

Boletim

TÉCNICO SIF

Número 12 - Volume 03
Dezembro 2023

Biotecnologia Florestal da nova geração: ferramentas de baixo custo para aceleração de programas de melhoramento

Alex Junior da Silva et. al.

BIOTECNOLOGIA FLORESTAL DA NOVA GERAÇÃO: FERRAMENTAS DE BAIXO CUSTO PARA ACELERAÇÃO DE PROGRAMAS DE MELHORAMENTO

Alex Junior da Silva^{1*}, Italo Sardinha Pimenta², Samara Aparecida Vieira² and Glêison Augusto dos Santos³

¹ Universidade Federal de Viçosa, Doutor em Genética e Melhoramento, Viçosa - MG, Brasil. E-mail: <alex.j.junior@ufv.br>.

² Universidade Federal de Viçosa, Graduando em Engenharia Florestal, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <italo.pimenta@ufv.br> and <samara.aparecida@ufv.br>.

³ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Florestal, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <gleison@ufv.br>.

*Corresponding author.

RESUMO – A biotecnologia se apresenta como um conjunto de ferramentas para maximização dos ganhos genéticos em programas de melhoramento no curto prazo. Estratégias como a transgenia, sistema CRISPR-Cas, seleção assistida por marcadores, embora muito promissoras, ainda tem um custo efetivo muito elevado ao setor florestal, dada a complexidade dos materiais genéticos e a necessidade de estruturas altamente especializadas. Nesse sentido, uma nova proposta de biotecnologia emerge a partir de técnicas já conhecidas pela comunidade científica, principalmente por apresentar baixos custos: a poliploidia aplicada ao programa de melhoramento, a mutagênese (clássica), a epigenética e a embriogênese somática na clonagem de espécies de difícil propagação. A poliploidia ou duplicação do conjunto cromossômico, já trouxe avanços significativos ao setor florestal, como comprimento de fibras, crescimento, alterações na qualidade da madeira, e principalmente, deve aumentar ainda mais as possibilidades de formação de novos híbridos com diferentes contribuições para o genoma total da F1 triploide. A mutagênese e epigenética, compreendem uma nova área onde as modificações do DNA e de moléculas associadas a ele, podem ampliar a variabilidade genética dos clones operacionais e promover a modulação de materiais elite frente às mudanças climáticas. Por fim, a embriogênese somática principalmente como o Pinus, permitem a clonagem em larga escala de cruzamentos específicos realizados à campo, reduzindo ainda mais o longo tempo do programa de melhoramento para este gênero e o plantio operacional clonal. Todas essas ferramentas possibilitam que o melhorista implemente tecnologia de ponta a um baixo custo, sem atividades regulatórias como as da CTNBio.

Palavras-Chave: Poliploidia; Mutagênese; Epigenética; Embriogênese Somática; Cultura de tecidos

INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório anual de 2023 do IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores), o Brasil possui 9,94 milhões de hectares de florestas plantadas, dos quais 7,6 milhões de hectares são destinados ao gênero *Eucalyptus* e 1,93 milhões de hectares são destinados ao gênero *Pinus*. De 2014 a 2021 a produtividade de *Eucalyptus* em todo o Brasil foi de 35,8 para 38,9 m³/ha/ano, representando um aumento de 7% na produtividade em 8 anos. Parte desse aumento na produtividade é resultado do manejo integrado de pragas e tratos silviculturais, mas principalmente da recomendação de clones superiores em campo (IBÁ, 2023). Nesse sentido, para maximizar ganhos em produtividade, técnicas de biotecnologia florestal tem cada vez mais sido consideradas na incorporação de novos materiais genéticos, como o uso e aplicação de marcadores moleculares, transformação genética, tecnologia de RNAi e edição genômica (CRISPR-Cas) (Grattapaglia et al., 2008; Dai et al., 2020).

Entretanto, os custos para montagem de laboratórios, aquisição de equipamentos, manutenção, compra de reagentes e treinamento de pessoal, resultam em investimentos milionários e que, a exemplo do uso de transgênicos na área florestal, levam-se de 8 a 12 anos para implementação, regulamentação pela CTNBio e plantio dos materiais. Por muitos anos esses fatores foram os responsáveis pela baixa aderência por parte das empresas para investimentos em Biotecnologia Florestal, principalmente por não apresentar resultados iguais ou superiores ao melhoramento convencional.

Nos últimos anos, algumas ferramentas de biotecnologia de baixo custo têm demonstrado potencial de aplicação efetiva em programas de melhoramento. Pode-se citar como exemplo a Poliploidia aplicada ao Programa de Melhoramento, a Mutagênese e Epigenética, e a Tecnologia de Embriogênese Somática. A poliploidia em materiais elite já é uma realidade em diversas empresas, sua principal vantagem nos próximos anos será a incorporação de diferentes híbridos em materiais triploides, ampliando ainda mais a possibilidade de características de interesse do melhorista. A mutagênese clássica (alterações no DNA por agentes físicos ou químicos) e a epigenética (alterações no padrão de marcas que determinam expressão de

genes e fenótipos), prometem em curto espaço de tempo, criar variabilidade genética e condicionar a plasticidade fenotípica dos principais clones operacionais. A embriogênese somática, por sua vez, tem sido pesquisada para que espécies de difícil propagação, como *Pinus taeda*, sejam clonados em larga escala e então plantados operacionalmente, o que deverá impactar diretamente na produtividade dessas florestas.

POLIPLÓIDIA ARTIFICIAL

Poliplodia ou duplicação do conjunto cromossômico, é um fenômeno natural que consiste na presença de mais de dois conjuntos cromossômicos, onde o nível de ploidia (x), varia de acordo com a quantidade do número básico de cromossomos da espécie (Stebbins, 1947). Por exemplo, se para células gaméticas de *Eucalyptus* temos 11 cromossomos ($n=1x=11$ cromossomos), então, após a fecundação e formação do zigoto, temos a restauração do conjunto cromossômico da espécie para sua condição diploide ($2n=2x=22$ cromossomos, 11 do genitor feminino + 11 do genitor masculino). Sendo assim, podemos ter indivíduos triploides ($2n=3x$), tetraploides ($2n=4x$), pentaploides ($2n=5x$), hexaploides ($2n=6x$) e assim por diante, variando apenas em relação ao n° de cópias do conjunto básico de cromossomos.

Como consequência do aumento da quantidade de cromossomos no núcleo, espera-se principalmente um aumento do núcleo, do conteúdo citoplasmático, das células e órgãos específicos, efeito conhecido como “Efeito giga”. Na agricultura, a poliploidia foi muito utilizada por este motivo e para qualidade de grãos, frutos, e obtenção de híbridos interespecíficos. Pode-se citar como exemplos as bananas, uvas, melancias e citros sem sementes (todos estes triploides), outras espécies como o trigo hexaploide, o café e a soja tetraploides (Sattler et al. 2016).

Para a maioria das espécies florestais comerciais como *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Pinus* e *Acacia*, não há a formação natural de poliploides, e essas espécies têm mantido o número cromossômico constante ao longo da evolução (Bachir e Bentouati, 2006). Dessa forma, a poliplodia artificialmente induzida é uma estratégia de biotecnologia que, por meio de agentes inibidores do ciclo celular (antimitóticos), é possível obter uma célula com os cromossomos duplicados, ou seja,

genes e alelos idênticos à planta doadora (Yemets e Blume, 2008). Diversos protocolos já têm sido desenvolvidos para obtenção de eucaliptos, acácias e álamos poliploides (Han et al. 2011; Harbard et al., 2012; Zeng et al., 2019), bem como o estabelecimento de procedimentos para estabilidade de ploidia in vitro e ex vitro (campo) (Silva et al., 2019).

Considerando os aspectos moleculares e fisiológicos, autotetraploides (um único genoma duplicado) de *Paulownia fortunei* submetidos à estresse salino destacaram-se pela expressão diferencial de mais de 15.503 genes principalmente relacionados com a fotossíntese, crescimento e desenvolvimento, e produção de osmólitos (Wang et al., 2019). Em *E. benthamii* autotetraploides foram constatadas mudanças no metabolismo secundário, especificamente em terpenos de cadeia de curta como limoneno, α -terpineol e α -terpinyl acetato não existente em diploides correspondentes (da Silva et al., 2021). Essas mudanças na composição são resultado

da expressão gênica diferencial somada a efeitos do ambiente, e que em última instância, podem refletir na tolerância em maior ou menor grau dos materiais genéticos frente à estresses oxidativos e herbivoria.

Mudanças na estrutura física e morfologia também são evidentes em *Eucalyptus* spp., como maior tamanho das folhas (Figura 1) e estômatos, modificações na estrutura da copa (arquitetura), crescimento e altura total (Longui et al., 2021). Nas propriedades físico mecânicas, observa-se padrão uniforme de raios no sentido medula/casca (diferentemente de materiais diploides), e aumento da densidade básica cerca de 7% nos indivíduos tetraploides, acompanhado no comprimento das fibras em até 13% superior a clones diploides (da Silva Souza et al., 2021).

Autotetraploides (espécie pura) ou alotetraploides (híbrido homoploide) podem ser o ponto de partida para ampliar a variabilidade e diversidade do germoplasma operacional ou em desenvolvimento.



Figura 1: Variabilidade morfológica em *E. benthamii* diploide (1) e tetraploides (2 e 3), coletadas no terço médio da copa de árvores com 18 meses em campo. Foto: Arquivo pessoal. Brasil.

Entretanto, para fins de melhoramento, a formação de materiais triploides (hibridação de um material $2n = 4x = 44$ cromossomos e outro com $2x = 2x = 22$ cromossomos), ampliam a combinação de mais alelos ou ainda genomas distintos na geração F1 ($2n = 3x = 33$ cromossomos), promovendo a formação de diferentes híbridos, principalmente se o material genético diploide for um híbrido intraespecífico. A

hibridação de materiais poliploides pode ser acelerada por meio da técnica de top grafting já bem conhecida para *Eucalyptus*, onde é feita a enxertia de material juvenil na copa de árvores adultas, e posteriormente, com o florescimento precoce do material, pode-se realizar o cruzamento com a espécie de interesse (Figura 2).

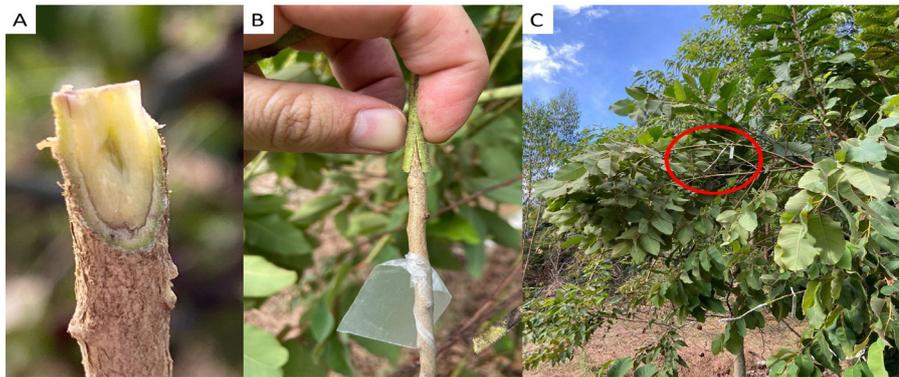


Figura 2: Aceleração do Programa de Melhoramento Genético de poliploides por meio da técnica de top grafting. A) Preparo do enxerto poliploide; B) Encaixe em “V” na árvore adulta e proteção da área enxertada com parafilme; C) material poliploide enxertado no topo da árvore para facilitar a máxima captação da energia solar e aumento da probabilidade de “pegamento” do enxerto.

MUTAGÊNESE & EPIGENÉTICA

Mutagênese é um processo de modificação do DNA de um organismo, que resulta em uma alteração genética permanente e hereditária, podendo ser um fenótipo visível ou não (CARVALHO et al., 2022). Mutações podem ser induzidas com ferramentas moleculares como o sistema CRISPR-Cas, retrotransposons ou recombinação homóloga, ou ainda agentes físicos ou químicos, conhecida como mutagênese clássica. Esta última, embora menos precisa quanto às modificações, é de menor custo de implementação e não necessita de laboratório com equipamentos para análise molecular.

A mutagênese química é a mais amplamente utilizada por depender apenas dos reagentes, ao contrário da física que trabalha por meio de irradiações e que necessitam grandes equipamentos como Irradiadores de Cobalto 60 (além de isolamentos para biossegurança). Dentre os principais agentes químicos, pode-se citar o Etil metanosulfonato (EMS), o Metil metanosulfonato, a Hidroxilamina, a Proflavina, dentre outros. Em plantas, o EMS altera os pares de bases de GC para AT de maneira pontual ao longo de todo genoma, podendo também ocasionar a fragmentação de segmentos cromossômicos ou até deleções de sequências por meio de mecanismos de correção e reparação de DNA da célula, a depender do tempo de exposição e concentração de trabalho (Okagaki et al., 1991). Sendo as mutações aleatórias, o clone mutante pode diferir em algumas características do material doador, sendo necessário incluir em testes clonais ou ainda ser tratado como um novo

germoplasma.

Para o setor florestal, a mutagênese ainda não foi explorada devido às dificuldades enfrentadas na regeneração por meio da micropropagação e a observação do fenótipo, dado o longo ciclo das espécies. Apesar desses fatores serem limitantes na aplicação da tecnologia, a mutagênese química ainda pode ser uma ferramenta para os melhores clones operacionais, buscando ampliar a variabilidade genética. As populações mutantes em potencial são tratadas *in vitro* com o agente mutagênico, e submetidas a diferentes pressões de seleção aos quais se desejam obter os materiais ainda no ambiente *in vitro* ou em mudas jovens. Por apresentar custos apenas com reagentes, clonagem e seleção, é possível repetir o processo até obter o genótipo de interesse, ou combiná-lo com outras estratégias, como a poliploidização para melhor expressão do fenótipo.

Além das mudanças nos pares de bases, é possível modificar moléculas que se associam ao DNA e que definem o padrão de expressão gênica ao longo de toda a vida de uma planta. O campo que estuda a herança dessas marcas ligadas ao material genético é conhecido como epigenética. Dentre as marcas epigenéticas mais estudadas pode-se citar a metilação de DNA, modificações das histonas e ação de pequenos RNAs não codificantes associados ao silenciamento pós transcricional (Miryeganeh et al., 2021).

A metilação de DNA é o processo mais estudado e ocorre naturalmente, diferindo entre os indivíduos e gerações. Os diferentes níveis de metilação do

genoma vão caracterizar os epialelos, ou seja, alelos com marcas associadas que determinam quando serão ou não expressos, tendo a capacidade de produzir novos fenótipos e podem ser transmitidos entre as gerações subsequentes (Kalisz et al., 2004). Por serem organismos sésseis, a expressão gênica das plantas pode ser modulada por intermédio de alterações realizadas na dinâmica na metilação do DNA, modificando o fenótipo frente às condições ambientais (Srikant et al., 2021).

Alterações epigenéticas podem ser induzidas in vitro por meio de agentes químicos como 5-Azacidina, promovendo desmetilação do DNA pela inibição de enzimas DNA metiltransferases, sendo as novas fitas de DNA replicadas com novos padrões de marcas (ou ausência delas). Em espécies florestais, os estudos ainda são incipientes, limitando-se à caracterização morfológica das folhas em

árvores como carvalho (Browne et al., 2020). Para espécies agrônomicas e ornamentais, há registros de modulações para tolerância à salinidade (LI et al., 2021) e aceleração do florescimento (Zhang et al., 2020).

Tanto para produção de mutantes quanto para alterações epigenéticas in vitro, define-se o material genético de interesse e os critérios para seleção do material pós-tratamento, por exemplo, tolerância à estresse salino, baixas temperaturas, e déficit hídrico. Em seguida, são realizados sequencialmente ciclos de tratamento com o químico de interesse e seleção de material que apresentou tolerância à pressão de seleção empregada (Figura 3). Ao final dos ciclos de tratamento, almeja-se população clonal com as mesmas marcas epigenéticas ou mutantes para a característica.

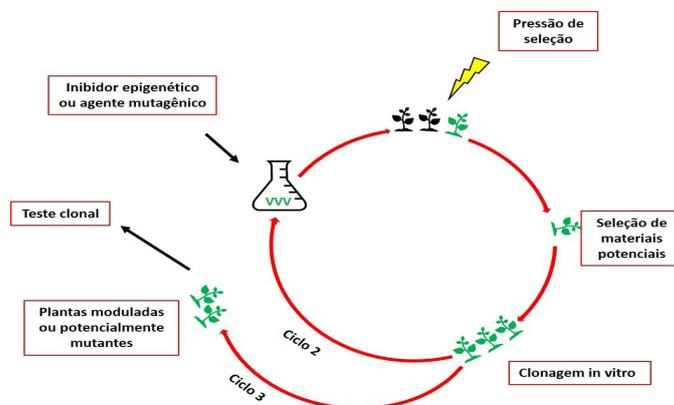


Figura 3: Manejo das populações in vitro de plantas moduladas epigeneticamente ou potencialmente mutantes. A modulação se dá por meio da utilização de agentes inibidores de marcas epigenéticas que, em tratamentos sucessivos combinados ou não com pressões de seleção (estresse salino, hídrico, nutricional, doenças etc.), podem resultar em plantas que sobrevivem ao estresse. As plantas tratadas são clonadas in vitro e submetidas a um novo ciclo de tratamento, Ciclo 1 e Ciclo 2. Ao final do Ciclo 2 espera-se que a população clonal in vitro esteja completamente modulada com o mesmo padrão de marcas epigenéticas. O mesmo ocorre para a indução de mutantes, embora seja necessário a regeneração de plantas mutantes verdadeiras (não quiméricas), podendo aumentar os ciclos de seleção na fase in vitro.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Em termos de produção de mudas clonais, cada variedade possui suas especificações e limitações quanto à metodologia a ser utilizada (Choi et al., 2007), fato este já bem conhecido para espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* (sistema de miniestaquia e minijardim clonal), entretanto, ainda muito restrito para *Pinus*. Na cultura de tecidos, a regeneração in vitro pode ocorrer via organogênese ou embriogênese somática, ambos com grande relevância

na propagação das espécies, visto que, tratam-se de métodos que possibilitam o aumento da produtividade (pela produção em massa de clones elite) e a obtenção de indivíduos livre de patógenos (Sá et al., 2001).

A embriogênese somática em particular, é a que mais proporciona esses ganhos em escala, e pode ser estimulada por duas vias: a embriogênese direta (formando embriões somáticos diretamente do material doador) ou indireta (envolvendo a formação de um calo indiferenciado que mais tarde dará origem

a diversos embriões) (Mantell et al. 1994). Portanto, pode ser entendida como o processo no qual uma única célula doadora expressa a máxima totipotência celular, organizando-se fisiologicamente através de estímulos no meio de cultura (como hormônios e estresses), dividindo-se e formando embriões idênticos à planta mãe, sem que ocorra a fusão dos gametas (De Lira Guerra, et al. 2023). Além disso, essa técnica permite a formação de raízes pivotantes por meio da formação de mudas completas, o que se destaca como diferencial em relação a outras técnicas de propagação convencional (Moura, et al. 2016).

No Brasil, o gênero *Pinus* é um dos mais abundantes na região Sul, garantindo superioridade de produção se comparado a outros países (Abraf, 2013). Porém, a maioria dos plantios são de origem seminal oriundas de pomar de sementes clonal, aumentando os ganhos de produtividade, mas ainda apresentando limitações quanto à variação genotípica intrínseca ao procedimento. Outro fator limitante da propagação é a idade da matriz, o que desencadeia uma baixa resposta e desequilíbrio da escala comercial por estaquia e miniestaquia (Wahid et al., 2012). Com isso, a clonagem em larga escala via embriogênese somática surge para suprir essas limitações e garantir alta produtividade no mercado. A clonagem de espécies de *Pinus* permite a micropropagação via sementes imaturas (que ainda não alcançaram seu nível completo de desenvolvimento) (Pullman et al.,

2006; Andrejow e Higa, 2009) e também permite o armazenamento do embrião por longos períodos preservando sua juvenildade (Cyr et al.,1994; Malabadi et al., 2011).

Recentemente, na Universidade Federal de Viçosa, uma nova metodologia vem sendo desenvolvida a partir da cultura de meristemas de matrizes selecionadas de *Pinus*. A partir da excisão dos meristemas de uma única planta (poucos clones), pode-se iniciar a indução da embriogênese somática combinando diferentes reguladores de crescimento e, posteriormente, utilizando apenas um material genético para o start das culturas. Diferentemente de outras metodologias aplicadas a *Pinus* spp., essa tecnologia (ainda em fase inicial de pesquisa), pode permitir a clonagem direta de indivíduos selecionados no melhoramento clássico ou via seleção genômica ampla, e viabilizar e o plantio clonal que hoje é um grande gargalo silvicultural.

O uso de sementes sintéticas ou artificiais, combinados com outras ferramentas de biotecnologia, em especial a embriogênese somática, permite que os propágulos sejam encapsulados em uma matriz geleificada adicionada de nutrientes e, a depender do propágulo, hormônios e elicitores de crescimento (Figura 4). Esta é uma tecnologia que reduz o tempo de aclimatização de plântulas em laboratório e permite intercâmbio de germoplasma de forma

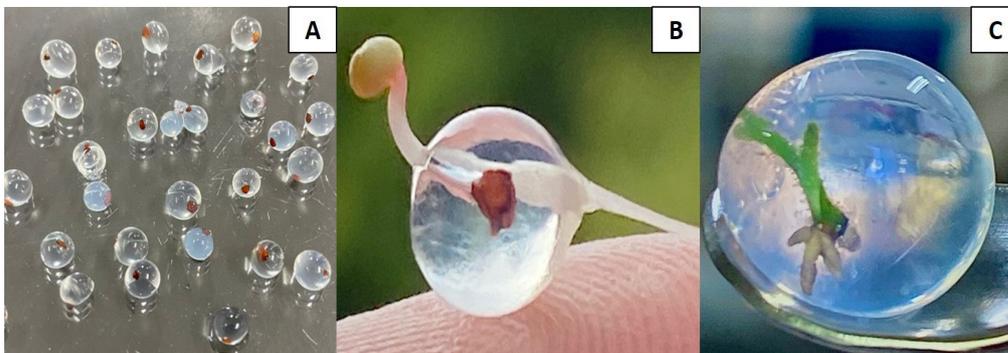


Figura 4: Encapsulamento de diferentes propágulos de plantas. A) Sementes de *E. grandis* encapsuladas em matriz geleificada, contendo macro e micronutrientes; B) *E. grandis* encapsuladas germinando, onde a planta rompe a matriz e segue o desenvolvimento normal; e C) microbrotos de *C. citriodora* encapsulados e apresentando raízes no momento do encapsulamento.

asséptica, facilitando seu transporte para diferentes locais e instituições do exterior, uma vez que materiais *in vitro* são livres de patógenos (Aitken-Christe et al.,1994). Encapsular embriões somáticos

é ainda mais vantajoso pois possuem uma estrutura de eixos completos (parte aérea e radicular), sendo assim, uma alternativa para propagação clonal para espécies do gênero *Pinus*.

CONCLUSÕES

Ferramentas de biotecnologia de baixo custo como a poliploidia, mutagênese e manipulações epigenéticas, aumentam o portfólio de trabalho do melhorista florestal, ampliando a variabilidade genética e epigenética a nível de DNA, de conjuntos cromossômicos e indivíduos fenotipicamente distintos. Técnicas como a embriogênese somática e tecnologia de sementes sintéticas, possibilitam ao melhorista, quando aperfeiçoadas em protocolos específicos, a clonagem em larga escala de materiais-elite cuja operacionalização por meios convencionais (estaquia ou minijardim clonal) é dificultada. Essas técnicas permitem agilidade no programa de melhoramento e incorporação de novos germoplasmas, dispensando a construção de laboratórios robustos e com alto custo para manutenção, além da aquisição de equipamentos para análise, ou reagentes de biologia molecular.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, 2023. Disponível em: <http://www.sif.org.br/noticia/relatorio-de-indicadores-e-desempenho-do-setor-de-arvores-plantadas>.
- AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAL, T.; SMITH, MAL. Glossary. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Dordrecht: Kluwer, 1994, p. IX-XII.
- ANDREJOW, G. M. P.; HIGA, A. R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus Taeda* L. provenientes de brotação apical de mudas jovens. *Floresta*, v.39, n.4, 2009, p. 897-903.
- IBÁ, Relatório Anual, 2023. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-compactado.pdf>. Acesso em: 12 de janeiro de 2024.
- BACHIR, O.; BENTOUATI, A. Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L'Herit. (Myrtaceae), *Caryologia*, v. 59, 2006, p. 207-212. DOI: 10.1080/00087114.2006.10797916
- BROWNE, L.; MEAD, A.; HORN, C.; CHANG, K.; CELIKKOL, Z.; HENRIQUEZ, L. C.; MA, F.; BERAUT, E.; MEYER, R.; SORK, V. L. Experimental DNA Demethylation Associates with Changes in Growth and Gene Expression of Oak Tree Seedlings. *G3 (Bethesda)*. 2020, p. 1019-1028. doi: 10.1534/g3.119.400770. PMID: 31941723.
- CARVALHO, T. R. et al. USO DE MUTAGÊNESE NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS. *Anais da Semana Universitária e Encontro de Iniciação Científica (ISSN: 2316-8226)*, v. 1, n. 1, 2022.
- CHOI, I. Y. et al. A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. *Genetics*, v.2007, v.176, 2007, p. 685-96.
- CYR, D. R.; LAZAROFF, W. R.; GRIMES, S. M. A.; QUAN, Q. Q.; BETHUNE, T. D.; DUNSTAN, D. I.; ROBERTS, D. R. Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex) embryogenic cultures. *Plant Cell Reports*, v.13, 10, 1994, p.574-577.
- DA SILVA, A. J.; CLARINDO, W. R.; SIMIQUELI, G. F. et al. Short-term changes related to autotetraploidy in essential oil composition of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage and its applications in different bioassays. *Sci Rep*, v. 11, 24408, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03916-2>
- DA SILVA SOUZA, T.; DAOLIO, M. F.; MORI, F. A. et al. Polyploidy as a strategy to improve the industrial quality of eucalypt wood. *Wood Sci Technol*, v. 55, 2021, p. 181–193. <https://doi.org/10.1007/s00226-020-01236-8>
- DAI, Y., HU, G.; DUPAS, A.; MEDINA, L.; BLANDELS, N. et al. Implementing the CRISPR/Cas9 Technology in *Eucalyptus* Hairy Roots Using Wood-Related Genes. *Int J Mol Sci*, v.21, 2020, p. 3408. doi: 10.3390/ijms21103408.
- DE LIRA GUERRA, Y.; DA SILVA SANTOS, M. G. Banco de Germoplasma (BGs)-Uma biotecnologia essencial para preservação de informações genéticas. Seven Editora, 2023.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytol*, v. 179, 2008, p. 911–929. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02503.x>

- HAN, C. et al. Polyploidy induction of clone of *Eucalyptus grandis* with colchicine. *Afri J Biotechnol.*, 2011, 10: 14711–14717. <https://doi.org/10.5897/AJB11.093>
- HARBARD, J. L.; GRIFFIN, A. R.; FOSTER, S.; BROOKER, C.; KHA, L. D.; KOUTOULIS, A. Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. *Forestry*, 2012, v. 85, p.427–436. <https://doi.org/10.1093/forestry/cps041>
- LI, Z.; et al. 5-azacytidine pre-treatment alters DNA methylation levels and induces genes responsive to salt stress in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Chemosphere*, 2021, v. 271, p. 129562.
- LONGUI, E. L.; CUSTÓDIO, G. H.; AMORIM, E. P.; SILVA JÚNIOR, F. G.; ODA, S.; SOUZA, I. C. G. Differences in wood properties among *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* with different degrees of ploidy. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 16, 2021, p. e395101624035. DOI: 10.33448/rsd-v10i16.24035.
- KALISZ, S.; PURUGGANAN, M. D. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 19, n. 6, 2004, p. 309-314.
- MALABADI, R. B.; NATARAJA, K.; KUMAR, S.V.; MULGUND, G. S. Journey of a single cell to a plantlet via in vitro cloning mature trees of conifers. *Research in Biotechnology*, v.2, n.6, 2011, p.1-7.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. *Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181.
- MIRYEGANEH M. Plant's Epigenetic Mechanisms and Abiotic Stress. *Genes*. V. 12(8), 2021, p. 1106. <https://doi.org/10.3390/genes12081106>.
- MOURA, L. C. Indução de embriões somáticos em *Eucalyptus* spp., 83f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2016.
- OKAGAKI, R. J.; NEUFFER, M. G.; WESSLER, S. R. A deletion common to two independently derived waxy mutations of maize. *Genetics*, v. 128, n. 2, 1991, p. 425-431.
- PULLMAN, G. S.; CHOPRA, R.; CHASE, K. M. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: improvements in embryogenic tissue initiation by supplementation of medium with organic acids, vitamins B12 and E. *Plant Science*, v. 170, 2006, p.648-658.
- SÁ, M. E. L. Propagação in vitro de diferentes genótipos de abacaxizeiro por meio de seccionamento de plântulas. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 23, n. 1, 2001, p. 17-20.
- SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, v. 243, 2016, p.281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- SILVA, A. J.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Chromosome set doubling and ploidy stability in synthetic auto- and allotetraploid of *Eucalyptus*: from in vitro condition to the field. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, v. 138, 2019, p. 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01627-1>
- SRIKANT, T.; TRI, W. A. The underlying nature of epigenetic variation: Origin, establishment, and regulatory function of plant epialleles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 16, 2021, p. 8618.
- Stebbins, G. L. Types of polyploids: their classification and significance. *Adv. Genet*, 1947, p. 403–429.
- YEMETS, A. I.; BLUME, Y. A. B. Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs. *Open Hortic J*. v. 1, 2008, p. 15–20. <https://doi.org/10.2174/1874840600801010015%5d>.
- WAHID, N. et al. Genetic parameters and performance stability of white spruce somatic seedlings in clonal tests. *Forest Ecology and Management*, v.270, n.1, 2012, p. 45-53.
- WANG, Z. et al. A comparison of the transcriptomes between diploid and autotetraploid *Paulownia*

fortunei under salt stress. *Physiol Mol Biol Plants*, v.25, 2019, p. 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0578-4>

ZHANG, Y.; SI, F.; WANG, Y.; LIU, C.; ZHANG, T.; YUAN, Y.; GAI, S. Application of 5-azacytidine induces DNA hypomethylation and accelerates dormancy release in buds of tree peony. *Plant*

Physiology and Biochemistry, v. 147, p. 91-100, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.12.010>.

ZENG, Q. et al. Oryzalin-induced chromosome doubling in triploid *Populus* and its effect on plant morphology and anatomy. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, v.138, 2019, p. 571–581. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01654-y>