivíduos).

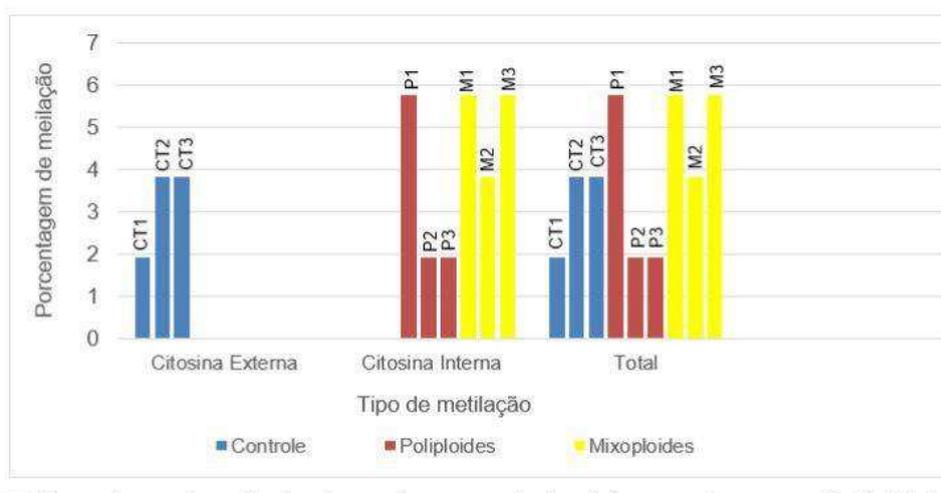


Figura 10- Porcentagem de metilação observada para as citosinas interna e externa, e metilação total em indivíduos controle (diploide), poliploides sintéticos (tetraploide) e mixoploides de *Oncidium crispum*.

5. DISCUSSÃO

A multiplicação bem-sucedida das plantas *in vitro* foi evidenciada pela obtenção de 266 mudas a partir de apenas 32 protocormos iniciais, correspondendo a oito explantes por tratamento e período de exposição. Tal resultado reforça a eficácia do protocolo de micropropagação desenvolvido, que oferece condições rigorosamente controladas e padronizadas, superiores às encontradas em ambientes convencionais como casas de vegetação (Dhooghe et al., 2011; Murashige, 1974). Além disso, essa metodologia possibilita

a indução eficiente da duplicação cromossômica mediante o uso de agentes antimitóticos, como a colchicina, amplamente utilizada para esse fim (Sá, 2019; Kaushal et al., 2020). A relevância dessa abordagem se intensifica ao considerar que orquídeas são plantas economicamente valiosas, porém apresentam taxas naturalmente baixas de germinação e propagação sexuada lenta (Nunes, 2021; Sheikholeslam & Weeks, 1987).

Até o momento, a literatura não registra a indução artificial de poliploides em *Oncidium crispum*. Embora a eficiência dessa indução seja geralmente dependente de características específicas de cada espécie, o uso de protocormos — tecidos jovens formados a partir da germinação *in vitro* e constituídos por embriões em estágio inicial — tem se mostrado eficaz em gêneros relacionados, como *Dendrobium*, *Cattleya*, *Epidendrum*, *Odontioda*, *Oncidium* e *Phalaenopsis* (Silva et al., 2000; Atichart & Bunnag, 2007; Unemoto et al., 2009; Manzoor et al., 2019; Niazian et al., 2020; Chen et al., 2022). Estes tecidos são particularmente indicados para indução de poliploidia devido à elevada taxa de divisão mitótica, característica que favorece a ação dos antimitóticos (Kuznetsova et al., 2019).

A duplicação cromossômica induzida em *O. crispum* apresentou-se eficiente, com aproximadamente 25% dos protocormos tratados confirmados como poliploides pela análise de citometria de fluxo — método padrão ouro para avaliação do sucesso da poliploidização (Dhooghe et al., 2011; Dias, 2016; Roco et al., 2015). Contudo, é importante salientar que a indução de poliploidia geralmente está associada a baixa eficiência e produção significativa de mixoploides e aneuploides, fenômenos que refletem a complexidade do processo e a sensibilidade dos tecidos aos agentes químicos (Neves, 2017; Van Laere et al., 2019). Segundo Dhooghe et al. (2011), as taxas de sucesso em diferentes estudos oscilam amplamente, entre 15 e 55%, em parte devido às variações metodológicas e critérios utilizados para avaliação. Assim, o índice de 25% obtido para *Oncidium crispum* pode ser considerado relativamente alto, confirmando a viabilidade e eficácia do protocolo desenvolvido para esta espécie.

Estudos que abordam a estabilidade do nível de ploidia em plantas poliploides e mixoploides são ainda limitados quando comparados ao vasto número de publicações sobre a indução de poliploidia (Julião, 2017; Soltis et al., 2016). A estabilização do número cromossômico após a indução artificial de poliploidia é um processo gradual, que demanda tempo e requer a identificação rigorosa de descendentes estáveis em relação ao seu cariótipo (Väinölä, 2000; Blasco et al., 2015; Ramsey & Schemske, 1998). Diversos estudos indicam que muitas espécies diploides atuais têm origem em ancestrais poliploides que, ao longo do tempo, passaram por processos de diploidização — uma redução cromossômica progressiva

mediada por falhas nos mecanismos que garantem o pareamento bivalente entre cromossomos homólogos (Comai, 2005; Rauf et al., 2021; Soltis & Soltis, 1999). Tais falhas podem resultar na produção frequente de gametas aneuploides e, conseqüentemente, na redução da fertilidade, o que reforça a percepção da instabilidade genética dos poliploides artificiais.

A instabilidade do nível de ploidia em plantas tetraploides já foi observada em espécies como *Acacia mangium* (Harbard et al., 2012) e *Centella asiatica* (Kaensaksiri et al., 2011), enquanto que em outros casos, a estabilidade tem sido confirmada após períodos prolongados de cultivo. Por exemplo, Julião (2017) relatou estabilidade em tetraploides sintéticos de *Lippia alba* após três anos do tratamento, e Blasco et al. (2015) demonstraram estabilidade em *Eriobotrya japonica* um ano após indução. Os resultados deste estudo indicam que *Oncidium crispum* pode se inserir neste segundo grupo, pois todas as análises realizadas evidenciam a manutenção estável dos níveis ploidiais dos poliploides gerados.

Após a citometria de fluxo, a contagem cromossômica é o método mais acurado para confirmar a poliploidia, pois possibilita a determinação precisa do número cromossômico (Dhooghe et al., 2011; Doležel & Bartoš, 2005). No caso de *O. crispum*, apesar da escassez de estudos citogenéticos, o número cromossômico diploide clássico é descrito como $2n = 56$, sendo este valor encontrado em 46% das espécies do gênero (Felix & Guerra, 2000). Contudo, este estudo identificou um número diploide ligeiramente diferente, com $2n = 58$ cromossomos. Já as plantas poliploides apresentaram aproximadamente $2n = 116$ cromossomos, confirmando a duplicação cromossômica esperada após o tratamento antimitótico.

De maneira geral, os estudos cariotípicos em *Oncidium* são escassos, mesmo com o reconhecimento do gênero como economicamente importante e relevante do ponto de vista evolutivo. As contagens cromossômicas disponíveis mostram variações significativas, com números haploides que vão de $n = 13$ até $n = 84$, refletindo uma grande diversidade cromossômica no gênero (Tanaka & Kamemoto, 1984; Felix & Guerra, 2000; Kondo et al., 2019). A determinação do número haploide para *O. crispum* no presente estudo encontra-se em concordância com essa ampla faixa de variação.

Apesar da precisão da contagem cromossômica, este método é conhecido por ser trabalhoso e demorado, uma vez que envolve o preparo cuidadoso de amostras e análise microscópica de células em divisão ativa, geralmente obtidas de pontas de raízes ou meristemas (Bohanec, 2003; Doležel et al., 2007). Por isso, as técnicas citogenéticas complementares, como o bandeamento cromossômico, têm se mostrado valiosas para

melhorar a resolução e a interpretação dos cariótipos, embora ainda careçam de maior aplicação e refinamento no estudo da família Orchidaceae (Schwarzacher & Heslop-Harrison, 2000; Souza et al., 2017).

A citogenética molecular representa uma ferramenta essencial na sistemática vegetal, pois possibilita a elucidação das relações filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos, desde espécies e gêneros até famílias e divisões (Stebbins, 1971; Guerra, 2000; Weiss-Schneeweiss & Schneeweiss, 2013).

A análise cariotípica, que inclui a avaliação do número, tamanho dos cromossomos, relação entre braços cromossômicos e presença de constrições secundárias ou satélites, contribui significativamente para a compreensão da diversidade intraespecífica e para o estabelecimento de comparações entre espécies (Guerra et al., 1997; Venora & Padulosi, 1997). Em *Oncidium crispum*, a presença de $2n = 58$ cromossomos em plantas diploides e $2n = 116$ em plantas poliploides foi confirmada.

A citometria de fluxo é uma técnica avançada que permite a análise rápida e precisa das propriedades ópticas de partículas em suspensão, fundamentando-se no isolamento dos núcleos celulares seguido de coloração com fluorocromos específicos, que possibilitam a detecção por meio da fluorescência emitida (Doležel et al., 2007; Roco et al., 2015). Entre suas principais vantagens destacam-se a agilidade no preparo das amostras e a possibilidade de analisar milhares de núcleos em um curto intervalo de tempo, aumentando a confiabilidade estatística dos resultados. No presente estudo, a quantificação do conteúdo de DNA revelou valores médios de 3,58 pg para os indivíduos diploides e 6,76 pg para os poliploides, evidenciando a duplicação do genoma conforme esperado.

Nos últimos anos, a metilação do DNA genômico tem despertado crescente interesse na comunidade científica, devido à sua relevância na regulação epigenética do desenvolvimento em organismos vegetais e animais (Law & Jacobsen, 2010; Zhang et al., 2018). Em plantas, modificações no padrão de metilação têm sido associadas a diferentes fases do desenvolvimento, incluindo a competência morfogênica in vitro, que influencia diretamente o sucesso de processos como a regeneração e a indução de poliploidia (Noceda et al., 2009; Niederhuth & Schmitz, 2017). A metilação pode afetar a expressão de múltiplos genes simultaneamente, aumentando a variabilidade fenotípica e a plasticidade das características quantitativas (Jain, 2001; Zhang et al., 2018).

Embora a porcentagem total de metilação do DNA não tenha apresentado diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos controle (diploides) e os poliploides, foi possível observar uma alteração qualitativa no padrão de metilação. Nos diploides, a

metilação ocorreu predominantemente em citosinas externas, enquanto em poliploides e mixoploides a metilação ocorreu preferencialmente em citosinas internas, indicando uma modificação substancial no perfil epigenético decorrente da duplicação genômica (Finnegan et al., 2000; Niederhuth & Schmitz, 2017).

Estudos avaliando o padrão de metilação especificamente em indivíduos mixoploides são raros, possivelmente devido à instabilidade genética e fenotípica que geralmente levam ao descarte dessas plantas em programas de melhoramento (Javadian et al., 2017; Greilhuber et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram, de forma eficiente, a viabilidade da indução de poliploidia *in vitro* em *Oncidium crispum* por meio de tratamentos com colchicina, com taxa de sucesso próxima a 25%. A duplicação cromossômica foi confirmada por análises citogenéticas, nas quais indivíduos diploides e poliploides apresentaram 58 e aproximadamente 116 cromossomos, respectivamente, além de diferenças no conteúdo de DNA nuclear. Esses dados representam a primeira caracterização citogenética associada à poliploidia artificial na espécie, contribuindo significativamente para o conhecimento básico sobre sua biologia e potencial de melhoramento. Adicionalmente, a análise do padrão de metilação do DNA revelou modificações epigenéticas relevantes nos indivíduos poliploides e mixoploides quando comparados aos diploides. Embora a porcentagem total de metilação não tenha diferido significativamente entre diploides e poliploides, observou-se que os diploides apresentaram metilação apenas na citosina externa, enquanto nos poliploides e mixoploides a metilação ocorreu exclusivamente na citosina interna, indicando uma reprogramação epigenética relacionada à duplicação do genoma. Destaca-se, ainda, que este é um dos poucos estudos a avaliar o padrão de metilação em indivíduos mixoploides, cuja instabilidade pode explicar a maior variabilidade epigenética observada. Assim, este trabalho não apenas confirmou a possibilidade de obtenção de poliploides sintéticos em *O. crispum*, como também evidenciou alterações epigenéticas associadas ao processo de poliploidização. Tais informações são fundamentais para a compreensão dos efeitos genômicos e epigenéticos da duplicação cromossômica e oferecem subsídios importantes para programas de melhoramento genético e para a exploração comercial de novas variedades ornamentais.

REFERÊNCIAS

- ARDITTI, J. *Fundamentals of Orchid Biology*. New York: Wiley, 1992.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. *Micropropagation of orchids*. New York: Wiley, 1993.
- ARDITTI, J. *Micropropagation of orchids: a comprehensive review and bibliography*. Springer, 2008.
- ATICHART, P.; BUNNAG, S. Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. by in vitro techniques. *Thai J Agric Sci*, v. 40, n 1-2, p. 91-95, 2007.
- ATICHART, A.; BUNNAG, S. Induction of polyploidy in orchids using colchicine treatment. *Scientia Horticulturae*, v. 111, n. 2, p. 100-105, 2007.
- BATEMAN, R. M.; JAMES, K. E.; RUDALL, P. J. Orchid diversity and adaptation. *Annals of Botany*, v. 121, n. 4, p. 505-515, 2018.
- BATEMAN, R. M.; FLEISCHER-DIXON, K. W.; OLMSTEAD, R. G. Molecular systematics of Oncidiinae: towards a better understanding of *Oncidium* and allied genera. *Annals of Botany*, v. 92, n. 2, p. 241-255, 2003.
- BAULCOMBE, D.; DEAN, C. Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. 9, a019471, 2014.
- BEAULIEU, J. M. et al. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist*, v. 179, n. 4, p. 975-986, 2008.
- BEAULIEU, J. M. et al. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist*, v. 179, n. 4, p. 975-986, 2008.
- BLASCO, M. et al; Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 120, n.2, p. 453-461, 2015.
- BLASCO, M.; LÓPEZ-CORRALES, M.; MARTÍNEZ, V. Chromosome stability in synthetic tetraploid *Eriobotrya japonica*. *Plant Science*, v. 239, p. 11-19, 2015.

BOHANEK, B. Ploidy determination using flow cytometry. In: Doubled haploid production in crop plants: a manual. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 397-403. 2003.

BOHANEK, B. Cytogenetics in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution*, v. 239, n. 3-4, p. 93-105, 2003.

BORBA, E. L.; SEMIR, J. Oncidium: aspects of ecology and evolution. *Orchid Research Newsletter*, v. 29, p. 8-13, 1998.

BORDIGNON, T. Poliploidia sintética em *Oncidium crispum* Lodd. (Orchidaceae), uma orquídea de interesse ornamental. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. p.30-34, 40-41. 2024

CARDOSO, E. A. Melhoramento genético em orquídeas do gênero *Oncidium*: potencial e desafios. *Revista Brasileira de Orquidicultura*, v. 14, n. 2, p. 120-135, 2014.

CARDOSO, J. C. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Botucatu: potencial ornamental e cultivo. *Horticultura Brasileira*, v.32, n. 07-13, 2014.

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

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

CAVALIER-SMITH, T. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *Journal of Cell Science*, v. 75, p. 303-334, 1985.

CHASE, M. W. et al. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 177, n. 2, p. 151–174, 2015.

CHEN, Z. J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology*, v. 58, p. 377–406, 2007.

CHEN, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q. Epigenetic variation in polyploid plants: mechanisms and implications. *Plant Cell Reports*, v. 36, n. 3, p. 383-399, 2017.

- CHEN, W.; WU, J.; LIN, X. Advances in orchid biotechnology: micropropagation and genetic transformation. *Plant Cell Reports*, v. 40, p. 523–536, 2021.
- CHEN, J. T. et al. Micropropagation of *Anoectochilus formosanus*. *Biologia Plantarum*, v. 48, n. 4, p. 573–576, 2004.
- CRIBB, P. J.; KELL, S. P.; DIXON, K. W.; BARRETT, R. L. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu: Natural History Publications, 2003.
- COMAI, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, p. 836-846, 2005.
- DE, L. C.; PATHAK, P.; RAO, A. N.; RAJEEVAN, P. K. Orquídeas medicinais e aromáticas. In: DE, L. C. (Org.). *Orquídeas comerciais*. Warsaw: De Gruyter Open, 2015.
- DE MELO, N. F. Citogenética vegetal aplicada à taxonomia e ao melhoramento. 2004.
- DRESSLER, R. L. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- DHOOGHE, E. et al. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 104, p. 359–373, 2011.
- DIAS, R. Z. Poliploidização induzida in vitro, como estratégia biotecnológica para a otimização da cultura de eucalipto. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016
- DOLEZEL, J. et al; (Ed.). Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. John Wiley & Sons, 2007.
- DOLEZEL, J. et al. Estimativa do tamanho do genoma vegetal por citometria de fluxo: comparação interlaboratorial. *Anais de Botânica*, v.82, n. supl_1, pág. 17-26, 1998.
- FAY, M. F. Orchid conservation: priorities and challenges. *Botanical Studies*, v. 59, p. 16, 2018.
- FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of *Cymbidioid orchids*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 957-978, 2000.

- FELIX, L. P.; GUERRA, M. Chromosome numbers in Orchidaceae from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 132, n. 2, p. 175-180, 2000.
- FINNEGAN, E. J.; GENGER, R. K.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 51, p. 93-111, 2000.
- FRAGA, Hugo Pacheco de Freitas et al.. Efeitos da 5-acactidina na embriogenese somática de *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret e nos níveis de metilação do Dna. 2012.
- GANTAIT, S.; DAS, A.; GUPTA, S. A review on culture media optimization for orchid propagation: advances and prospects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 144, p. 511–528, 2021.
- GARCIA, L.; SILVA, M.; RAMOS, J. Cytogenetic analysis of *Oncidium altissimum*: banding patterns and genome organization. *Cytologia*, v. 84, n. 2, p. 123-130, 2019.
- GIVNISH, T. J. et al. Orchid phylogenomics and the evolution of floral diversity. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 282, n. 1814, p. 20151553, 2015.
- GOVAERTS, R.; WILKIN, P.; SANTOS-GUERRA, A. World Checklist of Orchidaceae. Kew: Royal Botanic Gardens, 2021.
- GREILHUBER, J.; EBERT, I.; DOLEŽEL, J. Genome size variation and polyploidy in plants: implications and applications. *Botanical Review*, v. 79, n. 4, p. 375-399, 2013.
- HARBARD J. et al. Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. *Forestry* 85, 427-436, 2012.
- HARBARD, J.; ONG, C.; WADE, H. Chromosome instability in synthetic tetraploids of *Acacia mangium*. *Tree Genetics & Genomes*, v. 8, n. 3, p. 587-596, 2012.
- HOSSAIN, M. M. et al. Aplicação da biotecnologia às orquídeas. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 32, p. 69–139, 2013.
- JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, v.118, p. 153-166, 2001.

JAVADIAN, N.; HABIBI, F.; REZAI, M. Mixoploidy and its implications in plant breeding programs. *Plant Breeding*, v. 136, n. 4, p. 521-529, 2017.

JULIÃO, S. A. Avaliação da estabilidade genômica em acessos naturais e sintéticos de *Lippia alba* (MILL.) NE Br. (Verbenaceae). 2017.

KAENSAKSIRI, S.; BOONKERD, N.; LIMSUWAN, T. Cytogenetic instability in synthetic tetraploids of *Centella asiatica*. *Caryologia*, v. 64, n. 3, p. 291-296, 2011.

KAEPPLER, S. M. et al. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, v. 43, n. 2-3, p. 179–188, 2000.

KENTON, A. Chromosome banding techniques in plant cytogenetics. *Journal of Plant Research*, v. 91, n. 1, p. 25-42, 1978.

KRITTIYA, N.; KISANA, B.; HUEHNE, P. Um sistema de transferência de genes diretos para orquídeas *Oncidium*, uma cultura difícil para a transformação genética. *Agriculture and Natural Resources*, v. 52, p. 424–442, 2018.

KUZNETSOVA, I.; SHAVRUKOV, Y.; KONSTANTINOVA, T. Mitotic activity and polyploid induction in Orchidaceae: A review. *Plant Cell Reports*, v. 38, n. 5, p. 497-509, 2019.

LAIRD, P. W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 191–203, 2010.

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 204–220, 2010.

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

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

LEVIN, D. A. *The Origin, Expansion, and Demise of Plant Species*. Oxford University Press, 2002.

- LOUREIRO, J. et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a teste with 37 species. *Annals of botany*, v. 100, n. 4, p. 875-888, 2007.
- MADLUNG, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*, v. 110, p. 99-104, 2013.
- MADLUNG, A. et al. Genomic changes in synthetic Arabidopsis polyploids. *The Plant Journal*, v. 41, n. 2, p. 221-230, 2005.
- MANZOOR, M.; SULTAN, M. T.; QURESHI, R. A. Polyploid induction and characterization in *Dendrobium* orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 137, n. 1, p. 103-112, 2019.
- MANZOR, A. et al. Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. *Plants*, v.8, n.7, p. 194, 2019.
- MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 87, p. 273–280, 2006.
- MONDIN, M. et al. Citogenética vegetal enfatizando a família *Orchidaceae*. *Orchidstudium*, v.4, p. 24-54, 2006.
- MURASHIGE, T. et al. Um meio para crescimento rápido e bioensaios com culturas de tecidos de tabaco. *Fisiologia plantarum*, v. 3, pág. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 25, n. 1, p. 135-166, 1974.
- NEVES, C. S. Duplicação cromossômica em plantas: *Solanum melongena* L. como modelo. 2017.
- NIAZIAN, M.; et al. Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 142, n. 3, p. 447-469, 2020.

NIEDERHUTH, C. E.; SCHMITZ, R. J. Putting DNA methylation in context: from genomes to gene expression in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1860, n. 1, p. 149-156, 2017.

NOCEDA, C.; SALAJ, T.; PÉREZ, M.; VIEJO, M.; CAÑAL, M. N.; SALAJ, J.; RODRIGUEZ, R. DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees* 23: 1285-1293, 2009.

NOCEDA, C.; SCHMIDT, O.; KEILWAGEN, J. DNA methylation dynamics during in vitro morphogenesis. *Plant Cell Reports*, v. 28, n. 3, p. 345-354, 2009.

NONGDAM, P.; CHONGTHAM, N. In vitro propagation of rare and endangered medicinal plants of northeast India: a review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, v. 3, n. 13, p. 703–713, 2011.

NUNES, G. P. et al. Meios de cultivo e sistemas de micropropagação no crescimento in vitro e estabelecimento ex vitro de orquídeas nativas do Cerrado. 2021.

NUNES, A. P. Propagação e conservação de orquídeas: avanços e desafios. *Revista Brasileira de Horticultura*, v. 39, n. 2, p. 75-88, 2021.

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

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

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. *Genera Orchidacearum*. Vol. 6. Oxford: Oxford University Press, 2014.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. *Genera Orchidacearum*, Vol. 5: Epidendroideae (Part Two). Oxford: Oxford University Press, 2005.

PARISOD, C. et al. Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytologist*, v. 186, p. 37–45, 2010.

QUINGA, M. C. L. *Metilação do DNA: fundamentos e aplicações na biotecnologia vegetal*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2013.

- RASMUSSEN, H. N. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- RAVI, M.; CHAN, S. W. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, v. 464, p. 615-618, 2010.
- RAUF, S. et al. Induced Polyploidy: A Tool for Forage Species Improvement. *Agriculture* 2021, 11, 210. 2021.
- RAUF, S.; AHMAD, F.; KHAN, S. Chromosome pairing failure and its impact on fertility in polyploids. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, art. 678913, 2021.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 29, p. 467-501, 1998.
- ROSIM, Mauro. *Oncidium crispum* (Lodd. ex Lindl.). 2013. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/rosim/11343046865>>. Acesso em: 18 ago. 2025.
- ROCO, Á.; COATE, J. E.; KOH, J. The role of cytometry in plant genome size and ploidy determination. *Plant Methods*, v. 11, n. 1, p. 10, 2015.
- RODRIGUES, J. D. et al. Efeitos de fontes de Silício e diferentes meios de cultura na propagação in vitro de orquídeas. *Ornamental Horticulture*, v. 13, p. 810-813, 2007.
- ROY, J. et al. Efficient micropropagation of Dendrobium orchids through shoot tip culture. *Biologia Plantarum*, v. 54, n. 1, p. 47–52, 2010.
- SÁ, T. S. A.M. Micropropagação, embriogênese somática, conservação in vitro e duplicação cromossômica em *Cattleya tigrina* A. Richa, 2019.
- SÁ, M. F. Indução química de poliploidia em plantas ornamentais: técnicas e aplicações. *Revista Brasileira de Genética*, v. 42, n. 4, p. 243-256, 2019.
- SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. *Practical in situ hybridization*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000.
- SILVA, R. S.; PEREIRA, T. L.; SANTOS, M. M. Crescimento e desenvolvimento de *Oncidium crispum* em diferentes condições de cultivo. *Acta Botanica Brasilica*, v. 31, n. 4, p. 677-684, 2017.

SILVA JR., F. J. *Bases moleculares e epigenéticas da poliploidia em plantas superiores*. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SILVA, K. M. Citogenética da subtribo onciidiinae. 2020.

SILVA, P. A. K. X. de et al. Indução de poliploidia em mandioca. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2014.

SILVA, J.; CARVALHO, P.; SILVA, L. Induction of polyploidy in orchid species: methodologies and applications. *Journal of Orchid Research*, v. 7, n. 2, p. 15-22, 2000.

SIMIONI, C. *Estudos citogenéticos e fisiológicos em poliploides induzidos de Brachiaria*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual de Maringá, 2004.

SOTO ARENAS, M. A.; DRESSLER, R. L. Orchidaceae economic importance. In: *The Plant Kingdom*. Nova Science Publishers, 2010. p. 157-179.

SOLTIS, D. E. et al. The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*, v. 101, n. 7, p. 1057–1078, 2014.

SOLTIS, D. E. et al. Polyploidy and novelty: Gottlieb's legacy. *New Phytologist*, v. 186, n. 1, p. 27–37, 2010.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. The role of polyploidy in plant diversification. *American Journal of Botany*, v. 96, n. 1, p. 336-348, 2009.

SOLTIS, D. E. et al. Polyploidy and novelty: Gottlieb's legacy. *New Phytologist*, v. 186, p. 27-37, 2010.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 14, n. 9, p. 348-352, 1999.

SOLTIS, P. S.; MARCHANT, D. B.; VAN DE PEER, Y.; SOLTIS, D. E. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 39, p. 124-129, 2016.

SOUZA, F.; RODRIGUES, L.; OLIVEIRA, M. Cytogenetics and genome size in Orchidaceae: advances and perspectives. *Genetics and Molecular Biology*, v. 40, n. 3, p. 516-526, 2017.

SU, V.; HSU, B. D. Clonagem e expressão de um suposto gene citocromo P450 que influencia a cor das flores de *Phalaenopsis*. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 1933–1939, 2003

SUDA, J. et al. The hidden side of plant genome size variation: polyploidy and large genomes. *New Phytologist*, v. 206, p. 1249-1252, 2015.

SUZUKI, R. M. Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil. 21ª Reunião Anual do Instituto de Botânica, p 1-4, 2014.

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

SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, v. 104, n. 3, p. 543–556, 2009.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosome in Orchids: Counting and Numbers Orchid biology. Reviews and perspectives, p. 321-410, 1984.

TANAKAE KAMEMOTO, H. Y. Cytogenetics and breeding of orchids. *American Orchid Society Bulletin*, v. 53, n. 10, p. 899-904, 1984.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. *Orchid Micropropagation: Methods and Protocols*. New York: Springer, 2014.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; NISHIMURA, Y.; PONCE, C. S.; et al. Advances in biotechnological approaches for the improvement of *Oncidium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 120, p. 493-502, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Micropropagation of orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 118, p. 1–20, 2014.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. et al. Advances in micropropagation of commercial orchids. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 1007–1023, 2015.

- UNEMOTO, L. K et al. Sobrevivência e diferenciação de protocormos de *Oncidium flexuosum* submetidos a tratamento com ácido peracético e colchicina. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 31, p. 503-508, 2009.
- VAINOLA, A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron hybrida*. *Euphytica*, v. 112, p. 239-244, 2000.
- VAN DE PEER, Y. et al. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, p. 411-424, 2017.
- VAN DE PEER, Y.; MAERE, S.; MEYER, A. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, p. 411–424, 2017.
- VAN DE PEER, Y.; MAERE, S.; MEYER, A. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, p. 411–424, 2017.
- VENORA, G.; PADULOSI, S. Cytogenetics and plant evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 124, n. 3, p. 269-274, 1997.
- WALSH, T. A.; JOSHI, C. P.; WHITAKER, B. D. Biochemistry and biotechnology of Vanilla. *Plant Biotechnology Journal*, v. 15, n. 5, p. 590-602, 2017.
- WOOD, T. E. et al. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 106, n. 33, p. 13875-13879, 2009.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; SCHNEEWEISS, G. M. The evolution of polyploidy in plants: cytogenetic and phylogenetic approaches. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 114, n. 4, p. 451-466, 2013.
- YUAN, S.-C. et al. Os mercados globais de orquídeas. In: CHEN, F.-C.; CHIN, S.-W. (Ed.). *O Genoma Orquídea*. Cham: Springer Nature, 2021. (Compêndio de Genomas Vegetais).
- ZENG, S. et al. Orchid conservation: from theory to practice. *Botanical Review*, v. 82, n. 2, p. 134–166, 2016.
- ZHANG, H. et al. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, p. 489–506, 2018.