



BRENO ÍTALO DURÃES SANTANA

**SINAIS OXIDATIVOS E DO DESENVOLVIMENTO
REGULAM O ENDOCICLO PARA DIFERENCIAÇÃO
TECIDUAL E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETATIVO EM PITAYA VERMELHA (*Hylocereus
costaricensis* F.A.C.Weber)**

**LAVRAS-MG
2022**

BRENO ÍTALO DURÃES SANTANA

**SINAIS OXIDATIVOS E DO DESENVOLVIMENTO REGULAM O ENDOCICLO
PARA DIFERENCIAÇÃO TECIDUAL E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETATIVO EM PITAYA VERMELHA (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de doutor.

Prof. Renato Paiva, PhD
Orientador

Prof^ª. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo próprio autor.**

Santana, Breno Ítalo Durães.

Sinais oxidativos e do desenvolvimento regulam o endociclo
para diferenciação tecidual e promoção de crescimento vegetativo
em pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber) /

Breno Ítalo Durães Santana. - 2022.

88 p.

Orientador(a): Renato Paiva.

Coorientador(a): Michele Valquíria dos Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Endoreduplicação. 2. Ciclo celular. 3. EROs. I. Paiva,
Renato. II. dos Reis, Michele Valquíria. III. Título.

BRENO ÍTALO DURÃES SANTANA

**SINAIS OXIDATIVOS E DO DESENVOLVIMENTO REGULAM O ENDOCICLO
PARA DIFERENCIAÇÃO TECIDUAL E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETATIVO EM PITAYA VERMELHA (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de doutor.

APROVADA em 10 de Junho de 2022.

Dr. Wagner Campos Otoni, UFV

Dr. Luciano Coutinho Silva, UFPB

Dra. Débora Domiciano, CTC

Dra. Raírys Cravo Herrera, UFPA

Prof. Renato Paiva, PhD

Orientador

Prof^ª. Dra. Michele Valquíria dos Reis

Coorientadora

LAVRAS-MG

2022

*Aos meus pais, Dalva Durães e Célio Santana (in memoriam), aos meus irmãos Francielle,
Farley e Gabriel, a minha esposa Cristiane e ao meu filho Francisco.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus por ter iluminado o meu caminho, por me dar saúde e forças para superar todos os momentos difíceis a que eu me deparei.

Aos meus pais, Dalva Durães e Célio Santana (*in memoriam*) por todo amor, pelos ensinamentos, incentivo e por acreditarem em mim. Agradeço, também, aos meus irmãos, Francielle, Farley e Gabriel pela compreensão da minha ausência, companheirismo e amizade.

À minha companheira, amiga e esposa Cristiane, pelo amor, paciência, motivação, conselhos e apoio. Obrigado por caminhar comigo, fazer parte da minha jornada e por me conceder a graça e o privilégio de ser o pai mais feliz e orgulhoso desse mundo! O amor que construímos agora tem um nome, Francisco!

Agradeço à Aline Pereira e Lillian Magalhães pela amizade, companheirismo e momentos de descontração. Agradeço também, ao meu grande amigo que tenho muita estima e consideração, Dawyson Lima, sua amizade me trouxe grandes ensinamentos de bondade e perseverança, pessoas iguais a você me fazem acreditar em um mundo melhor, muito obrigado!

Aos amigos da “Colônia da Esperança” em especial à Andrea pelo apoio incondicional, pela palavra sábia, pelo sorriso amigo, pelo abraço reconfortante, eu te agradeço.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo profissionalismo e pela oportunidade para realizar o doutorado. A todo corpo docente do UFLA por todos os ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

Ao Instituto Federal de Educação do Norte de Minas Gerais (IFNMG– campus Januária) por ter me concedido o afastamento para estudos de pós-graduação. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo subsídio financeiro para realização das pesquisas científicas.

Ao meu orientador professor Renato Paiva, pela orientação, conselhos, confiança e por acreditar tanto em mim, por vezes mais do que eu mesmo. À minha coorientadora professora Michele dos Reis, pela orientação, amizade, conselhos e por ter sido tão presente durante toda minha jornada na pós-graduação.

A todos os membros e ex-membros do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP-UFLA), em especial ao Afonso Ricardo pela amizade, alegria contagiante, estudos para disciplinas e exame de qualificação e também pelo auxílio nas análises de anatomia vegetal.

Ao professor José Marcello (ICB/UFJF) e ao seu bolsista de Pós-doutorado, Elyabe Monteiro, pelas parcerias e contribuições nas análises de citometria de fluxo. À bolsista de Pós-doutorado Lissa Vasconsellos que foi de fundamental importância na condução das análises bioquímicas.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade para participar e pelas contribuições na avaliação deste trabalho de tese.

EPÍGRAFE

“Livre é o Homem que se considera escravo de uma grande ideia, é aquele que entrega toda a sua energia, o seu auxílio mais poderoso.

É feliz o Homem que sabe o que quer. Descoberto o propósito elevado de suas aspirações”.

Seta Branca, 1984.

RESUMO GERAL

As pitayas (*Hylocereus* spp.) deixaram de ser consideradas plantas de fundo de quintal e passaram a ocupar um importante nicho comercial dentro do mercado de frutos exóticos. Essas Cactaceae apresentam alta taxa de crescimento vegetativo mesmo em condições ambientais adversas. Isso pode estar relacionado aos ciclos de endoreduplicação (endociclos) e ao controle do ciclo celular. A endoreduplicação é uma variação do ciclo celular no qual o genoma é duplicado e a fase de mitose é seletivamente abortada. Este estudo teve como objetivo avaliar o papel do endociclo da pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber) na diferenciação tecidual, regulação do crescimento vegetativo e sua relação com os estímulos oxidativos. No primeiro capítulo intitulado “Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)” elencamos evidências de que a criopreservação de sementes em nitrogênio líquido (NL) por 30 e 60 dias induziu aumentos dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e atividades de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e APX). A sinalização oxidativa, possivelmente, desencadeou estímulos para promoção da endoreduplicação, aumentando a proporção de núcleos octaploides nas plantas. A criopreservação de sementes por 60 dias também permitiu incrementos de mais de 130% na biomassa das plântulas, e isso possivelmente está relacionado aos aumentos dos níveis de ploidia decorrentes da endoreduplicação. Foi demonstrado também que a criopreservação de sementes com soluções crioprotetoras (PVS2) aumenta a eficiência do metabolismo antioxidante em eliminar H_2O_2 , reprimindo a sinalização oxidativa e, consequentemente, a endoreduplicação, mantendo os níveis de ploidia e padrões de crescimento estáveis. No segundo capítulo: “O papel do endociclo em pitaya (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber): estímulos oxidativos, diferenciação tecidual e crescimento vegetativo” comparamos a variação dos níveis de ploidia, via endoreduplicação, numa perspectiva espaço-temporal nos tecidos ao longo do desenvolvimento vegetal de plântulas provenientes de sementes não criopreservadas (controle) e criopreservadas em nitrogênio líquido (NL) por 60 dias. A criopreservação de sementes resultou em plântulas com maiores incrementos de massas seca e fresca aos 120 dias de cultivo no sistema semi-hidropônico, quando comparadas ao tratamento controle. A endoreduplicação induzida por estímulos oxidativos nas sementes (60 dias de criopreservação) possivelmente explica esse comportamento vegetativo. Contudo, ao longo do desenvolvimento (240 dias), as sucessivas duplicações do genoma permitiram a equiparação dos níveis de ploidia de plântulas oriundas de sementes criopreservadas e não criopreservadas. O endociclo foi essencial para a diferenciação dos tecidos ao longo do desenvolvimento das plantas e os diferentes níveis de ploidia entre os tecidos estão diretamente relacionados às especificações das funções celulares. Hipotetizamos uma relação entre o aumento dos níveis de ploidia, via endociclo, com incrementos de biomassa vegetal durante as fases juvenis (crescimento vegetativo). Contudo, ao atingir a fase adulta reprodutiva foi observado redução dos níveis de ploidia dos tecidos constituintes dos cladódios, e isso, a princípio, estaria relacionado com as reduções do crescimento vegetativo. Esses resultados sugerem que o endociclo em *H. costaricensis* seja um processo altamente dinâmico e responsivo a estímulos oxidativos, além de modular os níveis de ploidia para diferenciação tecidual e crescimento das plantas.

Palavras-chave: Endoreduplicação, Cactaceae, endopoliploidia, EROs, ciclo celular.

GENERAL ABSTRACT

The pitayas (*Hylocereus* spp.) are no longer considered backyard plants and started to occupy an important commercial niche within the exotic fruit market. These Cactaceae have a high rate of vegetative growth even under adverse environmental conditions. This may be related to endoreduplication cycles (endocycles) and cell cycle control. Endoreduplication is a variation of the cell cycle, in which the genome is duplicated, and the mitosis phase is selectively aborted. This study aimed to evaluate the role of the red pitaya (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber) endocycle in tissue differentiation, regulation of vegetative growth, and its relationship with oxidative stimuli. In the first chapter entitled "Oxidative stimuli in seeds induce endoreduplication in seedlings of red pitaya (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)" we list evidence that seeds cryopreservation in liquid nitrogen (LN) for 30 and 60 days induced increases in hydrogen peroxide (H₂O₂) levels and activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD, and APX). Oxidative signaling possibly triggered stimuli to promote endoreduplication by increasing the proportion of octaploid nuclei in plants. Seed cryopreservation for 60 days also allowed increases over 130% in seedling biomass, and this is possibly related to increment in ploidy levels resulting from endoreduplication. It was also shown that cryopreservation of seeds with cryoprotective solutions (PVS2) increases the efficiency of antioxidant metabolism in eliminating H₂O₂, repressing oxidative signaling, and consequently endoreduplication, maintaining ploidy levels and stable growth patterns. In the second chapter: "The role of the endocycle in pitaya (*Hylocereus costaricensis* F.A.C. Weber): oxidative stimuli, tissue differentiation and vegetative growth" we compared the variation in ploidy levels, via endoreduplication, in a space-time perspective in tissues throughout the plant development of seedlings from seeds noncryopreserved (control) and cryopreserved in liquid nitrogen (LN) for 60 days. The cryopreservation of seeds resulted in seedlings with greater increments of dry and fresh mass at 120 days of cultivation in the semi-hydroponic system when compared to the control treatment. The endoreduplication induced by oxidative stimuli in the seeds (60 days of cryopreservation) possibly explains this vegetative behavior. However, over the course of development (240 days), the successive duplications of the genome allowed the matching of ploidy levels of seedlings from cryopreserved and non-cryopreserved seeds. The endocycle was essential for tissue differentiation throughout plant development, and the different levels of ploidy between tissues are directly related to the specifications of cell functions. We hypothesized a relationship between the increase in ploidy levels, via the endocycle, with increases in plant biomass during the juvenile stages (vegetative growth). However, upon reaching the reproductive adult stage, a reduction in the levels of ploidy of the tissues constituting the cladodes was observed, and this, in principle, would be related to the reductions in vegetative growth. These results suggest that the endocycle in *H. costaricensis* is a highly dynamic process, responsive to oxidative stimuli, in addition to modulating ploidy levels for tissue differentiation and plant growth.

Keywords: Endoreduplication, Cactaceae, endopolyploidy, ROS, cell cycle.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 A poliploidia.....	16
2.2 Ecologia e evolução de plantas poliploides.....	17
2.2 Endopoliploides	22
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	26
REFERÊNCIAS	28
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	33
ARTIGO 1 - Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha (<i>Hylocereus costaricensis</i> F.A.C.Weber)	33
ARTIGO 2 - O papel do endociclo em pitaya (<i>Hylocereus costaricensis</i> F.A.C.Weber): estímulos oxidativos, diferenciação tecidual e crescimento vegetativo.....	60

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Desconhecida a algumas décadas, as Pitayas deixaram de ser consideradas plantas de fundo de quintal e passaram a ocupar importante nicho comercial dentro do mercado de frutos exóticos (MENEZES et al., 2016). De origem das florestas tropicais da América do Sul, Central e México, essas Cactaceae vêm se consolidando cada vez mais no setor de agronegócio. Sendo possível observar pomares de produção em diversos países do mundo, com destaque para o Vietnã, Malásia, Israel, China, Austrália, Colômbia, México, Nicarágua e Indonésia (MERCADO-SILVA, 2018).

A demanda crescente de importação desse produto nos mercados europeus, americanos e asiáticos permitiu uma grande e rápida ascensão da produção agrícola e de áreas cultivadas em diferentes locais do mundo (BALENDRES; BENGOA, 2019). Essa expansão é decorrente principalmente pelo consumo *in natura*, embora seus frutos também integrem a cadeia de produção de alimentos (doces, geleias, sorvetes e bebidas) e cosméticos (CHEN et al., 2020).

A inserção dessa cultura nos segmentos industriais também vem permitindo a descoberta de muitos metabólitos bioativos de interesse farmacêutico, como flavonoiides, polifenóis, betalaínas e fitoalbuminas (AL-MEKHLAFI et al., 2021). Dentre estas, as betalaínas possuem impressionante capacidade antioxidante além de serem excelentes corantes de alimentos, e ao contrário das beterrabas (principal fonte desse metabólito), as betalaínas presentes nas pitayas não possuem gosto desagradável, conferindo a este fruto uma promissora fonte dessa substância (WINSON et al., 2020).

A denominação pitaya, ou até mesmo fruta do dragão, são termos populares e generalistas, uma vez que esse grupo de plantas abrange várias espécies. Elas pertencem ao gênero *Hylocereus* (sinônimo *Selenicereus*, família Cactaceae, ordem Caryophyllales) que compreende 14 espécies diferentes, dentre elas as espécies *H. undatus*, *H. monacanthus* (anteriormente conhecido como *H. polyrhizus*), *H. costaricensis* e *H. megalanthus* são as mais cultivadas em todo o mundo (XI et al., 2019).

Como em outros cactos, as pitayas apresentam grande plasticidade fenotípica devido à sua capacidade de tolerar estresses abióticos, como secas e temperaturas extremas. A modificação do caule para armazenamento de água (cladódios), ausência de folhas, presença de

camadas cerosas no caule e metabolismo ácido das Crassuláceas (CAM) permitem a essas plantas adaptações a condições climáticas adversas (CHEN et al., 2019).

As referidas características morfológicas conferem certa facilidade no reconhecimento de plantas de pitaya, contudo a distinção entre as suas espécies se dá principalmente por caracteres reprodutivos, como flores e frutos. Os frutos de *H. undatus*, por exemplo, são caracterizados por casca vermelha e polpa branca, enquanto frutos vermelhos com polpa vermelha são traços característicos de *H. monacanthus* e *H. costaricensis*. Já os frutos de *H. megalanthus* são caracterizados por uma casca amarela nodosa com polpa branca (BALENDRES; BENGGOA, 2019).

Outro fator que também as distingue, do ponto de vista citogenético, é a sua ploidia, uma vez que observações citológicas mostraram que *H. undatus*, *H. monacanthus* e *H. costaricensis* são diploides ($2n=2x=22$), enquanto *H. megalanthus* é um alotetraploide ($2n=4x=44$) derivado da hidridação natural entre dois táxons diploides intimamente relacionados (LICHTENZVEIG et al., 2000).

Esse aumento no conjunto de cromossomos (poliploidização) confere mudanças na expressão gênica e, conseqüentemente, alterações no fenótipo em diferentes níveis (FOX et al., 2020). Essas características podem permitir a ocupação de nichos ecológicos distintos dos seus progenitores diploides e maior tolerância a estresses ambientais (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017), mas também podem resultar, do ponto de vista agrônômico, no surgimento de características de interesse econômico, como frutos mais adocicados em *H. megalanthus* (CHEN; COATE; MERU, 2020).

Portanto, a alteração dos níveis de ploidia de uma planta pode ser uma característica desejável em programas de melhoramento genético (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016). Além disso, a maior tolerância de poliploides a estresses ambientais pode conferir a essas plantas maior sucesso em cenários de mudanças climáticas globais (JIAO, 2018).

Conforme citado, a maioria das espécies de pitaya são comumente diploides e a verificação de ploidia se dá principalmente por contagem de cromossomos na mitose de ápices radiculares ou estudos meióticos de células germinativas (LICHTENZVEIG et al., 2000). Análises de citometria de fluxo também auxiliam na determinação dos níveis de ploidia dos demais tecidos, vale destacar que comumente são observadas alterações do número de cromossômicos nos tecidos somáticos em decorrência da endoreduplicação (também chamada de endoreplicação ou endopoliploidização), resultando em indivíduos mixoploides (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016).

De fato, a mixoploidia parece ser algo inerente à Cactaceae. Em duas espécies de *Melocactus*, por exemplo, os níveis de ploidia dos tecidos variaram entre 2C e 32C, sendo a região compreendida pelo córtex dos cladódios a detentora dos maiores níveis de conjuntos cromossômicos (até 32C) e, possivelmente, esta característica está correlacionada com o volume celular e o armazenamento de água no parênquima aquífero, conferindo às essas espécies maiores chances de adaptação a ambientes sazonais com restrição hídrica (TORRES-SILVA et al., 2020).

Em uma espécie de pitaya, como *H. undatus*, não foi diferente. Nela foi possível detectar diferentes níveis de ploidia entre os tecidos, onde apenas tecidos radiculares e acúleos foram observados dois conjuntos de cromossomos (diploides). Já nos demais tecidos os níveis de ploidia variavam entre 4C e 16C (MENEZES et al., 2016), cujos cladódios exibiam ploidia 8C e, possivelmente, essa multiplicação de conjuntos cromossômicos também estaria relacionada à adaptação a ambientes sazonais (DE MENEZES et al., 2012).

A alteração dos níveis de ploidia das pitayas em decorrência da endoreduplicação, talvez possa explicar a alta plasticidade fenotípica dessa cultura (MENEZES et al., 2016). Uma vez que diferente do seu local de origem (florestas tropicais úmidas das Américas) seus plantios comerciais em grande escala se concentram em regiões de clima temperados (China) e áridos (Israel e Austrália), além é claro, de diferentes regiões de climas tropicais (Malásia, Vietnã, Colômbia, Nicarágua e Indonésia) (MERCADO-SILVA, 2018).

Portanto, é especulado uma relação entre a endopoliploidia, endoreduplicação e características morfológicas da pitaya. E o entendimento dessa relação pode explicar como essa cultura se adapta a diferentes ambientes mantendo produtividade. Da mesma forma, o conhecimento de como a endoreduplicação induz alterações na fisiologia celular e tecidual pode contribuir para a produção agrícola dessa cultura, uma vez que os maiores níveis de ploidia em *H. undatus* (16C) foram encontrados nos seus frutos (MENEZES et al., 2016).

Além das alterações de características morfológicas, a endoreduplicação também está emergindo como um fator importante nas respostas generalizadas das plantas ao estresse (LANG; SCHNITTGER, 2020), uma vez que a endopoliploidia pode aumentar a plasticidade fenotípica a fatores ambientais (RAMULA et al., 2019). Curiosamente, a indução de estresses oxidativos nas plantas pode caracterizar-se como importante fator de promoção da endoreduplicação nos tecidos vegetais, permitindo assim respostas mais robustas ao estresse no qual a planta foi submetida (SCHOLES; PAIGE, 2015; SCHOLES; RASNICK; PAIGE, 2017).

De fato, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os respectivos danos oxidativos causados por essas moléculas desencadeiam sinalizações que resultam em aumentos dos níveis de ploidia via endoreduplicação (DUAN et al., 2020). Portanto, a indução da endoreduplicação por meio de estresses oxidativos pode ser uma característica altamente desejável, uma vez que a endopoliploidia pode resultar tanto em indivíduos mais tolerantes ao estresse quanto indivíduos mais produtivos (TIAN et al., 2019).

A criopreservação de sementes é uma técnica que garante a viabilidade do material vegetal por longo período de tempo por meio do uso de temperaturas ultrabaixas (-196° C) (MATSUMOTO, 2017). No entanto, esse procedimento também pode resultar em estresses no respectivo material biológico, devido ao fato de que essas condições podem produzir EROs e induzir a estresses oxidativos nos tecidos (PRUDENTE; PAIVA, 2017). Para minimizar possíveis efeitos estressores, soluções crioprotetoras como o *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) são de extrema relevância, pois seus componentes constituintes atuam como reguladores osmóticos e agentes antioxidantes mantendo a viabilidade do material vegetal (PRUDENTE et al., 2019).

Assim, é presumível uma possível relação entre a criopreservação de sementes, sinalização oxidativa e endoreduplicação nos tecidos. Da mesma forma que a criopreservação de sementes com o uso de soluções crioprotetoras (Ex.: PVS2) seria uma possível alternativa para minimizar os danos oxidativos do tecido vegetal, reprimindo os estímulos oxidativos de uma possível endoreduplicação.

Nesse sentido, a criopreservação de sementes de pitaya vermelha (*H. costaricensis* F.A.C.Weber) pode caracterizar-se como um agente estressor que promova o aumento dos níveis de ploidia dessa cultura por meio da endoreduplicação. E a verificação de quais características fisiológicas, anatômicas e de crescimento que possivelmente serão alteradas poderá contribuir para a elucidação da real importância da endoreduplicação dessa cultura, da mesma forma que, caso comprovado, as sucessivas rodadas de endoreduplicação (endociclo) ao longo do desenvolvimento poderão esclarecer como essa variante do ciclo celular se correlaciona com a diferenciação tecidual e adaptações a estresses ambientais, características típicas de Cactaceae (TORRES-SILVA et al., 2020).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A poliploidia

O genoma de plantas varia espetacularmente em tamanho, seus valores vão de 0,063 a 150 gigas pares de base (uma diferença de aproximadamente 2.400 vezes) (PELLICER et al., 2018; SOLTIS et al., 2015). Essa variação de tamanho está parcialmente relacionada às mudanças no número de conjuntos cromossômicos ao longo da história evolutiva das plantas (MOEGLEIN et al., 2020).

A poliploidia se refere à presença de mais de dois conjuntos completos de cromossomos por núcleo celular (IANNICELLI et al., 2020). A mudança do número de cópias de conjuntos de cromossomos é, por vezes, resultante de eventos de duplicação do genoma inteiro (WGD) (RUIZ et al., 2020), embora outros processos como perda e ganho de cromossomos e fissão e fusão cromossômica também possam resultar na variação do número de conjuntos de cromossomos (MOEGLEIN et al., 2020).

Os WGDs e consequentemente a presença de indivíduos poliploides ocorrem em todos os reinos da árvore da vida e têm a hipótese de promover maior adaptabilidade (BELL et al., 2020; VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017). No entanto, a prevalência de poliploidia está majoritariamente em grupos vegetais. Em angiospermas, por exemplo, estima-se que 35% das espécies sejam poliploides (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016), além disso muitas espécies diploides atuais presenciaram WGDs ao longo da sua história de vida, mas regressaram a um comportamento diploide no decorrer da evolução (paleopoliploides), como é caso da soja e do milho (WU; HAN; JIAO, 2019; ZHANG et al., 2020a).

Muitas culturas agrícolas comerciais são poliploides e representam importante parcela no setor de agronegócios em nível mundial (CORNEILLIE et al., 2019). Alguns estudos sugerem que 30% das culturas agrícolas sejam poliploides, ao passo que em alguns grupos de plantas (como as monocotiledôneas) esses valores podem atingir até 54% de frequência (SALMAN-MINKOV; SABATH; MAYROSE, 2016). Ademais, o aumento da produtividade de algumas espécies como o tabaco (*Nicotiana tabacum*), o amendoim (*Arachis hypogaea*) e o algodão (*Gossypium hirsutum*) foi possível em decorrência do melhoramento genético, utilizando-se de técnicas de aumentos dos níveis de ploidia (SCHIESSL et al., 2019).

A poliploidia pode variar tanto intraespecífica quanto interespecificamente (STUESSY; WEISS-SCHNEEWEISS, 2019). Um indivíduo poliploide que surge como resultado da duplicação de um conjunto de cromossomos dentro de uma ou entre populações de uma única

espécie é denominado autopoliploide, enquanto o termo alopoliploide se refere a indivíduos que surgem por meio da fusão dos conjuntos de cromossomos de diferentes espécies (hibridação) (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016; VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017).

Dois mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar como os poliploides surgem na natureza. A primeira seria por meio de uma via de duplicação do número de cromossomos em células somáticas associada a eventos mitóticos, como endoreduplicação (endopoliploidia). Estes podem ocorrer tanto em células zigóticas quanto em tecidos meristemáticos apicais, dando origem a indivíduos mixoploides (níveis diferentes de ploidia entre tecidos) ou mesmo a organismos completamente poliploides (DUAN et al., 2020; SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016).

A segunda se dá pela formação de células reprodutivas não reduzidas decorrentes de restrições de divisões celulares durante a meiose I (restituição da primeira divisão) ou durante a meiose II (restituição da segunda divisão) (ZENG et al., 2020). A produção e fusão de células reprodutivas não reduzidas têm sido apontadas como a via mais predominante que leva à poliploidia em plantas (SATTLER; CARVALHO; CLARINDO, 2016), pois tanto a heterozigosidade quanto a redundância genética resultantes desse processo levam a novas características e sugerem uma adaptação aprimorada na ocupação de novos habitats (SONG; CHEN, 2015).

Os alopoliploides exibem maior diversidade genética, o que lhes conferem maiores chances de adaptação ao meio, ocupação de novos nichos ecológicos, maior tolerância a estresses ambientais e diversificação de espécies, além, é claro, de serem uma extraordinária fonte de variabilidade genética para programas de melhoramento de culturas comerciais (RUIZ et al., 2020; SOLTIS; SOLTIS, 2016). Por outro lado, a autopoliploidia também está fortemente relacionada com a capacidade de adaptação às mudanças ambientais, embora não possua maior diversidade genética como em alopoliploides (LANG; SCHNITTGER, 2020).

2.2 Ecologia e evolução de plantas poliploides

É amplamente aceito que plantas poliploides têm uma maior robustez ambiental (tolerância) quando comparados aos indivíduos diploides, o que lhes permite um maior potencial para adaptação específica, reduzindo os riscos de extinção durante períodos de limitação a sobrevivência (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017). Isso ocorre

porque o aumento dos níveis ploidia resulta em mudanças nos fenótipos no âmbito celular, metabólico, anatômico e genético, o que pode conferir respostas mais tolerantes e robustas ao estresse ambiental (PAIGE, 2018; SCHOLEY; PAIGE, 2015).

Uma análise do transcriptoma de um alotetraploide (*Brassica napus*) derivado de *B. rapa* (A_T) e *B. oleracea* (C_T), por exemplo, revelou que quando esse poliploide foi submetido a diferentes estresses (frio, calor e hídrico) a divergência na expressão gênica e os padrões de splicing alternativo (AS) entre genes duplicados aumentaram a flexibilidade dos poliploides ao responder a estresses abióticos (LEE; ADAMS, 2020).

Em alelotetraploides de *Glycine dolichocarpa* muitos parâmetros fotossintéticos como taxa de transporte de elétrons (J_{max}), tamanho e número de cloroplastos, conteúdos de clorofilas e carotenoides e comprimento das células paliçádicas foram significativamente maiores quando comparados aos seus progenitores diploides, mostrando que a maior eficiência nos parâmetros fotossintéticos possa ter favorecido a ocupação de ambientes mais hostis (COATE et al., 2012).

No mesmo sentido e considerando que a duplicação do genoma possa aumentar a expressão gênica, é presumível que haja mudanças na síntese proteica. De fato, em folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) os perfis proteômicos de plantas diploides e autotetraploides foram claramente distintos, de modo que a variação notável na atividade fotossintética, conteúdo de ácido cianídrico e resistência ao estresse salino estejam intimamente ligada aos níveis de expressão gênica e perfis proteômicos dos autotetraploides (AN et al., 2014).

Já em plantas mutantes de algodão (*Gossypium arboreum* cv. Shixiya-1), foi observado que o gene *GaTOP6B* esteve envolvido diretamente no processo de endopoliploidia. O silenciamento da expressão desse gene exibiu um fenótipo de tolerância comprometida sob estresse hídrico, ao passo que sua superexpressão resultou em aumentos nos níveis de ploidia e, conseqüentemente, aumento na tolerância ao tratamento de seca e incrementos de biomassa vegetal (TIAN et al., 2019).

A poliploidia também parece atuar nos processos de defesa e tolerância ao estresse por meio do aumento da produção de metabólitos primários (VERGARA; KIKUCHI; BREUER, 2016) e secundários (IANNICELLI et al., 2020). Deveras, muitos metabólitos primários envolvidos na tolerância ao estresse como sacarose, prolina e ácido gama-aminobutírico (GABA) apresentam níveis aumentados em poliploides (TAN et al., 2017). O mesmo também pode ser observado com metabólitos secundários (terpenos, compostos fenólicos e compostos

nitrogenados) que, dentre outros processos, conferem maior capacidade de defesa vegetal contra herbívoros e patógenos (IANNICELLI et al., 2020).

Portanto, os eventos de WGDs podem servir como mecanismos de resposta generalizada para mitigar estresses, aumentando a plasticidade em resposta a uma série de fatores ambientais, como herbivoria, estresse luminoso, estresse térmico, estresse hídrico, metais pesados, salinidade, patógenos e entre outros (LEE; ADAMS, 2020; RAMULA et al., 2019). Nesse contexto, a poliploidia tem sido reconhecida como uma das forças motrizes no processo de adaptação das plantas às variações ambientais (IANNICELLI et al., 2020).

Destarte, a maior tolerância de poliploides a estresses ambientais pode, assim, facilitar a colonização de novos nichos ecológicos. Como observado em espécies do gênero *Neobatrachus* ocorrentes na Austrália, cuja distribuição geográfica de espécies diploides se dá preferencialmente na região costeira, onde os níveis de precipitação são mais elevados e as temperaturas mais amenas. No entanto, espécies tetraploides localizam-se, em maior frequência, nas regiões desérticas e do *outback* australiano. Isso sugere que os indivíduos tetraploides são mais bem adaptados as regiões mais secas do que as espécies diploides, podendo ocupar nichos ecológicos distintos de seus progenitores diploides (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017).

Resultados semelhantes foram encontrados na Península Balcânica, onde espécies do gênero *Veronica* exibem níveis de ploidia que vão desde diploides até hexaploides. As espécies diploides (*V. dalmatica* e *V. orbiculata*) estão mais restritas à costa oeste dos Bálcãs, onde resultaram na formação de alotetraploides em períodos pós-glaciais, já as linhagens hexaploides (*V. austriaca*) estão presentes nas regiões mais ao norte da península e surgiram por meio da hibridização de *V. dalmática* e um alotetraploide, conferindo a esta nova linhagem a ocupação de um novo nicho ecológico distinto de seus progenitores (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2021).

Nesse mesmo sentido, especula-se que a probabilidade de novos poliploides se estabelecerem em seu local de origem é muito baixa e depende de muitos fatores bióticos e abióticos locais, logo a poliploidia pode ser uma característica vantajosa para a ocupação de nichos ecológicos mais hostis (FREELING, 2017). Portanto, acredita-se que a formação de novos poliploides seja mais vantajosa em ambientes instáveis, aumentando as taxas de sobrevivência, especiação e radiação adaptativa (LEE; ADAMS, 2020).

Há evidências de que vários eventos de WGDs tenham ocorrido independentemente em determinados clados de plantas com flores no limite Cretáceo-Paleógeno (K/Pg) (NOVIKOVA; HOHMANN; VAN DE PEER, 2018). Esse limite foi marcado por mudanças abruptas no clima

do planeta (cataclismo, vulcanismo e mudanças na atmosfera), o que causou, entre outros, a extinção de 30 a 60% das espécies vegetais. A duplicação do genoma na fronteira K/Pg sugere, então, que a poliploidia possa estar correlacionada com a sobrevivência das plantas naquele período (FOX et al., 2020).

Partindo desse pressuposto, a história evolutiva dos poliploides pode trazer informações surpreendentes de como esses organismos foram essenciais para a sobrevivência e diversificação das angiospermas (LEVIN; SOLTIS, 2018), uma vez que a ocorrência de eventos WGDs na árvore da vida não é aleatória e parece se correlacionar com períodos de mudanças climáticas globais (FREELING, 2017). Dessa forma, é possível inferir que a poliploidia foi necessária para a evolução das espécies durante períodos de extinção em massa ao longo da história evolutiva das plantas (WU; HAN; JIAO, 2019).

De fato, os eventos de duplicação do genoma inteiro (WGD) foram identificados em vários momentos ao longo da evolução das plantas (JIAO, 2018). Os primeiros trabalhos de filogenômica reportaram dois importantes eventos de WGD nas Spermatophyta, a primeira duplicação teria ocorrido no ancestral comum das plantas com sementes por volta de 319 milhões de anos atrás, a segunda ocorreu a 192 milhões de anos no ancestral comum das angiospermas. Esses dois eventos de WGDs possivelmente implicaram na formação e diversificação das plantas com sementes e angiospermas, respectivamente (JIAO et al., 2011).

No entanto, trabalhos mais recentes trazem fortes evidências de que houve sim mais eventos de WGD nas angiospermas, e que as referidas duplicações foram necessárias para a formação e diversificação de importantes clados das plantas com flores (REN et al., 2018; WU; HAN; JIAO, 2019; ZHANG et al., 2020b, 2020a). Portanto, a tese de que poliploidia configura-se como um catalisador para a sobrevivência e diversificação das angiospermas é válida (SOLTIS et al., 2015; SOLTIS; SOLTIS, 2016).

Curiosamente, a principal sinapomorfia que sustenta o clado das angiospermas é o surgimento das flores (SHAN et al., 2019) e os genes que conferem a identidade dos órgãos florais são duplicados, isso traz indagações de que possivelmente os eventos de WGD estiveram correlacionados com essa novidade evolutiva (SOLTIS; SOLTIS, 2016).

Em clados como as Eudicotiledôneas há a presença de duas cópias dos genes *APETALAI* (*API1*), *AP3*, *AGAMOUS* (*AG*) e três cópias dos genes *SEPALLATAI* (*SEPI1*), *SEMELHANTES A AGAMOUS A6* (*AGL6*) e *SUPRESSOR DE SUPRESSÃO DE CONSTANS I* (*SOCI1*). Essas respectivas duplicações ou triplicações gênicas provavelmente iniciaram a diversificação funcional dos reguladores do desenvolvimento do órgão floral em

eudicotiledôneas centrais, o que favoreceu a inovação morfológica de flores e potencialmente promoveu a radiação adaptativa de eudicotiledôneas (ZHANG et al., 2020a).

Os respectivos eventos de WGDs nas angiospermas ocorreram por volta de 100 a 120 milhões de anos atrás durante o Cretáceo e impulsionaram a diversificação inicial dos quatro principais clados de angiospermas: triplicação do genoma inteiro no ancestral comum dos eudicotiledôneas, duplicação do genoma total durante a diversificação inicial de monocotiledôneas, duplicação do genoma inteiro durante a diversificação inicial de Magnoliidae e duplicação do genoma completo na linhagem Nymphaeales. Esses quatro eventos de poliploidia desempenharam papéis essenciais na evolução adaptativa e diversificação dos principais clados de plantas com flores (ZHANG et al., 2020a).

Assim sendo, a poliploidia apresenta uma intrínseca relação com a formação e diversificação das plantas com flores (JIAO, 2018). Porém, nem todas as angiospermas atuais são poliploides e a escassez de indivíduos que permaneceram poliploides por longos períodos (milhares de anos) sugere que a poliploidia é geralmente um 'beco sem saída' evolutivo (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017).

O retorno ao estado diploide (diploidização) é um fenômeno muito bem relatado na história evolutiva das plantas (WENDEL et al., 2018). O referido o processo de diploidização, embora devolvam um poliploide a um estado semelhante ao diploide, não o devolvem ao estado diploide “original” - isto é, alguns loci são retidos em duplicatas e mudanças na expressão gênica (neofuncionalização e subfuncionalização) tornam o poliploide diploidizado único, conferindo a estes uma capacidade adaptativa incomum, particularmente em tempos de alto estresse ambiental (SOLTIS et al., 2015).

Mesmo regredindo ao estado diploide, a retenção de determinados genes duplicados confere a esses indivíduos a manutenção de determinadas novidades evolutivas, como os órgãos florais (SOLTIS; SOLTIS, 2016), bem como a capacidade em responder a estresses ambientais (WU; HAN; JIAO, 2019). Curiosamente, os genes que codificam fatores de transcrição (TFs) e componentes da via de sinalização são os mais retidos (REN et al., 2018) e provavelmente são esses genes que permitem a manutenção da tolerância ao estresse ambiental (WU; HAN; JIAO, 2019).

De fato, famílias de genes de alta retenção, incluindo grupos de genes dos TFs: ARF, C2H2, C3H, GRAS, HD-ZIP, HSF, LBD, MYB, NAC, Trihelix, WRKY, bHLH e bZIP, tendem a reter repetidamente duplicatas após os WGDs, e os respectivos TFs estão envolvidos

em diversos processos de desenvolvimento e em resposta a estresses abióticos e bióticos (WU; HAN; JIAO, 2019).

A respectiva retenção gênica parece não ser aleatória, uma vez que as condições climáticas em tempos geológicos distintos permitiram a seleção de duplicatas de TFs específicos relacionados a tolerância ao estresse da época. Os genes de TFs co-retidos no Cretáceo (-120 Ma), por exemplo, estiveram principalmente envolvidos a respostas a estresses salinos e hídricos (condições da época), já os TFs co-retidos na fronteira K-Pg permitiram respostas mais rápidas e robustas a baixas temperaturas (C2H2, ERF, CBF e RAV) e evitação a sombra (HD-ZIP) (WU; HAN; JIAO, 2019).

Portanto, a poliploidia permitiu adaptações importantes para a evolução de longo prazo devido à retenção tendenciosa de genes duplicados nos futuros indivíduos diploides, uma vez que o conjunto “multicópia” de famílias de genes pode conferir vantagem adaptativa aumentada sob estresse ambiental, conferindo tolerância mais ampla e níveis mais elevados de plasticidade fenotípica (REN et al., 2018).

2.2 Endopoliploides

Conforme citado, a principal via de formação de organismos totalmente poliploides se dá por meio de erros no processo meiótico originando gametas não reduzidos, que após a fecundação originarão indivíduos poliploides (ZENG et al., 2020). Os respectivos erros meióticos se correlacionam com flutuações ambientais transitórias, sugerindo que a incidência de poliploidia possa ser aumentada durante períodos de perturbação e estresse ambiental (KREINER; KRON; HUSBAND, 2017).

Outro importante processo que resulta na duplicação dos conjuntos cromossômicos é a endoreduplicação (BANERJEE; SINGH; SINHA, 2020a), que ocorre em células somáticas e é resultante de uma variação do ciclo celular mitótico que omite a divisão celular, ou seja, permite a replicação dos conjuntos cromossômicos mas não há segregação cromossômica (cromátides irmãs) tampouco citocinese (SCHOLES; PAIGE, 2015; WILDERMUTH et al., 2017).

Em contraste com a poliploidização em que o genoma é duplicado por todo o organismo e herdado de forma estável pela prole, a endopoliploidia depende de ciclos de endoreduplicação (endociclos) nos quais as células multiplicam o genoma em tipos de células específicos (BREUER; BRAIDWOOD; SUGIMOTO, 2014). Durante essa fase, as células replicam

repetidamente seu DNA, mas não há divisão celular, levando a duplicações sucessivas do genoma em uma determinada célula somática (LANG; SCHNITTGER, 2020).

Em plantas, a endoreduplicação é parte integrante do desenvolvimento, ela está tipicamente associada ao crescimento pós-mitótico de órgãos da planta, como raízes, hipocótilo e folhas. Também faz parte da diferenciação dos tricomas e de órgãos de reserva como endosperma de sementes e endocarpo de frutos (WILDERMUTH et al., 2017).

O endociclo ocorre predominantemente em células com grandes volumes e em células com alta atividade metabólica, implicando que o aumento da ploidia eleva a expressão gênica global e a produção macromolecular para atender às altas demandas de energia (BREUER; BRAIDWOOD; SUGIMOTO, 2014). Além disso, a endoreduplicação está emergindo como um fator importante nas respostas das plantas ao estresse (LANG; SCHNITTGER, 2020), uma vez que a endopoliploidia pode aumentar a plasticidade fenotípica a fatores ambientais (RAMULA et al., 2019).

De fato, uma característica marcante em células endopoliploides é o aumento do seu volume celular (TSUKAYA, 2019a). Em frutos de tomate, por exemplo, foram observadas correlações positivas entre os níveis de ploidia (que variavam de 2C até 256C) com o volume das células e síntese proteica, sugerindo que a endoreduplicação está associada a uma organização celular complexa e contribui para a homeostase carioplasmática durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos (CHEVALIER et al., 2014).

Resultados similares também foram observados em caules de Cactaceae (*Melocactus glaucescens* e *Melocactus paucispinus*), cujas os maiores níveis de ploidia das células do córtex (até 32C) estavam presentes no parênquima aquífero, que é formado por células com grandes volumes celulares, conferindo maior capacidade de armazenar de água, permitindo a sobrevivência a ambientes áridos e sazonais (TORRES-SILVA et al., 2020).

Já em *Arabidopsis thaliana* o tamanho das células guarda, células da lâmina foliar, tamanho das pétalas e sépalas, massa média de sementes e conteúdos de hemicelulose e pectina também se correlacionaram positivamente com os níveis de ploidia celular (CORNEILLIE et al., 2019). Curiosamente, o volume celular de alguns tecidos pode ser aproximadamente duas vezes maior em plantas 4C quando comparado a plantas diploides (TSUKAYA, 2019a), embora nem sempre seja possível estabelecer uma relação precisa entre a duplicação do genoma e a duplicação do volume celular (TSUKAYA, 2019b, 2019a).

O início do endociclo se dá pelo controle molecular dos reguladores chave do ciclo celular (DUAN et al., 2020). O ciclo celular vegetal consiste em quatro fases distintas: uma fase

pré-sintética de DNA com conteúdo nuclear 2C, denominada fase “G1”; uma fase “S” que compreende a síntese de DNA, com conteúdo nuclear variando entre 2C e 4C; uma segunda fase pós-síntese de DNA com um conteúdo nuclear 4C, denominada fase “G2”; e por fim a fase “M” ou mitose (BANERJEE; SINGH; SINHA, 2020b). Dois pontos de verificação (Check Point) regulam o progresso do ciclo celular vegetal nas transições G1/S e G2/M (VELAPPAN; SIGNORELLI; CONSIDINE, 2017). A progressão de fases envolve a atividade de quinases dependentes de ciclina (CDKs) e suas subunidades regulatórias conhecidas como ciclinas (CYCs) (QI; ZHANG, 2020).

Na transição G1/S, o complexo CDKA/CYCD fosforila a proteína relacionada ao retinoblastoma (RBR) que ativa o fator de transcrição da fase S (E2F). E2Fs promove a transição G1/S modulando a expressão de genes envolvidos na replicação do DNA, progressão do ciclo celular e dinâmica da cromatina. A regulação negativa da transição G1/S se dá pelas KRPs (proteínas relacionadas com Kip) e SIM (SIAMESE) que atuam como inibidores do complexo CDKA/CYCD (QI; ZHANG, 2020).

Na transição G2/M, CDKA e CDKB ligam-se a CYCA, CYCB ou CYCD e conduzem as células à divisão (fase M) por meio da fosforilação de vários substratos. No entanto, as atividades de CDKA e CDKB podem ser negativamente reguladas pela quinase WEE1 (OKELLO et al., 2016) ou degradadas via proteossomo por meio do complexo promotor de anáfase/ciclossoma (APC/C), que em ambos os casos resultarão em uma parada na fase G2/M (LIU et al., 2019; QI; ZHANG, 2020).

A mudança do ciclo celular mitótico para o endociclo envolve mudanças na regulação e abundância de ampla gama de CDKs, CYC e demais proteínas regulatórias (QI; ZHANG, 2020). De fato, a degradação de CYCs e CDKs é um gatilho chave para a entrada do endociclo e o complexo promotor de anáfase/ciclossoma (APC/C) desempenha papel central neste processo (BREUER; BRAIDWOOD; SUGIMOTO, 2014; WILDERMUTH et al., 2017)

As classes proeminentes de ativadores APC/C são as proteínas CELL CYCLE SWITCH 52 (CCS52A1 e CCS52A2) (LIU et al., 2019). Essas proteínas bloqueiam o programa mitótico e induzem o início do endociclo em plantas (BREUER; BRAIDWOOD; SUGIMOTO, 2014). Devido à sua importância regulatória, esses ativadores proteicos são rigidamente controlados. Em nível transcricional, as expressões de *CCS52A1* e *CCS52A2* são reguladas negativamente por RBR1, DEL1 e MED16 (SALOMÉ, 2019; WILDERMUTH et al., 2017), já no nível pós-traducional, as proteínas UVI4 e OSD1 as inibem (HEYMAN et al., 2017; QI; ZHANG, 2020).

Outro importante fator de transcrição (TF) envolvido diretamente no controle de fases do ciclo celular, endociclo e reparo de danos ao DNA é o SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 (SOG1). Esse TF se liga diretamente aos promotores dos genes que participam na sinalização de danos ao DNA (BRCA1 e Rad51), genes relacionados ao ciclo celular, incluindo genes da ciclina CYCB1 do tipo B1; 1 e inibidores de CDKs incluindo *SIAMESE-RELATED5-7* (*SMR5* e *SMR7*) e *WEE1*, além de ativar ANAC044 e ANAC085 que levam à parada na fase G2 (MAHAPATRA; ROY, 2020).

SOG1 também parece atuar como um sensor a estresses oxidativos e danos ao DNA das plantas, induzindo respostas no ciclo celular vegetal (HENDRIX et al., 2018; LANG; SCHNITTGER, 2020). A indução do estresse oxidativo por ciprofloxacina (inibidor da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial), por exemplo, revelou uma sinalização retrograda de espécies reativas de oxigênio (EROs) dos plastídeos para o núcleo, cuja comunicação foi mediada por SOG1, que induziu aumentos na expressão de *SMR5* e *SMR7*, resultando em paradas na transição G2/M, endoreduplicação e aumentos dos níveis de ploidia nos tecidos (DUAN et al., 2020).

Resultados semelhantes também foram encontrados em trabalhos com estresse por cádmio (Cd), no qual a toxicidade desse metal pesado aumentou os níveis de EROs e induziu a ativação de marcadores de estresse oxidativo e danos ao DNA (SOG1), estes por sua vez, aumentaram a expressão de inibidores de CDKs da família *SIAMESE-RELATED* (*SMR4-5-7*), possibilitando paradas no ciclo celular e mudanças na endoreduplicação dos tecidos (HENDRIX et al., 2018).

No entanto, o controle da endoreduplicação parece não estar restritas aos estresses acima citados, uma vez que estresses luminosos (OKELLO et al., 2016), hídricos (LI et al., 2019), por microrganismos (WILDERMUTH et al., 2017), salinos (BARKLA et al., 2018) e por herbivoria (PAIGE, 2018) também alteraram os níveis de ploidia, via endoreplicação, em pelo menos um dos tecidos da planta, evidenciando que existe sim uma intrínseca relação entre a endopoliploidia e as resposta ao estresse generalizado (SCHOLES; PAIGE, 2015).

Danos oxidativos em células e tecidos vegetais não necessariamente são oriundos de estresses ambientais, diversas técnicas e metodologias laboratoriais podem induzir estresses oxidativos no material vegetal manuseado. A criopreservação de sementes é um processo que pode resultar em estresses no respectivo material biológico. Essa técnica garante a viabilidade do material vegetal por um longo período de tempo por meio do uso de temperaturas ultrabaixa (-196° C) (MATSUMOTO, 2017). No entanto, essas condições podem produzir EROs e induzir

a estresses oxidativos nos tecidos (PRUDENTE; PAIVA, 2017). Para minimizar possíveis efeitos estressores, soluções crioprotetoras como o *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) são de extrema relevância, pois seus componentes constituintes atuam como reguladores osmóticos e agentes antioxidantes mantendo a viabilidade do material vegetal por um período maior de tempo (PRUDENTE et al., 2019).

Assim, é presumível uma possível relação entre a criopreservação de sementes, estresse oxidativo e endoreduplicação nos tecidos. Da mesma forma que a criopreservação de sementes com o uso de soluções crioprotetoras (Ex.: PVS2) seria uma possível alternativa para minimizar os danos oxidativos do tecido vegetal, reprimindo os estímulos oxidativos indutores de endoreduplicação.

Nesse sentido, a criopreservação de sementes de pitaya vermelha (*H. costaricensis*) pode caracterizar-se como um agente estressor que promova aumentos dos níveis de ploidia dessa cultura por meio da endoreduplicação. A verificação de quais características fisiológicas, anatômicas e de crescimento que possivelmente serão alteradas poderá contribuir para a elucidação da real importância da endoreduplicação dessa cultura, da mesma forma que, caso comprovado, as sucessivas rodadas de endoreduplicação (endociclo) ao longo do desenvolvimento poderão esclarecer como essa variante do ciclo celular se correlaciona com a diferenciação tecidual e adaptações a estresses ambientais, características típicas de Cactaceae (TORRES-SILVA et al., 2020).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As pitayas (*Hylocereus* spp.) vêm se consolidando cada vez mais no setor de frutos exóticos no mercado mundial. Essas Cactaceae apresentam um rápido crescimento vegetativo mesmo em condições ambientais adversas. A mixoploidia (diferentes níveis de ploidia) em seus tecidos revela peculiar controle do ciclo celular vegetal resultando em mudanças nos padrões de crescimento vegetativo.

A endoreduplicação está diretamente relacionada com a mixoploidia, pois essa variante do ciclo celular vegetal permite a duplicação do genoma na fase “S” e reprime seletivamente a mitose, resultando em endopoliploidia celular. Esse processo está intimamente associado a diferenciação tecidual em algumas espécies. Em Cactaceae as sucessivas rodadas de endoreduplicação (endociclos) é parte integrante do desenvolvimento das plantas, estando associadas às especificações das funções celulares, ao controle dos padrões de crescimento

vegetativo e às adaptações a estresses ambientais. No entanto, a falta de um conhecimento detalhado da ocorrência temporal e espacial da endopoliploidia de espécies endoreplicantes, como em Cactaceae, tem dificultado o estudo dos papéis fisiológicos do endociclo.

A indução de estresses oxidativos pode configura-se como um indutor da endoreduplicação, pois a sinalização oxidativa pode permitir desvios no ciclo celular vegetal promovendo a endopoliploidia em determinados tecidos. A criopreservação de sementes é uma técnica de conservação que pode configurar-se como um agente promotor de estresse oxidativo no material biológico, conseqüentemente, a hipótese de que esta técnica de conservação promova estímulos para a promoção da endoreduplicação é válida e a verificação de quais características fisiológicas, morfológicas e de crescimento que possivelmente serão alteradas poderá contribuir para a elucidação da real importância da endoreduplicação nesta cultura.

REFERÊNCIAS

- AL-MEKHLAFI, N. A. et al. Metabolomic and antioxidant properties of different varieties and origins of Dragon fruit. **Microchemical Journal**, v. 160, n. July 2020, 2021.
- AN, F. et al. Comparison of leaf proteomes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar NZ199 diploid and autotetraploid genotypes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- BALENDRES, M. A.; BENGGOA, J. C. Diseases of dragon fruit (*Hylocereus* species): Etiology and current management options. **Crop Protection**, v. 126, n. August, p. 104920, 2019.
- BANERJEE, G.; SINGH, D.; SINHA, A. K. Plant cell cycle regulators: Mitogen-activated protein kinase, a new regulating switch? **Plant Science**, v. 301, n. July, p. 110660, 2020a.
- BANERJEE, G.; SINGH, D.; SINHA, A. K. Plant cell cycle regulators: Mitogen-activated protein kinase, a new regulating switch? **Plant Science**, v. 301, n. August, p. 110660, 2020b.
- BARKLA, B. J. et al. Making epidermal bladder cells bigger: Developmental- and salinity-induced endopolyploidy in a model halophyte. **Plant Physiology**, v. 177, n. 2, p. 615–632, 2018.
- BELL, E. A. et al. Help or hindrance? The evolutionary impact of whole-genome duplication on immunogenetic diversity and parasite load. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 24, p. 13949–13956, 2020.
- BREUER, C.; BRAIDWOOD, L.; SUGIMOTO, K. Endocycling in the path of plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 78–85, 2014.
- CHEN, C. et al. Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in pitaya. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2019.
- CHEN, C. et al. Integrated sRNAome and RNA-Seq analysis reveals miRNA effects on betalain biosynthesis in pitaya. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–17, 2020.
- CHEN, J. T.; COATE, J. E.; MERU, G. Editorial: Artificial Polyploidy in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. December, p. 10–12, 2020.
- CHEVALIER, C. et al. Endoreduplication and fruit growth in tomato: Evidence in favour of the karyoplasmic ratio theory. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2731–2746, 2014.
- COATE, J. E. et al. Anatomical, biochemical, and photosynthetic responses to recent allopolyploidy in *Glycine dolichocarpa* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 55–67, 2012.
- CORNEILLIE, S. et al. Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. **Plant Physiology**, v. 179, n. 1, p. 74–87, 2019.
- DE MENEZES, T. P. et al. Micropropagação e endoreduplicação em pitaya vermelha,

Hylocereus undatus Haw. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 868–876, 2012.

DUAN, S. et al. Signaling from Plastid Genome Stability Modulates Endoreplication and Cell Cycle during Plant Development. **Cell Reports**, v. 32, n. 6, p. 108019, 2020.

FOX, D. T. et al. Polyploidy: A Biological Force From Cells to Ecosystems. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 9, p. 688–694, 2020.

FREELING, M. Picking up the ball at the K/Pg boundary: The distribution of ancient polyploidies in the plant phylogenetic tree as a spandrel of asexuality with occasional sex. **Plant Cell**, v. 29, n. 2, p. 202–206, 2017.

HENDRIX, S. et al. Cell cycle regulation in different leaves of *Arabidopsis thaliana* plants grown under control and cadmium-exposed conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 155, n. January 2018, p. 441–452, 2018.

HEYMAN, J. et al. Tissue-specific control of the endocycle by the anaphase promoting complex/cyclosome inhibitors UVI4 and DEL1. **Plant Physiology**, v. 175, n. 1, p. 303–313, 2017.

IANNICELLI, J. et al. The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. **Scientia Horticulturae**, v. 260, n. March 2019, p. 108854, 2020.

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

JIAO, Y. Double the Genome, Double the Fun: Genome Duplications in Angiosperms. **Molecular Plant**, v. 11, n. 3, p. 357–358, 2018.

KREINER, J. M.; KRON, P.; HUSBAND, B. C. Evolutionary Dynamics of Unreduced Gametes. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 9, p. 583–593, 2017.

LANG, L.; SCHNITTGER, A. Endoreplication — a means to an end in cell growth and stress response. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 54, p. 85–92, 2020.

LEE, J. S.; ADAMS, K. L. Global insights into duplicated gene expression and alternative splicing in polyploid *Brassica napus* under heat, cold, and drought stress. **Plant Genome**, v. 13, n. 3, 2020.

LEVIN, D. A.; SOLTIS, D. E. Factors promoting polyploid persistence and diversification and limiting diploid speciation during the K–Pg interlude. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 42, p. 1–7, 2018.

LI, F. et al. ZmSMR4, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) gene in maize (*Zea mays* L.), functions as a key player in plant growth, development and tolerance to abiotic stress. **Plant Science**, v. 280, n. October 2017, p. 120–131, 2019.

LICHTENZVEIG, J. et al. Cytology and mating systems in the climbing Cacti *Hylocereus* and *Selenicereus*. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 7, p. 1058–1065, 2000.

LIU, Z. et al. Transcriptional repression of the APC/C activator genes *ccs52a1/a2* by the mediator complex subunit MED16 controls endoreduplication and cell growth in arabidopsis. **Plant Cell**, v. 31, n. 8, p. 1899–1912, 2019.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, N. et al. Genetic similarities versus morphological resemblance: Unraveling a polyploid complex in a Mediterranean biodiversity hotspot. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 155, n. November 2020, 2021.

MAHAPATRA, K.; ROY, S. An insight into the mechanism of DNA damage response in plants- role of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1: An overview. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 819–820, n. December 2019, p. 111689, 2020.

MATSUMOTO, T. Cryopreservation of Plant Genetic Resources: Conventional and New Methods. **Reviews in Agricultural Science**, v. 5, n. 0, p. 13–20, 2017.

MENEZES, T. P. et al. Endoreduplication in floral structure, vegetative and fruits of red pitaya with white pulp. **Bioscience Journal**, p. 931–939, 2016.

MERCADO-SILVA, E. M. **Pitaya—*Hylocereus undatus* (Haw)**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

MOEGLEIN, M. K. et al. Evolutionary dynamics of genome size in a radiation of woody plants. **American Journal of Botany**, v. 107, n. 11, p. 1527–1541, 2020.

NOVIKOVA, P. Y.; HOHMANN, N.; VAN DE PEER, Y. Polyploid Arabidopsis species originated around recent glaciation maxima. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 42, p. 8–15, 2018.

OKELLO, R. C. O. et al. Light mediated regulation of cell division, endoreduplication and cell expansion. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 39–47, 2016.

PAIGE, K. N. Overcompensation, environmental stress, and the role of endoreduplication. **American Journal of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1105–1108, 2018.

PELLICER, J. et al. Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. **Genes**, v. 9, n. 2, 2018.

PRUDENTE, D. DE O. et al. The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, n. May, p. 71–82, 2019.

PRUDENTE, D. DE O.; PAIVA, R. Plant cryopreservation : Biochemical aspects. **Journal of Cell and Developmental Biology**, v. 1, n. 1:2, p. 1–3, 2017.

QI, F.; ZHANG, F. Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. January, p. 1–10, 2020.

RAMULA, S. et al. Overcompensation: a 30-year perspective. **Ecology**, v. 100, n. 5, p. 1–6, 2019.

- REN, R. et al. Widespread Whole Genome Duplications Contribute to Genome Complexity and Species Diversity in Angiosperms. **Molecular Plant**, v. 11, n. 3, p. 414–428, 2018.
- RUIZ, M. et al. Synthetic Polyploidy in Grafted Crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. November, 2020.
- SALMAN-MINKOV, A.; SABATH, N.; MAYROSE, I. Whole-genome duplication as a key factor in crop domestication. **Nature Plants**, v. 2, n. 8, p. 1–4, 2016.
- SALOMÉ, P. A. Mediator skills: Med16 controls endoreduplication. **Plant Cell**, v. 31, n. 8, p. 1681, 2019.
- SATTLER, M. C.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v. 243, n. 2, p. 281–296, 2016.
- SCHIESSL, S. V. et al. The role of genomic structural variation in the genetic improvement of polyploid crops. **Crop Journal**, v. 7, n. 2, p. 127–140, 2019.
- SCHOLES, D. R.; PAIGE, K. N. Plasticity in ploidy: A generalized response to stress. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 165–175, 2015.
- SCHOLES, D. R.; RASNICK, E. N.; PAIGE, K. N. Characterization of *Arabidopsis thaliana* regrowth patterns suggests a trade-off between undamaged fitness and damage tolerance. **Oecologia**, v. 184, n. 3, p. 643–652, 2017.
- SHAN, H. et al. Developmental mechanisms involved in the diversification of flowers. **Nature Plants**, v. 5, n. 9, p. 917–923, 2019.
- SOLTIS, P. S. et al. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 35, p. 119–125, 2015.
- SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 30, p. 159–165, 2016.
- STUESSY, T.; WEISS-SCHNEEWEISS, H. What drives polyploidization in plants? **New Phytologist**, v. 223, n. 4, p. 1690–1692, 2019.
- TAN, F. Q. et al. Metabolic adaptation following genome doubling in citrus doubled diploids revealed by non-targeted metabolomics. **Metabolomics**, v. 13, n. 11, p. 1–12, 2017.
- TIAN, Y. et al. Role of a cotton endoreduplication-related gene, GaTOP6B, in response to drought stress. **Planta**, v. 249, n. 4, p. 1119–1132, 2019.
- TORRES-SILVA, G. et al. Anatomy, Flow Cytometry, and X-Ray Tomography Reveal Tissue Organization and Ploidy Distribution in Long-Term In Vitro Cultures of *Melocactus* Species. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. August, p. 1–13, 2020.
- TSUKAYA, H. Re-examination of the role of endoreduplication on cell-size control in leaves. **Journal of Plant Research**, v. 132, n. 5, p. 571–580, 2019a.

TSUKAYA, H. Has the impact of endoreduplication on cell size been overestimated? **New Phytologist**, v. 223, n. 1, p. 11–15, 2019b.

VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 7, p. 411–424, 2017.

VELAPPAN, Y.; SIGNORELLI, S.; CONSIDINE, M. J. Cell cycle arrest in plants: What distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? **Annals of Botany**, v. 120, n. 4, p. 495–509, 2017.

VERGARA, F.; KIKUCHI, J.; BREUER, C. Artificial Autopolyploidization Modifies the Tricarboxylic Acid Cycle and GABA Shunt in *Arabidopsis thaliana* Col-0. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–7, 2016.

WENDEL, J. F. et al. The long and short of doubling down: polyploidy, epigenetics, and the temporal dynamics of genome fractionation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 49, p. 1–7, 2018.

WILDERMUTH, M. C. et al. Adapted Biotroph Manipulation of Plant Cell Ploidy. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. June, p. 537–564, 2017.

WINSON, K. W. S. et al. The establishment of callus and cell suspension cultures of *Hylocereus costaricensis* for the production of betalain pigments with antioxidant potential. **Industrial Crops and Products**, v. 155, n. July, p. 112750, 2020.

WU, S.; HAN, B.; JIAO, Y. Genetic Contribution of Paleopolyploidy to Adaptive Evolution in Angiosperms. **Molecular Plant**, v. 13, n. 1, p. 59–71, 2019.

XI, X. et al. Transcriptome analysis clarified genes involved in betalain biosynthesis in the fruit of red pitayas (*Hylocereus costaricensis*). **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 1–12, 2019.

ZENG, R. Z. et al. Unreduced Male Gamete Formation in *Cymbidium* and Its Use for Developing Sexual Polyploid Cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. May, p. 1–13, 2020.

ZHANG, L. et al. The ancient wave of polyploidization events in flowering plants and their facilitated adaptation to environmental stress. **Plant Cell and Environment**, v. 43, n. 12, p. 2847–2856, 2020a.

ZHANG, L. et al. The water lily genome and the early evolution of flowering plants. **Nature**, v. 577, n. 7788, p. 79–84, 2020b.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)

*Capítulo elaborado seguindo as normas da *Frontiers in Plant Science* (ISSN 1664-462X, JCR: 5,753).*

Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)

1 Breno Ítalo Durães Santana^{1*}, Renato Paiva¹, Michele Valquíria dos Reis², Lissa
2 Vasconcellos Vilas Boas¹, Elyabe Monteiro Matos³, José Marcello Salabert de Campos³

3 ¹Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras,
4 Lavras, Brasil.

5 ²Setor de Plantas ornamentais, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras,
6 Lavras, Brasil.

7 ³Laboratório de Genética e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal
8 de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

9 Autor de correspondência: Breno Ítalo Durães Santana
10 brenoitalods@yahoo.com.br

11 **Palavras chave:** endoreplicação, endociclo, EROs, Cactaceae, mixoploidia, PVS2.

12 **Resumo**

13 A endoreduplicação é um processo pelo qual as células replicam seus genomas sem mitose,
14 resultando em um aumento na ploidia do DNA nuclear. Este estudo é o primeiro relato de que
15 estímulos oxidativos, oriundos da criopreservação de sementes em nitrogênio líquido,
16 induziram a endoreduplicação. Elencamos evidências de que a criopreservação de sementes de
17 pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) em nitrogênio líquido por 30 e 60 dias induziu
18 estímulos de duplicação do genoma via endoreduplicação. Foi demonstrado que essa técnica de
19 conservação modula os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e enzimas antioxidantes
20 desencadeando estímulos oxidativos. A análise de citometria de fluxo dos cladódios revelou
21 diferentes níveis de ploidia entre os tecidos (mixoploidia), e que plântulas oriundas dos maiores
22 tempos de criopreservação de sementes apresentaram porcentagens de núcleos octaploides
23 superiores quando comparados ao tratamento controle. A criopreservação de sementes por 60
24 dias também permitiu incrementos de aproximadamente 130% na biomassa das plântulas, e isso
25 possivelmente está relacionado aos aumentos dos níveis de ploidia decorrentes da
26 endoreduplicação. Foi demonstrado também que a criopreservação de sementes com soluções
27 crioprotetoras (PVS2) aumenta a eficiência do metabolismo antioxidante em eliminar H₂O₂,
28 reprimindo a sinalização oxidativa e conseqüentemente a endoreduplicação, mantendo os níveis
29 de ploidia e padrões de crescimento estáveis.

30 **Destaques**

- 31
- 32 • A criopreservação de sementes de pitaya vermelha em nitrogênio líquido por 60 dias
induz estímulos oxidativos para promoção da endoreduplicação.
 - 33 • O aumento dos níveis de ploidia, via endoreduplicação, permitiu incrementos de altura
34 e biomassa de plântulas cultivadas *in vitro*.

- A criopreservação de sementes com o uso de soluções crioprotetoras (PVS2) aumenta a eficiência do metabolismo antioxidantes (CAT, SOD e APX) em eliminar H₂O₂, reprimindo os estímulos oxidativos de indução da endoreduplicação.

1 Introdução

Desconhecida a algumas décadas, as Pitayas (*Hylocereus* spp.) deixaram de ser consideradas plantas de fundo de quintal e passaram a ocupar um importante nicho comercial dentro do mercado de frutos exóticos (Menezes et al., 2016). De origem das florestas tropicais da América do Sul, Central e México, essas Cactaceae possuem alta taxa de crescimento vegetativo e uma ampla plasticidade fenotípica a condições ambientais adversas (Mercado-Silva, 2018). Elas apresentam um cariótipo predominantemente diploide (Lichtenzweig et al., 2000), contudo possuem um típico padrão de crescimento e desenvolvimento, pois a mixoploidia (diferentes níveis de ploidia) em seus tecidos revela um peculiar controle do ciclo celular vegetal (de Menezes et al., 2012; Menezes et al., 2016).

A coordenação integrada da divisão, crescimento e diferenciação celular é um processo altamente complexo presente no desenvolvimento de vegetais multicelulares (Velappan et al., 2017). O fato de as plantas serem organismos sésseis permitiu a elas um desenvolvimento refinado de respostas a estímulos externos, dentre os quais o controle dos padrões de divisão celular exerce efeito direto no crescimento e desenvolvimento vegetal (Carneiro et al., 2021). Assim, a regulação adequada do ciclo celular é crucial para a sobrevivência e o desenvolvimento da planta e deve ser um processo fortemente regulado, mas flexível e coordenado com precisão (Li et al., 2019).

O ciclo celular compreende quatro fases principais: síntese de DNA (S), mitose (M) e duas fases intermediárias (G1, G2) que servem para monitorar as condições intra e extracelular, permitindo decisões de check-point e reparo do DNA (Velappan et al., 2017). A regulação do ciclo celular é orquestrada pela dinâmica e abundância de proteínas da família de Ciclinas (CYCs) e Quinases Dependentes de Ciclina (CDKs), juntamente com seus respectivos ativadores e inibidores proteicos (Banerjee et al., 2020). O progresso do ciclo celular é mediado pela formação e ativação do complexo CYC/CDK nos pontos de checagem do ciclo celular, G1/S e G2/M (Qi and Zhang, 2020) e a supressão dessas proteínas podem levar a desvios no ciclo celular (Wildermuth et al., 2017).

A endoreduplicação representa uma variante do ciclo celular mitótico durante o qual as células replicam seu DNA sem mitose e/ou citocinese, resultando em aumento do nível de ploidia das células (Bhosale et al., 2019). O desvio do ciclo celular e entrada no endociclo (ciclos de duplicação de DNA via endoreduplicação) envolve a supressão da fase M por meio da degradação ou inibição do complexo CYC/CDK no check-point G2/M (Breuer et al., 2014). A endoreduplicação é parte integrante do desenvolvimento vegetal, pois está frequentemente associada ao crescimento e diferenciação celular em plantas (Wang et al., 2020; Nowicka et al., 2021), além disso acredita-se endopoliploidia desempenhe papéis significativos na fisiologia e no desenvolvimento por meio de efeitos celulares, metabólicos e genéticos (Scholes and Paige, 2015).

Novas abordagens vêm trazendo evidências de que a endoreduplicação seja um fator importante nas respostas generalizadas das plantas ao estresse (Scholes and Paige, 2015; Lang

78 and Schnittger, 2020), uma vez que a endopoliploidia pode aumentar a plasticidade fenotípica
79 a fatores ambientais (Ramula et al., 2019). Em linha com essa expectativa, um número crescente
80 de estudos vem mostrando uma maior tolerância de plantas endopoliploides a diferentes
81 estresses ambientais (Scholes et al., 2017; Bhosale et al., 2018, 2019; Tian et al., 2019; Wei et
82 al., 2019). Análises de expressão gênica diferencial de plantas endopoliploides mostraram que
83 a duplicação do genoma, via endoreduplicação, permitiu maior expressão de genes relacionados
84 ao estresse, respostas hormonais e modificações na parede celular, isso sugere que a
85 endoreduplicação é ainda mais integrada nas vias de resposta ao estresse do que se imagina
86 (Wos et al., 2022).

87 Conforme citado, a entrada no endociclo é dependente da dinâmica e abundância de CYCs
88 e CDKs na transição G2/M (Breuer et al., 2014), e a regulação (transcricional e pós-traducional)
89 dessas proteínas pode ser modulada por estímulos ambientais (Carneiro et al., 2021). De fato,
90 a indução de estresses ambientais pode desencadear sinalizações que alteraram a dinâmica
91 desses reguladores (CYCs e CDKs) promovendo a endoreduplicação (Wildermuth et al., 2017;
92 Barkla et al., 2018; Hendrix et al., 2018; Li et al., 2019). A promoção da endoreduplicação pode
93 estar relacionada com a sinalização de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez a
94 percepção de sinais oxidativos por fatores de transcrição (SOG1, por exemplo) pode modular o
95 ciclo celular, endoreduplicação e danos no DNA (Duan et al., 2020; Hendrix et al., 2020;
96 Mahapatra and Roy, 2020).

97 A criopreservação de recursos genéticos de plantas visa garantir o armazenamento a longo
98 prazo de material vegetal viável e geneticamente estável a uma temperatura ultrabaixa usando
99 nitrogênio líquido (Zamecnik et al., 2021). Contudo, essa técnica pode promover fatores de
100 estresse como desidratação, congelamento e desregulação osmótica que podem induzir a
101 produção de EROs e conseqüentemente danos oxidativos em biomoléculas (Prudente and
102 Paiva, 2017). Para minimizar possíveis efeitos estressores, soluções crioprotetoras como o
103 *Plant Vitrification Solution 2* (Sakai et al., 1990) são de extrema relevância, pois seus
104 componentes constituintes atuam como reguladores osmóticos e agentes antioxidantes
105 mantendo a viabilidade do material vegetal por um período maior de tempo (Prudente et al.,
106 2019). Deste modo, a hipótese desse estudo é que a criopreservação de sementes de Pitaya
107 vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber) induza sinalização oxidativa para promoção
108 da endoreduplicação e o uso da solução crioprotetora *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2)
109 reprima os referidos estímulos.

110 **2 Material e métodos**

111 **2.1 Coleta e beneficiamento de sementes**

112 Frutos completamente maduros de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*), oriundos de
113 pomares de produção do Setor de Fruticultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA),
114 foram despolpados para obtenção das sementes. Após a retirada da mucilagem, as sementes
115 foram submetidas à secagem em papel toalha sob temperatura ambiente por 15 dias, para
116 posterior armazenamento em geladeira (4⁰C) até realização do experimento.

117 **2.2 Criopreservação de sementes**

118 **Experimento 1:** Sementes sem solução crioprotetora foram acondicionadas em criotubos
119 e, em seguida, imersas em nitrogênio líquido (NL). Os tratamentos eram compostos por

120 diferentes tempos de criopreservação em NL (0, 1, 30 e 60 dias). Imediatamente após a
121 criopreservação, os criotubos foram reaquecidos em banho-maria a 40°C por dois minutos
122 (incluindo o tratamento testemunha, tempo 0 de criopreservação). Uma parte das amostras foi
123 destinada à análise bioquímica enquanto a outra metade foi desinfestada e inoculada no meio
124 de cultura MS (Murashige and Skoog, 1962). O delineamento foi inteiramente casualizado
125 (DIC), constituído por quatro tratamentos e cinco repetições. Foi realizada repetição do
126 experimento para validação dos resultados.

127 **Experimento 2:** Um experimento inicial foi desenhado para determinação do melhor tempo
128 de exposição a solução PVS2 (Sakai et al., 1990). Sementes de pitaya foram colocadas em
129 criotubos contendo 2 mL de PVS2 a 0°C por diferentes tempos de exposição a solução (0, 15,
130 30 e 60 minutos), para posterior imersão em NL (+NL) por 240 minutos. O reaquecimento das
131 sementes criopreservadas foi realizado transferindo os criotubos para banho-maria a 40°C por
132 dois minutos. Em seguida, o PVS2 foi removido e as sementes foram enxaguadas três vezes em
133 água estéril. Os tratamentos controle (sem mergulho NL, -NL) consistiu na transferência do
134 material crioprotetido com PVS2, mas não exposto ao NL, para um banho-maria a 40°C por
135 dois minutos seguido de enxague em água destilada. O delineamento foi em DIC, com quatro
136 tempos de exposição ao PVS2 combinados com duas condições de exposição ao NL (+NL e -
137 NL), cada tratamento era constituído por cinco repetições.

138 **Experimento 3:** Determinado o melhor tempo de exposição a solução crioprotetora
139 (experimento 2), procedeu-se a criopreservação (com PVS2) por diferentes tempos (0, 1, 30 e
140 60 dias) em NL, conforme metodologia descrita no experimento 1.

141 **2.3 Germinação *in vitro* de sementes criopreservadas**

142 Após exposição ao nitrogênio líquido e retorno do crescimento, as sementes foram
143 desinfestadas primeiramente em álcool 70% por 60 segundos e posteriormente imersas em
144 solução de 1% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial e Tween 20 (duas gotas) por 20 minutos
145 (Lopes et al., 2017), em seguida, sob câmara de fluxo laminar, lavadas com água destilada
146 estéril, para posterior inoculação ao meio de cultura.

147 O meio MS (Murashige and Skoog, 1962) foi acrescido de 10 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g
148 L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e a esterilização foi realizada
149 em autoclave a 121°C e pressão de 1,05 kg cm⁻² por 20 minutos. As sementes inoculadas em
150 tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio de cultura, foram transferidas para sala de crescimento
151 (temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 36 μmol de fótons m⁻²
152 s⁻¹) onde permaneceram por 70 (experimentos 1 e 3) ou 150 dias (experimento 2). Foram
153 avaliadas a porcentagem de germinação, altura e massa fresca (MF) de plântulas.

154 **2.4 Atividade das enzimas antioxidantes, quantificação de peróxido de hidrogênio e 155 peroxidação lipídica**

156 Após a retomada do crescimento, cinco repetições de 0,1 g de sementes criopreservadas dos
157 experimentos 1 e 3 foram maceradas em NL com PVPP (Polivinilpolipirrolidona) insolúvel. As
158 amostras maceradas foram acrescidas de 1,5 mL do tampão de extração composto de fosfato de
159 potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM e ácido ascórbico 200 mM. O homogeneizado foi
160 centrifugado a 13.000 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante coletado foi utilizado para

161 quantificação das atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato
162 peroxidase (APX).

163 A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do
164 azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis and Ries, 1977). As leituras foram realizadas a 560
165 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a
166 fotorredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da CAT foi determinada conforme
167 Havar and Mchale, (1987). A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na
168 absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de
169 peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A
170 atividade da APX foi determinada segundo Nakaro and Asada, (1981), por meio do
171 monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm e o coeficiente de extinção molar
172 utilizado será de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

173 O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi quantificado a partir de 100 mg de sementes maceradas
174 em NL, homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C.
175 Foi medida a absorvância a 390 nm em um meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio
176 100 mM, pH 7,0 e 1 mL de iodeto de potássio (Velikova et al., 2000).

177 A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao
178 ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege and Aust, (1978). 100 mg de sementes
179 foram macerados em NL acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido
180 tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10
181 minutos. Alíquotas de 250 μL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (0,5%
182 (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA), incubando-se, em seguida, a 95°C,
183 por 30 minutos.

184 A paralisação da reação aconteceu por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram
185 determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA formou complexos de cor
186 avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto
187 secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada
188 pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (\text{A}535 - \text{A}600) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção =
189 $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em μmol de MDA g^{-1}
190 de matéria fresca (MF).

191 **2.5 Quantificação de DNA e determinação dos níveis de ploidia**

192 Os níveis de ploidia e conteúdo de DNA foram determinados por citometria de fluxo.
193 Aproximadamente 50 mg de material fresco (cladódios e raízes de pitaya vermelha cultivadas
194 *in vitro* por 70 dias dos experimentos 1 e 3) foram picados com uma lâmina de bisturi
195 descartável de aço em 1 ml de tampão Marie para liberar os núcleos. Os tecidos previamente
196 macerados foram filtrados através de uma malha de nylon de 50 μM e recolhidos num tubo de
197 polietileno. O filtrado foi corado com 25 μl de solução de iodeto de propídio (1 mg ml^{-1} ; Sigma-
198 Aldrich). Pelo menos 5.000 núcleos foram analisados em cada amostra. Cinco amostras
199 vegetais de cada tratamento foram utilizadas para determinação das médias de conteúdo de
200 DNA. O padrão de referência interno usado foi *Vicia faba* (26,90 pg de DNA).

201 Os dados foram adquiridos em um instrumento FacsCalibur 4 cores (Becton Dickinson) no
202 Departamento de Agricultura da UFLA e, em seguida, plotados e analisados no programa Cell

203 Quest. O conteúdo de DNA nuclear (pg) foi estimado equação proposta por Doležel and Bartos,
204 2005.

205 **2.6 Anatomia vegetal**

206 Para análise histológica, cinco cladódios de cada tratamento (experimento 1) cultivados *in*
207 *vitro* por 70 dias ($n=20$) foram amostrados na região do terço médio e fixados em álcool 70%.
208 Foi realizada desidratação em série crescente de álcool (80%, 90% e álcool P.A.),
209 permanecendo por duas horas sob vácuo em cada concentração. Em seguida, foram submetidos
210 a uma mistura de álcool e Historesina[®] hidroxí-etilmetacrilato (Leica Microsystems, Wetzlar,
211 Alemanha) ativada (1:1) sob vácuo por 2 horas e transferidas para inclusão *overnight* do
212 material em historresina ativada pura. O emblocamento foi realizado em historresina com
213 Hardener.

214 As amostras emblocadas foram seccionadas em micrótomo manual, sendo obtidos cortes
215 transversais com espessura de 5 μm . Os fragmentos foram corados com solução de azul de
216 toluidina 0,5% (Johansen, 1940) e montados em lâminas com glicerol 50% (vv^{-1}). As lâminas
217 foram analisadas e fotografadas com o auxílio de microscópio óptico com câmera acoplada
218 LEICA ICC50 W[®] (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As imagens digitais foram
219 analisadas no software ImageJ, calibrado com régua microscópica fotografada na mesma
220 configuração das imagens obtidas do material onde os parâmetros quantitativos (área total do
221 cladódio e densidade de células do córtex) foram avaliados.

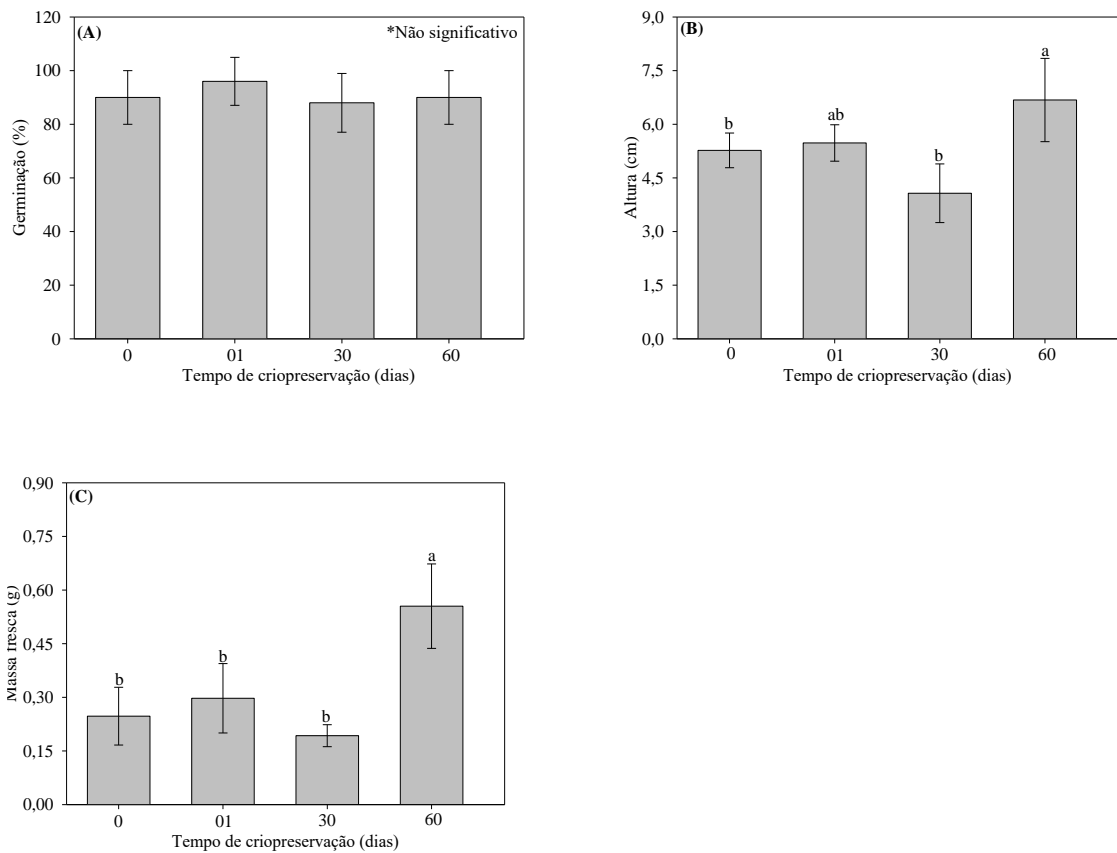
222 **2.7 Análise estatística**

223 Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e submetidos à
224 análise de variância e quando significativo as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a
225 5% de significância ($p<0,05$). Todos esses procedimentos foram realizados com auxílio do
226 software Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2014).

227 **3. Resultados**

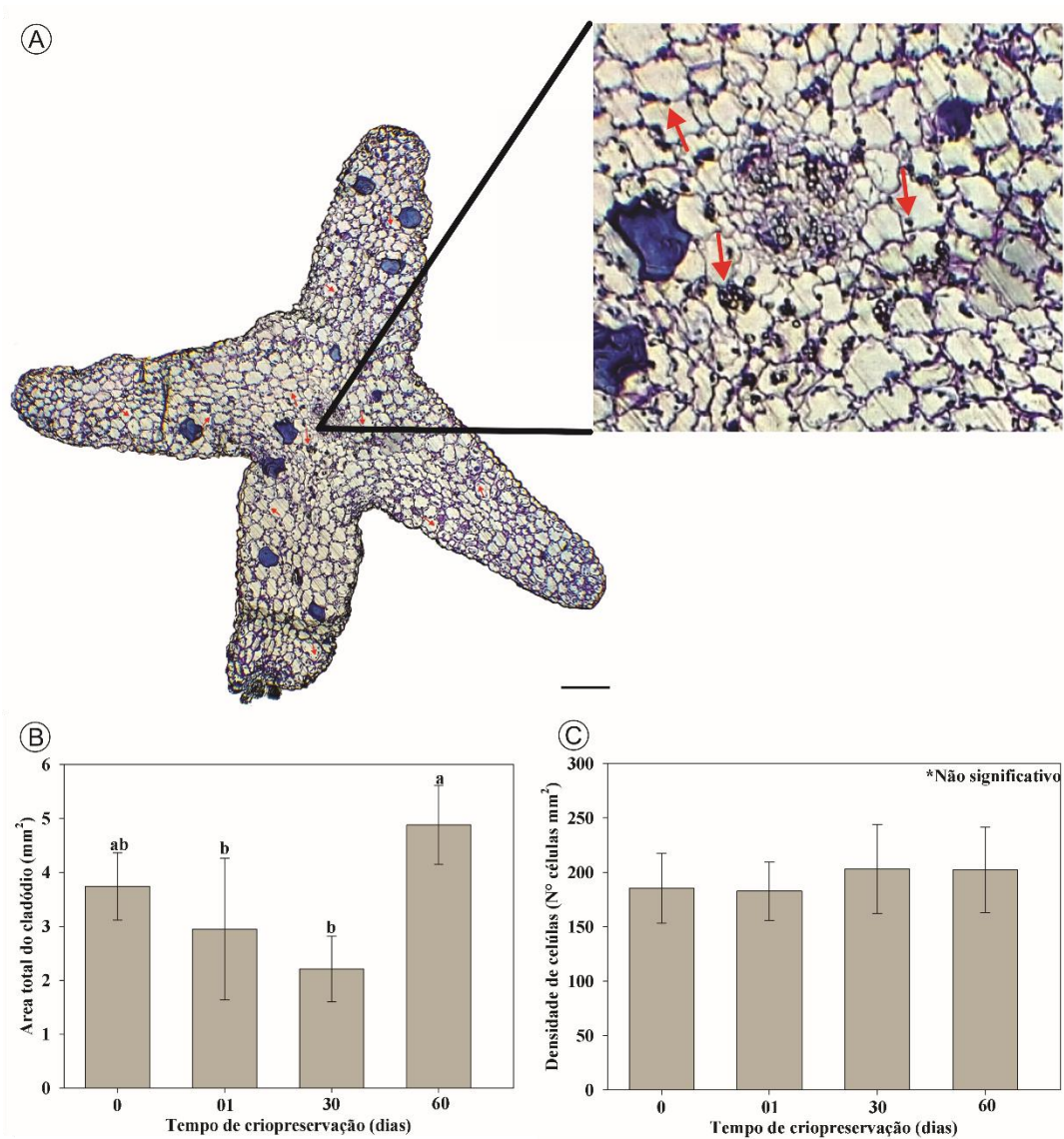
228 **3.1 Criopreservação de sementes de pitaya vermelha**

229 Os percentuais de germinação de sementes entre os tratamentos (experimento 1) foram
230 elevados (média de 91%) e não diferiram estatisticamente entre si (Figura 1A). A altura de
231 plântulas diferiu estatisticamente ($p<0,05$) entre os tratamentos (Figura 1B), a criopreservação
232 de sementes por 60 dias em NL exibiu maiores médias e possibilitou incremento de 1,5 cm de
233 altura (28,75%) quando comparado ao tratamento sem criopreservação (5,21 cm). Semelhante
234 aos dados de altura, as maiores médias de massa fresca também foram observadas no tratamento
235 na criopreservação por 60 dias (Figura 1C), vale ressaltar que neste tratamento o incremento de
236 biomassa mais que dobrou (134,77%) quando comparado ao tratamento testemunha (0,248 g).
237 Todos os dados foram validados por meio da repetição do experimento 1.



238 **Figura 1.** Percentual de germinação de sementes (A), altura de plântulas (B) e massa fresca (C)
239 em função dos diferentes tempos de criopreservação de sementes de pitaya vermelha em
240 nitrogênio líquido (experimento 1). As barras de erro representam o desvio padrão. Médias
241 seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

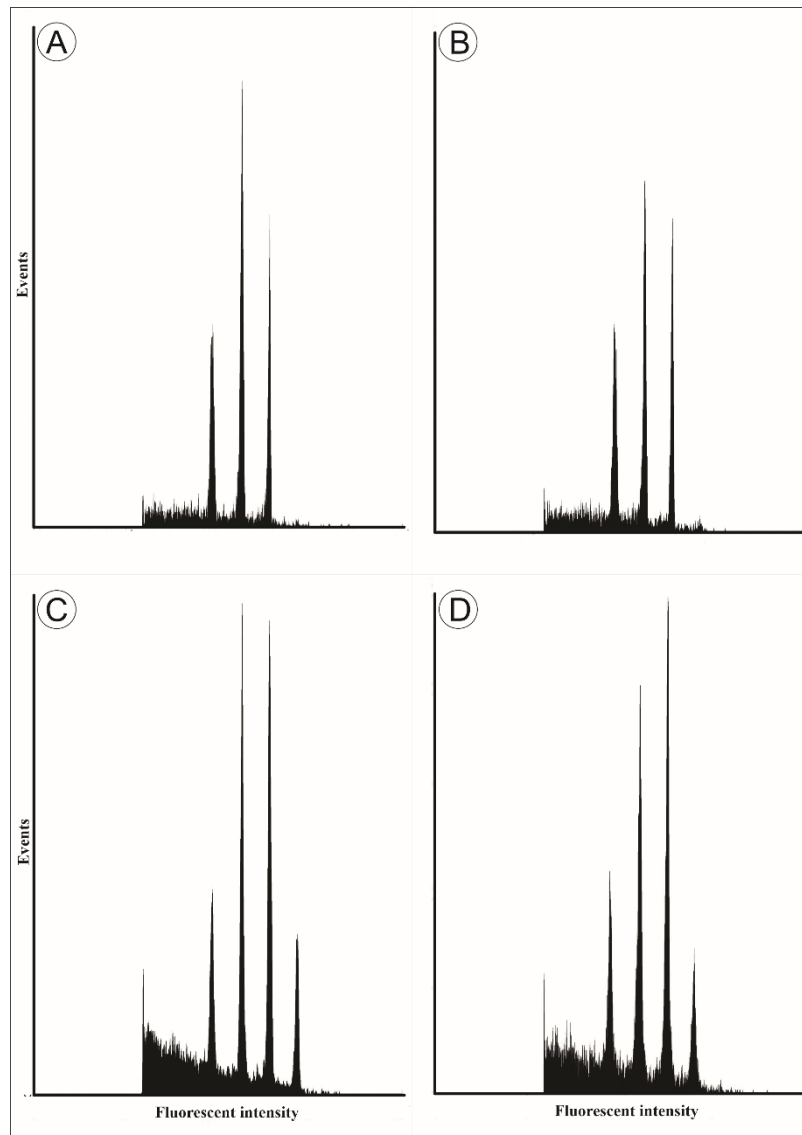
242 AOS 70 dias de cultivo as delimitações dos tecidos constituintes do córtex (parênquima
243 aquífero e periderme) não eram evidentes. Células com grandes volumes (característica do
244 parênquima aquífero) e células clorofilianas (característica da periderme) foram observadas em
245 todas as regiões topográficas do córtex (Figura 2A). A análise quantitativa dos cortes
246 transversais dos cladódios revelou que plântulas oriundas da criopreservação por 60 dias
247 apresentaram maior área total (Figura 2B) quando comparado aos demais tratamentos ($p < 0,05$).
248 A densidade de células do córtex não diferiu entre os tratamentos (Figura 2C), logo as áreas
249 médias das células entre os tratamentos são equivalentes.



250

251 **Figura 2.** Corte transversal de um cladódio de pitaya vermelha (A), área total do cladódio (B)
252 e densidade de células do córtex (C) em função dos diferentes tempos de criopreservação de
253 sementes de pitaya vermelha em nitrogênio líquido (experimento 1). As barras de erro
254 representam o desvio padrão. Barra de escala corresponde a 120 µm. Setas vermelhas em (A)
255 indicam células grandes com cloroplastos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre
256 si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

257 As análises de citometria de fluxo revelam níveis de ploidia distintos entre os tratamentos
258 (Figura 3). Todas as amostras de cladódios de pitaya *in vitro* exibiram mixoploidia (diferentes
259 níveis de ploidia em um mesmo órgão). Plântulas provenientes dos tempos de criopreservação
260 0 e 01 dias (Figura 3A e 3B) apresentaram três picos de ploidia, núcleos 2C, 4C e 8C nas
261 amostras analisadas (cladódios). Já as amostras dos tempos 30 e 60 dias (Figura 3C e 3D)
262 exibiram acréscimo de um quarto pico (16C). Não foram obtidas leituras das amostras
263 radiculares.



264

265 **Figura 3.** Histogramas representativos de análise de citometria de fluxo em cladódios de pitaya
266 vermelha cultivados *in vitro* (experimento 1). (A) Controle negativo (criopreservação tempo 0).
267 (B) Criopreservação de sementes por 01 dia. (C) Criopreservação de sementes por 30 dias. (D)
268 Criopreservação de sementes por 60 dias.

269 A porcentagem de núcleos em cada nível de ploidia também se mostrou distinta entre os
270 tratamentos (Tabela 01). Na criopreservação por 0 e 01 dias, 23,89 e 25,7% dos núcleos exibiam
271 ploidia 2C, 45,11% e 42,67% ploidia 4C e 31% e 31,63% dos núcleos apresentavam oitos
272 conjuntos cromossômicos (8C), respectivamente. Esses resultados revelam que 69 e 68,37%
273 dos núcleos apresentavam ploidia de até 4C nas plântulas provenientes dos tempos de
274 criopreservação por 0 e 01 dias e apenas 31 e 31,63% dos núcleos eram octaploides,
275 respectivamente. Nos tempos 30 e 60 dias, 16,74 e 16,45% dos núcleos eram diploides (2C),
276 33,87 e 32,95% tetraploides (4C), 36,92 e 38,07% octaploides (8C) e 12,47% e 12,53%
277 exibiram ploidia 16C, respectivamente. A baixa porcentagem dos núcleos em 16C sugere que,
278 possivelmente, este quarto pico seja o estágio G2 dos núcleos 8C (núcleos que duplicaram seus
279 conteúdos de DNA para futura divisão celular, mitose). Portanto, 49,39% e 50,6% dos núcleos

Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha
(*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)

43

280 eram octaploides (8C) nos tempos de 30 e 60 dias de criopreservação, respectivamente, valores
281 estes superiores aos encontrados nos demais tratamentos (31% e 31,63%).

282 **Tabela 01.** Conteúdo de DNA e porcentagem de núcleos em cada nível de ploidia de cladódios
283 de pitaya oriundos da criopreservação de sementes.

Tempo de criopreservação (dias)	Variáveis	Ploidia			
		2C	4C	8C	16C
0	Conteúdo DNA (pg)	5,81	11,42	22,90	0
	Núcleos (%)	23,89 a	45,11 a	27,50 b	3,50 b
01	Conteúdo DNA (pg)	5,93	11,76	23,51	0
	Núcleos (%)	25,70 a	42,67 a	29,21 b	2,42 b
30	Conteúdo DNA (pg)	5,61	11,18	22,41	44,23
	Núcleos (%)	16,74 b	33,87 b	36,92 a	12,47 a
60	Conteúdo DNA (pg)	5,23	10,38	20,14	42,96
	Núcleos (%)	16,45 b	32,95 b	38,07 a	12,53 a

284 Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey
285 ($p < 0,05$); pg: picograma.

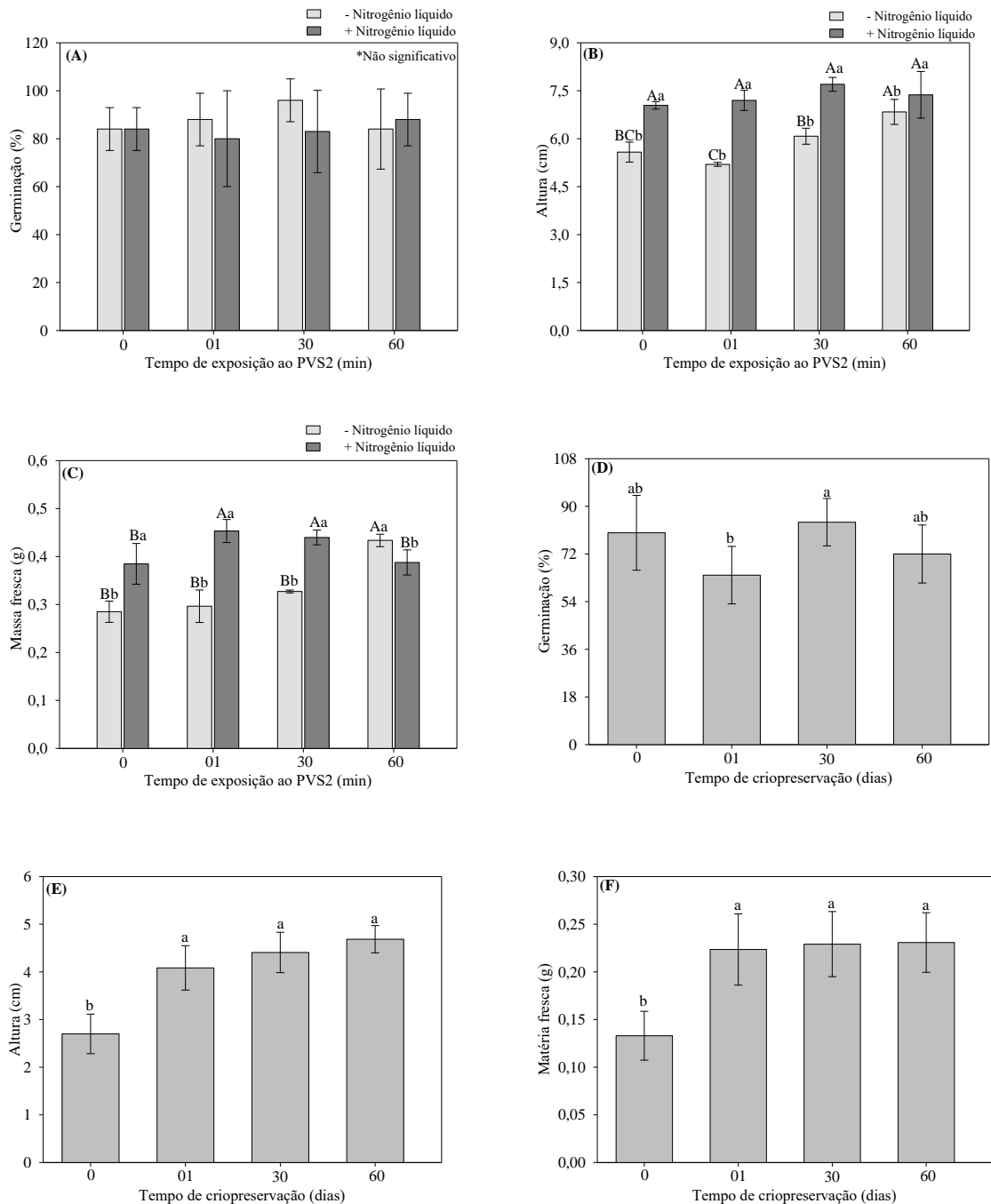
286 O conteúdo de DNA variou entre 5,23 a 8,81 pg em 2C, 10,38 a 11,76 pg em 4C, 20,14 a
287 23,51 pg em 8C e 42,96 a 44,23 pg em 16C, não foram observados picos de ploidia 16C nas
288 amostras oriundas dos tempos de criopreservação de 0 e 01 dias (Tabela 1). Conforme esperado,
289 as quantidades de DNA dobraram de valores a cada nível de ploidia. Os valores de coeficientes
290 de variação (CV) foram baixos (menores que 3,5) em todas as amostras analisadas.

291 3.2 Criopreservação de sementes de pitaya com PVS2

292 A criopreservação de materiais biológicos utilizando PVS2 requer o estabelecimento de
293 protocolos de tempos de exposição às soluções protetoras. Diferentes tempos de PVS foram
294 propostos (0, 15, 30 e 60 minutos) combinados com a presença e ausência da exposição ao
295 nitrogênio líquido (+NL e -NL) no experimento 2. A germinação de sementes não diferiu entre
296 os tempos de PVS2 e exposição ao NL (Figura 4A). Aos 150 dias, as médias de altura de
297 plântulas foram significativamente maiores quando as sementes foram submetidas a
298 criopreservação (+NL), no entanto, não diferiram entre os tempos de PVS2 (Figura 4B). Nos
299 tratamentos -NL, os tempos de 30 e 60 min de PVS2 apresentaram maiores médias de altura.
300 Resultados similares foram observados com a massa fresca, cujos tratamentos +NL exibiram
301 maiores valores de biomassa vegetal (Figura 4C). No entanto, as médias diferiram entre os
302 tempos de exposição ao PVS2, onde os tempos de 15 e 30 min exibiram maiores valores.

303

Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)



304 **Figura 4.** Percentual de germinação de sementes (A), altura de plântulas (B) e massa fresca (C)
 305 em função do tempo de exposição ao PVS2 com e sem exposição ao nitrogênio líquido
 306 (experimento 2). Percentual de germinação de sementes (D), altura de plântulas (E) e massa
 307 fresca (F) em função de diferentes tempos de criopreservação com PVS2 (experimento 3). As
 308 barras de erro representam o desvio padrão. Barras seguidas das mesmas letras não diferem
 309 pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), letras maiúsculas referem-se aos tempos de exposição ao PVS2
 310 e letras minúsculas a exposição ao nitrogênio líquido em (A), (B) e (C).

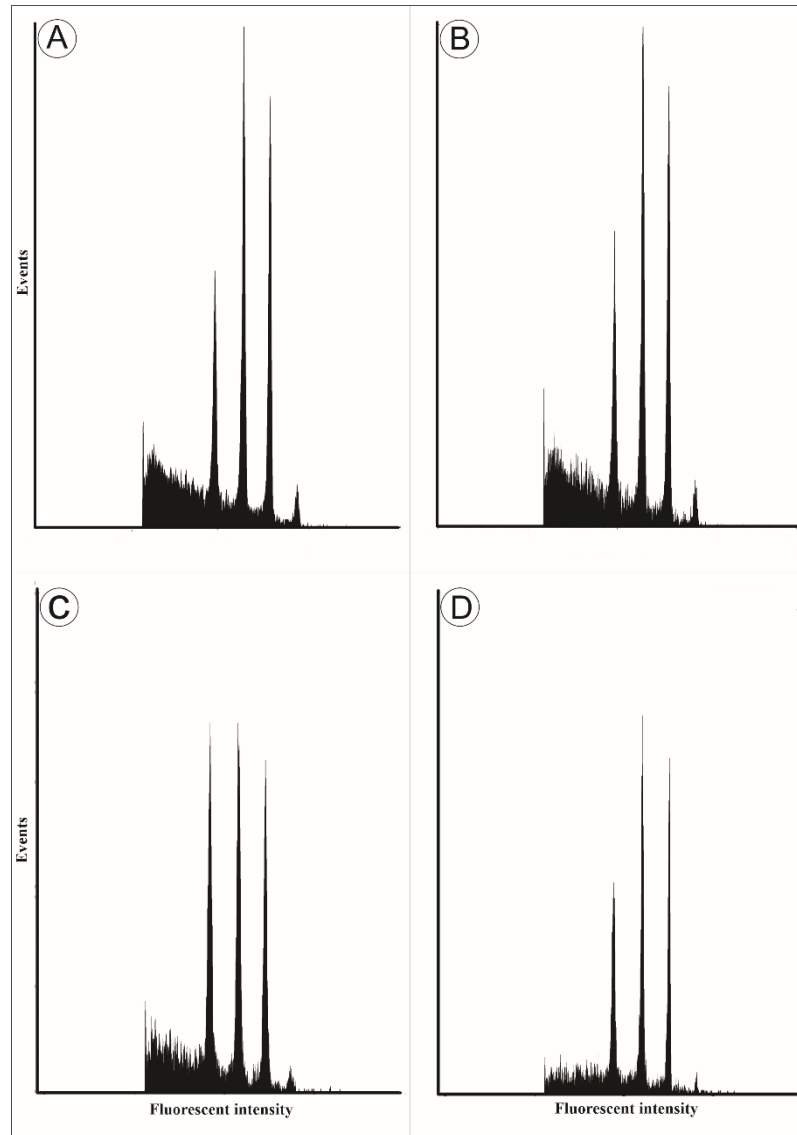
Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha
(Hylocereus costaricensis F.A.C.Weber)

45

311 Foi adotado o tempo de 30 minutos de exposição ao PVS2 e procedeu-se então a
312 criopreservação por 0, 1, 30 e 60 dias em NL (experimento 3). A taxa de germinação de
313 sementes (Figura 4D) foi maior na criopreservação por 30 dias (84%) e menor na
314 criopreservação por 01 dia (64%), o tratamento controle apresentou 80% de germinação. A
315 altura de plântulas, aos 70 dias, foi maior em todos os tratamentos +NL (01, 30 e 60 dias) e
316 menor no tratamento controle (Figura 4E). A massa fresca também foi maior nos tratamentos
317 +NL, mas não diferiram entre si (Figura 4F). As médias de altura e massa fresca de sementes
318 não criopreservadas (-NL) com PVS2 foram estatisticamente inferiores, logo o uso do PVS2
319 sem NL compromete o crescimento e desenvolvimento de plântulas. Vale ressaltar que embora
320 as médias de altura e massa fresca de plântulas oriundas da criopreservação (+NL) com PVS2
321 sejam maiores (Figura 4E e 4F), ainda assim, são menores quando comparadas aos valores de
322 altura e massa fresca (6,71 cm e 0,58 g, respectivamente) de sementes criopreservadas por 60
323 dias em NL sem soluções crioprotetoras (Figura 1B e 1C).

324 A análise dos histogramas revela que todos os tratamentos com PVS2 (experimento 2)
325 exibiram níveis de ploidia semelhantes (2C, 4C, 8C e 16C), não diferindo entre si (Figura 5). A
326 porcentagem de núcleos em cada nível de ploidia (Tabela 2) foi similar em todos os tratamentos
327 ($p>0,05$). Os tempos de criopreservação 0, 01, 30 e 60 dias apresentaram 20,46; 24,14; 18,05 e
328 19,09% dos núcleos em 2C, 43,47; 38,92; 39,79 e 37,25% em 4C e 34,46; 32,6; 38,95 e 37,08%
329 em 8C, respectivamente. O quarto pico (16C) exibiu porcentagens de núcleos distintos entres
330 os tratamentos ($p<0,05$), contudo seus valores foram inferiores a 6,5% (1,61; 4,34; 3,21 e
331 6,48%, respectivamente) o que configura estágio G2 de núcleos octaploides. Em todos os
332 tratamentos a maioria dos núcleos apresentavam ploidia de até 4C (63,93; 66,06; 57,84 e
333 56,44%, respectivamente), valores similares aos encontrados nos tempos de criopreservação 0
334 e 01 dias de sementes criopreservadas sem PVS2 (69% e 68,37%, experimento 1). Esses
335 conjuntos de dados revelam que a adição de substâncias crioprotetoras (PVS2) durante a
336 criopreservação de sementes de pitaya mantém os níveis de ploidia das plântulas estáveis.

337



338

339

340

341

342

Figura 5. Histogramas representativos de análise de citometria de fluxo em cladódios de pitaya vermelha cultivados *in vitro*. (A) Controle negativo com PVS2 (criopreservação tempo 0). (B) Criopreservação de sementes com PVS2 por 01 dia. (C) Criopreservação de sementes com PVS2 por 30 dias. (D) Criopreservação de sementes com PVS2 por 60 dias.

343

344

Tabela 02. Conteúdo de DNA e porcentagem de núcleos em cada nível de ploidia de cladódios de pitaya oriundos da criopreservação de sementes com PVS2.

Tempo de criopreservação (dias)	Variáveis	Ploidia			
		2C	4C	8C	16C
0	Conteúdo de DNA (pg)	5,65	11,17	22,03	43,19
	Núcleos (%)	20,46 ^{ns}	43,47 ^{ns}	34,46 ^{ns}	1,61 b
01	Conteúdo de DNA (pg)	5,85	11,49	22,74	45,01
	Núcleos (%)	24,14 ^{ns}	38,92 ^{ns}	32,6 ^{ns}	4,34 b
30	Conteúdo de DNA (pg)	5,87	11,44	22,33	43,67
	Núcleos (%)	18,05 ^{ns}	39,79 ^{ns}	38,95 ^{ns}	3,21 ab
60	Conteúdo de DNA (pg)	5,80	11,26	22,00	43,18

Estímulos oxidativos em sementes induzem a endoreduplicação em plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber)

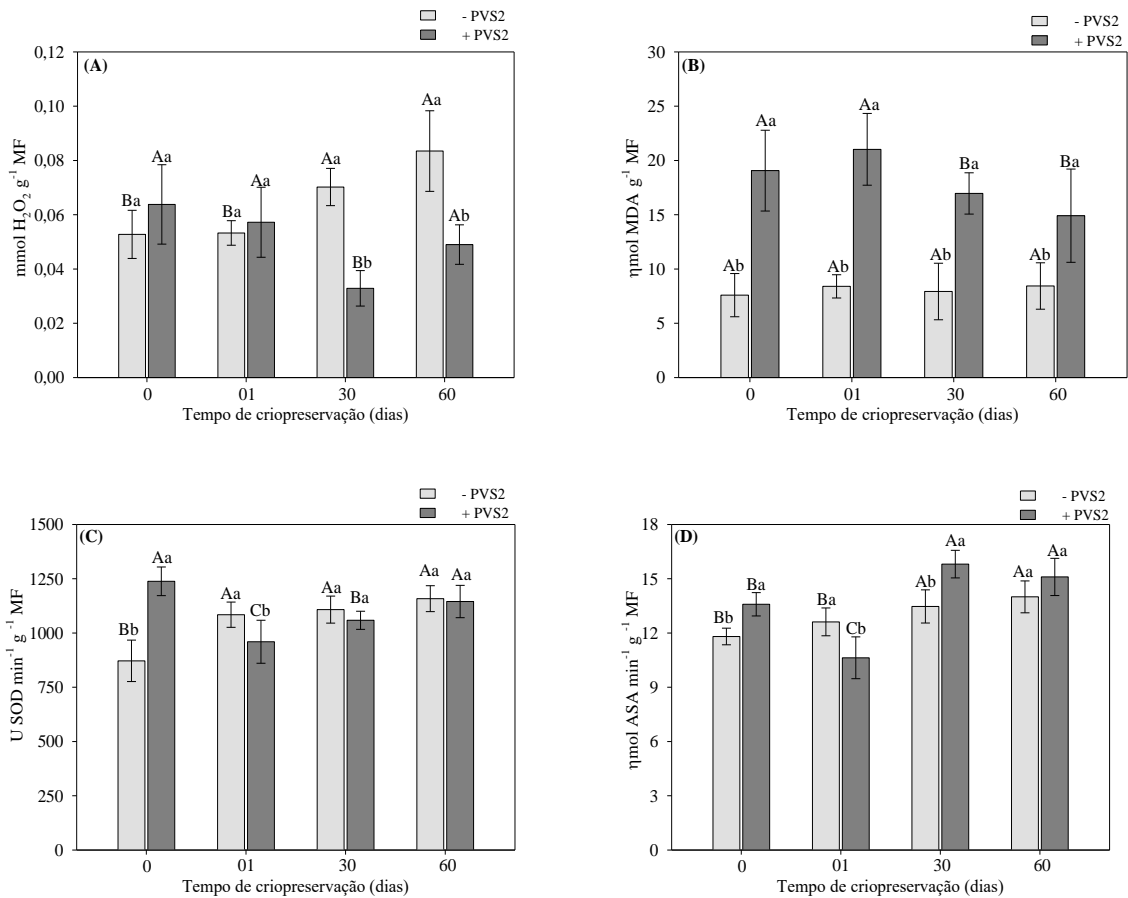
Núcleos (%) 19,19^{ns} 37,25^{ns} 37,08^{ns} 6,48^a

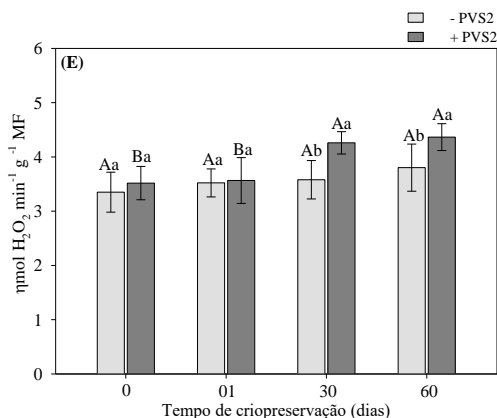
345 *médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey
346 ($p < 0,05$). ^{ns}= não significativo a 0,05 de significância.

347 As médias de conteúdo de DNA variaram de 5,65 a 5,87 pg no pico 2C, 11,17 a 11,49 pg
348 em 4C, 22,00 a 22,74 pg em 8C e de 43,19 a 45,01 pg em 16C (Tabela 2). Os valores dos
349 coeficientes de variação foram menores que 3,1.

350 **3.3. Análise bioquímica das sementes**

351 A análise de variância dos níveis de H₂O₂ de sementes de pitaya criopreservadas revelou
352 que todas as fontes de variação (soluções crioprotetoras, tempo de criopreservação e interação
353 entre os fatores) foram significativas ($p < 0,05$). De modo geral, os tratamentos com PVS2
354 permitiram a redução dos níveis de H₂O₂ (Figura 6A). Quanto ao tempo de criopreservação, a
355 dinâmica dos níveis de H₂O₂ se mostrou distinta, uma vez que nos tratamentos sem PVS2 os
356 níveis dessa espécie reativa de oxigênio aumentaram com tempo de exposição ao NL. Já as
357 sementes criopreservadas com PVS2 mantiveram seus níveis similares nos tempos de 0 e 1 dias
358 de criopreservação e reduziram de forma significativa nos tempos 30 e 60 dias, quando
359 comparadas aos tratamentos sem PVS2.





360 **Figura 6.** Níveis de H₂O₂ (A), malondialdeído (B), atividade enzimática da Superóxido
361 Desmutase (C), atividade enzimática da Ascorbato Peroxidase (D) e atividade enzimática da
362 Catalase (E) de diferentes tratamentos compostos pela combinação de tempos de
363 criopreservação de sementes de pitaya vermelha em nitrogênio líquido com a exposição a
364 soluções crioprotetoras (PVS2). As barras de erro representam o desvio padrão. Barras seguidas
365 das mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), letras maiúsculas referem-se aos
366 tempos de exposição de criopreservação e letras minúsculas a exposição ao PVS2.

367 A influência do PVS2 também foi significativa nos níveis de MDA (Figura 6B). O uso dessa
368 solução crioprotetora resultou em aumentos significativos de peroxidação lipídica,
369 principalmente nos tempos 0 e 1 dia. Os níveis de MDA foram baixos e não diferiram entre si
370 nos tratamentos sem PVS2. Portanto, o aumento da peroxidação lipídica está mais relacionado
371 a exposição da solução crioprotetora (PVS2 por 30 min) do que ao tempo de criopreservação
372 em NL (0, 1, 30 e 60 dias) propriamente dito.

373 A atividade enzimática da SOD demonstrou estar mais correlacionada com os tempos de
374 criopreservação do que com o uso de substâncias crioprotetoras (Figura 6C). A atividade dessa
375 enzima foi menor no tempo 0 e maior nos tratamentos +NL sem PVS2. Já com o uso soluções
376 crioprotetoras, os tempos 0 e 60 dias apresentaram maiores médias. Não foi observada uma
377 relação direta de aumento ou redução da atividade da SOD nos tratamentos com PVS2, pois no
378 tempo 0 o tratamento com essa solução crioprotetora apresentou maior atividade quando
379 comparado ao tratamento sem PVS2, já a criopreservação por 1 dia ocorreu o inverso. Nos
380 tempos 30 e 60 dias não houve diferenças estatísticas.

381 A enzima APX demonstrou aumentar sua atividade com o tempo de criopreservação (Figura
382 6D). A criopreservação por 30 e 60 dias permitiu maiores níveis de atividade dessa enzima.
383 Exceto na criopreservação por 1 dia, a atividade da APX foi superior em todos os tratamentos
384 com PVS2. A atividade enzimática da CAT não diferiu entre os tempos de criopreservação sem
385 PVS2 (Figura 6E), mas de modo similar a APX, o uso da solução crioprotetora permitiu
386 aumentos na atividade dessa enzima, principalmente nos tempos de 30 e 60 dias. Esses
387 resultados revelam um possível efeito indutor de enzimas antioxidantes durante a
388 criopreservação de sementes de pitaya por meio do PVS2.

389 4. Discussão

390 A manutenção de altas taxas germinativas e os significativos incrementos em altura e massa
391 fresca (Figura 1A, 1B e 1C) revelam que a criopreservação de sementes de pitaya vermelha por
392 60 dias em NL induz estímulos de crescimento vegetal nas plântulas. As análises de citometria
393 de fluxo evidenciaram que a criopreservação de sementes por 30 e 60 dias permitiu o
394 acrescimento de um pico de ploidia (16C, Figura 3C e 3D) e aumentos na proporção de núcleos
395 octaploides nas plântulas (Tabela 01). Estes dados sugerem que os incrementos em altura e
396 biomassa vegetal sejam resultantes do aumento dos níveis de ploidia no tempo de
397 criopreservação de 60 dias. Diversos estudos ratificam a tese de que o aumento dos níveis de
398 ploidia está diretamente correlacionado com incrementos na biomassa vegetal e tolerância a
399 estresse ambientais (Scholes et al., 2017; Liu et al., 2019; Tian et al., 2019; Wei et al., 2019;
400 Vos et al., 2022).

401 A endoreduplicação é um processo de desenvolvimento generalizado definido como uma
402 duplicação do genoma nuclear sem mitose que resulta na duplicação do número de
403 cromossomos a cada ciclo (Wildermuth et al., 2017). Vários papéis têm sido propostos para
404 endoreduplicação, como compensação por um pequeno tamanho de genoma, aspectos de
405 crescimento e desenvolvimento vegetal, formação de estruturas celulares específicas e resposta
406 ao estresse (Breuer et al., 2014; Lang and Schnittger, 2020; Vos et al., 2022). Este processo
407 (endoreduplicação) é parte integrante do desenvolvimento vegetal de algumas espécies, pois o
408 aumento do conteúdo de DNA permite o aprimoramento da expressão gênica global resultando
409 em mudanças nos fenótipos no âmbito celular, metabólico, anatômico e genético (Scholes and
410 Paige, 2015; Paige, 2018).

411 Nesse contexto, possivelmente a endoreduplicação intermediou tanto o aumento dos níveis
412 de ploidia quanto os incrementos de biomassa vegetal na criopreservação de sementes por 60
413 dias. Muito embora a exposição de sementes ao NL por 30 dias também tenha induzido o
414 surgimento de núcleos 16C, este tratamento não induziu estímulos de crescimento vegetal. Lang
415 and Schittger, 2020 citam que não necessariamente a endoreduplicação irá induzir promoção
416 de crescimento vegetal, mas provavelmente irá suportar maior tolerância a estresses ambientais,
417 principalmente em decorrência da alteração da expressão gênica e modificações da parede
418 celular. Além disso, o contraste nos fenótipos entre os tempos de 30 e 60 dias em NL evidencia
419 uma especificidade de estímulos em cada tempo de criopreservação, resultando em respostas
420 distintas no crescimento vegetal.

421 Alterações na parede celular e expansão celular são características marcantes em células
422 que presenciaram duplicação do seu genoma (Corneillie et al., 2019; Tsukaya, 2019a). De modo
423 geral, o aumento dos níveis de ploidia está correlacionado positivamente com o aumento do
424 volume celular, embora nem sempre seja possível estabelecer uma relação precisa entre a
425 duplicação do genoma e a duplicação do volume celular (Tsukaya, 2019a, 2019b). No presente
426 estudo, o tempo de criopreservação de 60 dias apresentou maior área total nos cortes
427 transversais dos cladódios (Figura 2B), contudo a densidade de células no córtex não diferiu
428 entre os tratamentos (Figura 2C), logo as médias de área celular são estatisticamente similares.
429 Isso é explicado pelo fato de os cladódios de Cactaceae serem mixoploides (Torres-Silva et al.,
430 2020), e apesar dos maiores tempos de criopreservação (30 e 60 dias) apresentem maior
431 proporção de células octaploides, as porcentagens de núcleos 2C e 4C ainda são bastante
432 expressivas, o que pode ter contribuído para a manutenção das médias de densidade de células.

433 Outro processo de desenvolvimento vegetal associado a endoreduplicação é a diferenciação
434 celular (Wang et al., 2020). Alguns tipos de células vegetais altamente especializadas, como
435 células do pavimento epidérmico, tricomas, endocarpo e endosperma são dependentes de ciclos
436 de endoreduplicação (endociclo) para a diferenciação celular (Chevalier et al., 2014; Del Prete
437 et al., 2019; Wang et al., 2020; Nowicka et al., 2021). Em Cactaceae não é diferente, pois a
438 região cortical dos cladódios é compreendida pelo parênquima aquífero e periderme, e análises
439 de citometria fluxo de duas espécies de *Melocactus* mostraram que essas regiões apresentam
440 níveis de ploidias distintos, sendo, portanto, um traço de desenvolvimento pelo qual a
441 endoreduplicação promove a diferenciação celular visando à otimização do armazenamento de
442 água e fotossíntese (Torres-Silva et al., 2020). Aos 70 dias de cultivo *in vitro* no presente estudo,
443 não foi possível observar uma diferenciação clara dos tecidos (parênquima aquífero e
444 periderme) do córtex (Figura 2A), o que traz inferências de futuras rodadas de duplicação do
445 genoma (endociclo) para a diferenciação dos tecidos.

446 A criopreservação de recursos genéticos de plantas visa garantir o armazenamento a longo
447 prazo de material vegetal viável e geneticamente estável a uma temperatura ultrabaixa usando
448 nitrogênio líquido (Zamecnik et al., 2021). Do ponto de vista conceitual, o aumento dos níveis
449 de ploidia de um material vegetal após a criopreservação é incoerente do ponto de vista de
450 conservação da integridade genética do material criopreservado. Assim, a hipótese proposta é
451 que a adoção de soluções crioprotetoras minimize os estímulos de endoreduplicação,
452 preservando a manutenção da integridade e conteúdo genético. As médias de germinação
453 (Figura 4A), altura de plântulas (Figura 4B) e massa fresca (Figura 4C) mostram que os tempos
454 de 15 e 30 minutos de exposição ao PVS2 são os mais adequados para criopreservação de
455 sementes de pitaya em NL (Experimento 2).

456 Foi adotado o tempo de 30 minutos de exposição ao PVS2 e procedeu-se a criopreservação
457 por 0, 1, 30 e 60 dias em NL (experimento 3). Após 70 dias de cultivo, os valores de massa
458 fresca (Figura 4F) das plântulas oriundas da criopreservação de sementes (01, 30 e 60 dias em
459 NL) foram similares as médias de sementes não criopreservadas sem PVS2 (Figura 1C), os
460 valores de germinação e altura (Figura 4D e 4E) também confirmam a viabilidade dessa técnica
461 de conservação. As análises de citometria de fluxo (Tabela 02) revelaram que as porcentagens
462 de núcleos 2C, 4C e 8C foram similares aos valores de sementes não criopreservadas em NL
463 sem PVS2 (Tabela 01). Portanto, o uso de PVS2 manteve os níveis de ploidia e padrões de
464 crescimento estáveis de plântulas de pitaya oriundas da criopreservação de sementes em NL.

465 O PVS2 é uma solução crioprotetora que se mostra bastante eficaz na proteção de uma gama
466 de explantes (Das et al., 2021; Normah and Sulong and Reed, 2019; Whelehan et al., 2022),
467 pois quando determinados os tempos ideais de exposição a essa solução, seus componentes
468 constituintes (glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e sacarose) podem atuar como agentes
469 antioxidantes e osmoprotetores permitindo a manutenção da viabilidade do material vegetal por
470 longos períodos em temperatura ultrabaixas (Whelehan et al., 2022). Em embriões zigóticos de
471 *Passiflora ligularis*, por exemplo, o uso do PVS2 por 60 minutos permitiu aumentos nos níveis
472 de prolina e atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e APX) resultando na diminuição
473 dos danos a membranas celulares, o PVS2 também permitiu maior mobilização de reservas
474 lipídicas durante a germinação dos embriões (Prudente et al., 2019).

475 De fato, tanto as condições de exposição ao NL quanto o uso de soluções crioprotetoras
476 podem modificar a dinâmica de sinalização de osmótica e oxidativa (EROs), e isso está

477 diretamente correlacionado com a manutenção da viabilidade do material criopreservado
478 (Prudente et al., 2017). Assim, os estímulos de indução e inibição da endoreduplicação
479 presenciados nas sementes de pitaya podem estar relacionados com a sinalização oxidativa e
480 osmótica da criopreservação. Os níveis de H_2O_2 mostraram-se distintos entre os tratamentos
481 (Figura 6A) principalmente nos tempos 30 e 60 dias, cuja a presença de PVS2 permitiu redução
482 significativa dessa molécula reativa. A peroxidação lipídica (Figura 6B) não diferiu entre os
483 tempos de criopreservação sem PVS2, mas foi significativamente maior nos tratamentos com a
484 solução crioprotetora. Portanto, o aumento dos níveis de H_2O_2 e manutenção de MDA nos
485 tempos de 30 e 60 dias caracterizam uma sinalização oxidativa, já a redução de H_2O_2 e aumentos
486 dos níveis de peroxidação lipídica nos tratamentos com PVS2 configura um estresse oxidativo
487 mediado possivelmente por outras formas reativas de EROs.

488 O efeito crioprotetor do DMSO presente em PVS2 está associado ao afrouxamento das
489 membranas, resultando em interações eletrostáticas entre a porção polar sulfóxido do DMSO e
490 os resíduos de fosfatidilserina nas membranas fosfolipídicas (Hughes et al., 2013). No entanto,
491 concentrações ou tempos de exposição suficientemente altos de DMSO podem causar a
492 formação de poros ou até mesmo a desnaturação da bicamada lipídica (Raju et al., 2021). A
493 capacidade de eliminar ânions hidroxila (OH^-) tanto do DMSO quanto o glicerol também pode
494 ser suprimida quando os protocolos de criopreservação não são adequados (Whelehan et al.,
495 2022). Esse ânion (OH^-) é altamente reativo e pode ser formado por reações espontâneas
496 (reações de fenton), principalmente em condições de armazenamento de sementes (Vásquez-
497 Vivar et al., 2000; Ratajczak et al., 2019; Shvachko and Khlestkina, 2020). Assim, o aumento
498 dos danos a membranas celulares presentes nos tratamentos com PVS2 pode estar mais
499 relacionada com tempo de exposição a essa solução (30 min), e não necessariamente aos tempos
500 de criopreservação em NL.

501 As enzimas CAT e APX são destinadas a eliminação de H_2O_2 provocado pelo estresse,
502 permitindo a manutenção da homeostase redox a um nível necessário para todos os aspectos do
503 crescimento e desenvolvimento normal da planta (Anjum et al., 2016). As atividades dessas
504 enzimas foram maiores na criopreservação por 30 e 60 dias com PVS2 (Figura 6D e 6E), isso
505 está atrelado a redução dos níveis de H_2O_2 (Figura 5A). A enzima SOD é responsável pela
506 catálise de dismutação de O_2^-/HO_2^- em H_2O_2 regulando o estado redox da célula vegetal
507 (Lightfoot et al., 2017). Os tempos de criopreservação de 0 e 60 dias com PVS2 apresentaram
508 maiores atividade de dismutação (Figura 6C), as altas atividades da CAT e APX no tempo de
509 60 dias permitiram a redução de H_2O_2 a baixos níveis, já as reduzidas atividades dessas duas
510 enzimas no tempo 0 poderia explicar a manutenção dos níveis de H_2O_2 e elevação da
511 peroxidação lipídica neste tratamento. Esses resultados sugerem que o PVS2 seja um promotor
512 do metabolismo antioxidantes, principalmente nos tempos de criopreservação de 30 e 60 dias.

513 Tomados em conjuntos, os presentes resultados confirmam que a sinalização oxidativa da
514 criopreservação de sementes de pitaya com e sem PVS2 foi claramente distinta em ambas
515 situações e isso, a princípio, pode estar relacionado com a indução e/ou inibição da
516 endoreduplicação. EROs são consideradas subprodutos tóxicos inevitáveis do metabolismo
517 aeróbico (Wani et al., 2021), no entanto elas desempenham papel duplo na biologia das plantas,
518 pois funcionam também como moléculas sinalizadoras necessárias para diversos processos
519 biológicos básicos (Mittler, 2017; Mhamdi and Van Breusegem, 2018). Notavelmente, EROs
520 podem atuar como importantes mensageiros de sinalização no controle do ciclo celular vegetal

521 (Velappan et al., 2017), logo é presumível uma relação entre a sinalização de EROs e a indução
522 da endoreduplicação.

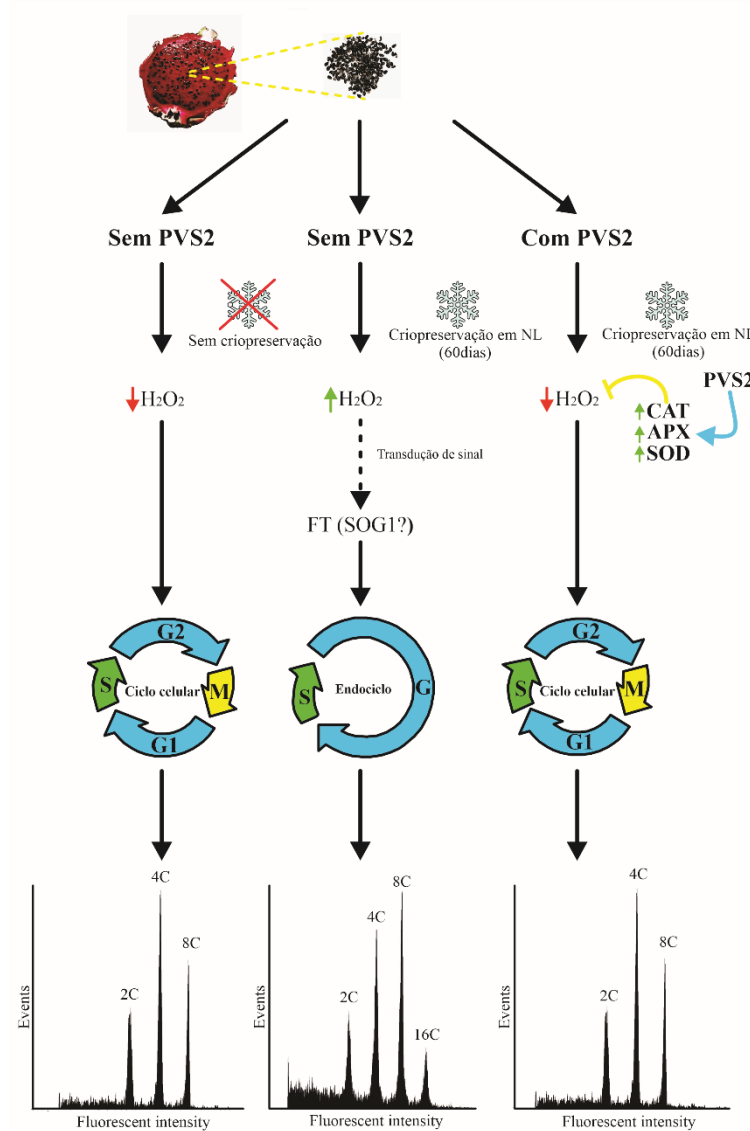
523 De fato, a percepção de sinais de oxidativos e/ou estresse ambientais ativa cascatas de
524 sinalização que desencadeiam fluxos de íons, cascatas de quinase, produção de EROs e acúmulo
525 de hormônios, como ácido abscísico e ácido jasmônico. Essas moléculas sinalizadoras
526 suprimem as atividades das vias de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) para controlar o
527 nível de expressão de ciclinas (CYCs) ou regular a modificação pós-traducional das CDKs e,
528 como consequência, interromper ou mesmo sair do ciclo celular (Qi and Zhang, 2020). A
529 degradação ou inativação de CYCs ou CDKs são gatilhos para a indução da endoreduplicação,
530 pois a transição G2/M é dependente da formação do complexo CDK/CYC e a repressão deste
531 permite a entrada no endociclo (Breuer et al., 2014; Wildermuth et al., 2017; Mahapatra and
532 Roy, 2020).

533 Duan et al., 2020 forneceram várias linhas de evidências para apoiar a noção de que a
534 sinalização retrógrada de EROs plastídica induziu a endoreduplicação e afetou o progresso do
535 ciclo celular. Foi demonstrado que o fator de transcrição SOG1 intermediou os sinais de
536 instabilidade do genoma decorrentes de EROs, desencadeando respostas no prolongamento do
537 ciclo celular da fase G2/M promovendo a endoreduplicação. Esse estudo mostrou que o
538 aumento da expressão de genes relacionados ao ciclo celular, incluindo *SMR5* e *SMR7* que são
539 repressores de CDKs, foi dependente de SOG1. Esse fator de transcrição (TF) também
540 intermediou sinais oxidativos resultantes de estresse por metais pesados (Cádmio) em plântulas
541 de *Arabidopsis*, a maior expressão dos genes *SMR4-5-7*, decorrentes desse TF, promoveu a
542 endoreduplicação e aumento da proporção de núcleos 16C e 32C nas folhas (Hendrix et al.,
543 2018).

544 O estresse oxidativo resultante de alta salinidade também induziu a endopoliploidia em
545 células das raízes de *Arabidopsis thaliana*. A sinalização EROs induziu a endoreduplicação por
546 meio de SOG1, esse TF regulou a expressão de vários reguladores da progressão do ciclo celular
547 e endoreduplicação, incluindo *CDKB1;1*, *CDKB2;1*, *CYCB1;1*, *CCS52A*, *WEE1* e *E2Fa*,
548 resultando na entrada no endociclo (Mahapatra and Roy, 2021). Outros estudos também relatam
549 que condições indutoras de estresse no DNA promovem a fosforilação de SOG1, e este fator de
550 transcrição ativa várias respostas a danos no DNA, modulando o progresso do ciclo celular por
551 meio da expressão de genes do ciclo celular (Yoshiyama et al., 2017; Chen et al., 2019;
552 Mahapatra and Roy, 2019; Hendrix et al., 2020).

553 A promoção de estresses ambientais desencadeando estímulos oxidativos e
554 endoreduplicação parece não ser restrita a uma especificidade de agente estressor, uma vez que
555 estresses luminosos (Okello et al., 2016), hídricos (Li et al., 2019), por microrganismos
556 (Wildermuth et al., 2017), salinos (Barkla et al., 2018), metais pesados (Hendrix et al., 2020) e
557 por herbivoria (Paige, 2018) também alteraram os níveis de ploidia, via endoreduplicação, em
558 pelo menos um dos tecidos da planta. De modo similar, no presente estudo foi demonstrado que
559 a criopreservação de sementes de pitaya por 30 e 60 dias induziu sinalização oxidativa
560 promovendo a endoreduplicação, já a criopreservação de sementes com soluções crioprotetoras
561 (PVS2) aumentou a eficiência do metabolismo antioxidante na eliminação de H₂O₂ reprimindo
562 os estímulos de endoreduplicação (Figura 7). Esses resultados reforçam a ideia de que sinais
563 oxidativos, provenientes de agentes estressores, atuam como indutores da endoreduplicação,

564 resultando em respostas na tolerância a estresses ambientais e/ou promoção de crescimento
565 vegetativo.



566

567 **Figura 07.** Modelo esquemático dos estímulos de indução da endoreduplicação da pitaya
568 vermelha por meio da criopreservação de sementes. Sementes não criopreservadas sem solução
569 crioprotetora (PVS2) mantêm seus níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) baixos e não
570 apresentam desvios no ciclo celular vegetal. Sementes criopreservadas em nitrogênio líquido
571 por 60 dias induz aumentos nos níveis de H_2O_2 desencadeando estímulos para entrada no
572 endociclo (endoreduplicação). Já a criopreservação de sementes com PVS2 aumenta a
573 eficiência do metabolismo antioxidante na eliminação de H_2O_2 reprimindo os estímulos de
574 endoreduplicação.

575 5. Conclusões

576 Este estudo fornece novas evidências de que a endoreduplicação é responsiva não apenas
577 aos estímulos de desenvolvimento vegetal, mas também a estímulos externos. Elencamos

578 evidências de que a criopreservação direta de sementes de pitaya vermelha em NL por 30 e 60
579 dias induziu sinalização oxidativa para a promoção da endoreduplicação. Conforme revelado
580 por citometria de fluxo, as porcentagens de núcleos octaploides foram superiores nas plântulas
581 oriundas da criopreservação de sementes por 60 dias em NL, e isso pode estar relacionado com
582 os maiores incrementos em altura e biomassa vegetal nas plântulas. Comprovamos também que
583 o uso de soluções crioprotetoras (PVS2) durante a criopreservação de sementes aumenta a
584 eficiência do metabolismo antioxidante em eliminar H₂O₂, reprimindo os estímulos de
585 endoreduplicação mantendo as porcentagens de núcleos 2C, 4C e 8C estáveis.

586 **6.Referências bibliográficas**

- 587 Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., et al.
588 (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme
589 enzymes in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 19002–19029. doi:10.1007/s11356-016-
590 7309-6.
- 591 Banerjee, G., Singh, D., and Sinha, A. K. (2020). Plant cell cycle regulators: Mitogen-
592 activated protein kinase, a new regulating switch? *Plant Sci.* 301, 110660.
593 doi:10.1016/j.plantsci.2020.110660.
- 594 Barkla, B. J., Rhodes, T., Tran, K. N. T., Wijesinghe, C., Larkin, J. C., and Dassanayake,
595 M. (2018). Making epidermal bladder cells bigger: Developmental-and salinity-induced
596 endopolyploidy in a model halophyte. *Plant Physiol.* 177, 615–632.
597 doi:10.1104/pp.18.00033.
- 598 Bhosale, R., Boudolf, V., Cuevas, F., Lu, R., Eekhout, T., Hu, Z., et al. (2018). A
599 spatiotemporal dna endoploidy map of the arabidopsis root reveals roles for the
600 endocycle in root development and stress adaptation. *Plant Cell* 30, 2330–2351.
601 doi:10.1105/tpc.17.00983.
- 602 Bhosale, R., Maere, S., and De Veylder, L. (2019). Endoreplication as a potential driver of
603 cell wall modifications. *Curr. Opin. Plant Biol.* 51, 58–65.
604 doi:10.1016/j.pbi.2019.04.003.
- 605 Breuer, C., Braidwood, L., and Sugimoto, K. (2014). Endocycling in the path of plant
606 development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 78–85. doi:10.1016/j.pbi.2013.11.007.
- 607 Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). “Microsomal lipid peroxidation,” in *Methods in*
608 *enzymology*, ed. ACADEMIC P, 302–310.
- 609 Carneiro, A. K., Montessoro, P. da F., Fusaro, A. F., Araújo, B. G., and Hemerly, A. S.
610 (2021). Plant cdks—driving the cell cycle through climate change. *Plants* 10.
611 doi:10.3390/plants10091804.
- 612 Chen, P., Sjogren, C. A., Larsen, P. B., and Schnittger, A. (2019). A multi-level response to
613 DNA damage induced by aluminium. *Plant J.* 98, 479–491. doi:10.1111/tpj.14231.
- 614 Chevalier, C., Bourdon, M., Pirrello, J., Cheniclet, C., Gévaudant, F., and Frangne, N. (2014).
615 Endoreduplication and fruit growth in tomato: Evidence in favour of the karyoplasmic

- 616 ratio theory. *J. Exp. Bot.* 65, 2731–2746. doi:10.1093/jxb/ert366.
- 617 Corneillie, S., De Storme, N., Van Acker, R., Fangel, J. U., De Bruyne, M., De Rycke, R., et
618 al. (2019). Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant*
619 *Physiol.* 179, 74–87. doi:10.1104/pp.18.00967.
- 620 Das, M. C., Devi, S. D., Kumaria, S., and Reed, B. M. (2021). Looking for a way forward for
621 the cryopreservation of orchid diversity. *Cryobiology* 102, 1–14.
622 doi:10.1016/j.cryobiol.2021.05.004.
- 623 de Menezes, T. P., Gomes, W. de A., Pio, L. A. S., Pasqual, M., and Ramos, J. D. (2012).
624 Micropropagação e endoreduplicação em pitaya vermelha, *hylocereus undatus* haw.
625 *Biosci. J.* 28, 868–876.
- 626 Del Prete, S., Molitor, A., Charif, D., Bessoltane, N., Soubigou-Taconnat, L., Guichard, C., et
627 al. (2019). Extensive nuclear reprogramming and endoreduplication in mature leaf
628 during floral induction. *BMC Plant Biol.* 19, 1–19. doi:10.1186/s12870-019-1738-6.
- 629 Doležel, J., and Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear
630 genome size. *Ann. Bot.* 95, 99–110. doi:10.1093/aob/mci005.
- 631 Duan, S., Hu, L., Dong, B., Jin, H. L., and Wang, H. Bin (2020). Signaling from Plastid
632 Genome Stability Modulates Endoreplication and Cell Cycle during Plant Development.
633 *Cell Rep.* 32, 108019. doi:10.1016/j.celrep.2020.108019.
- 634 Ferreira, D. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons.
635 *Ciência e Agrotecnologia* 32, 109–112.
- 636 Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K. (1977). Superoxide Dismutases. *Plant Physiol.* 59, 315–
637 318. doi:10.1016/S0079-6603(08)60843-0.
- 638 Havir, E. A., and McHale, N. A. (1987). Biochemical and Developmental Characterization of
639 Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* 84, 450–455.
640 doi:10.1104/pp.84.2.450.
- 641 Hendrix, S., Iven, V., Eekhout, T., Huybrechts, M., Pecqueur, I., Horemans, N., et al. (2020).
642 Suppressor of Gamma Response 1 Modulates the DNA Damage Response and Oxidative
643 Stress Response in Leaves of Cadmium-Exposed *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*
644 11. doi:10.3389/fpls.2020.00366.
- 645 Hendrix, S., Keunen, E., Mertens, A. I. G., Beemster, G. T. S., Vangronsveld, J., and
646 Cuyper, A. (2018). Cell cycle regulation in different leaves of *Arabidopsis thaliana*
647 plants grown under control and cadmium-exposed conditions. *Environ. Exp. Bot.* 155,
648 441–452. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.06.026.
- 649 Hughes, Z. E., Malajczuk, C. J., and Mancera, R. L. (2013). The effects of cryosolvents on
650 DOPC- β -sitosterol bilayers determined from molecular dynamics simulations. *J. Phys.*
651 *Chem. B* 117, 3362–3375. doi:10.1021/jp400975y.

- 652 Johansen, D. A. (1940). *Plant microtechnique*. London: McGraw-Hill Publishing Company
653 Ltd.
- 654 Lang, L., and Schnittger, A. (2020). Endoreplication — a means to an end in cell growth and
655 stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 54, 85–92. doi:10.1016/j.pbi.2020.02.006.
- 656 Li, F., Wang, L., Zhang, Z., Li, T., Feng, J., Xu, S., et al. (2019). ZmSMR4, a novel cyclin-
657 dependent kinase inhibitor (CKI) gene in maize (*Zea mays* L.), functions as a key player
658 in plant growth, development and tolerance to abiotic stress. *Plant Sci.* 280, 120–131.
659 doi:10.1016/j.plantsci.2018.03.007.
- 660 Lichtenzweig, J., Abbo, S., Nerd, A., Tel-Zur, N., and Mizrahi, Y. (2000). Cytology and
661 mating systems in the climbing Cacti *Hylocereus* and *Selenicereus*. *Am. J. Bot.* 87,
662 1058–1065. doi:10.2307/2657005.
- 663 Lightfoot, D. J., Mcgrann, G. R. D., and Able, A. J. (2017). The role of a cytosolic superoxide
664 dismutase in barley–pathogen interactions. *Mol. Plant Pathol.* 18, 323–335.
665 doi:10.1111/mpp.12399.
- 666 Liu, Z., Chen, G., Gao, F., Xu, R., Li, N., Zhang, Y., et al. (2019). Transcriptional repression
667 of the APC/C activator genes *ccs52a1/a2* by the mediator complex subunit MED16
668 controls endoreduplication and cell growth in arabidopsis. *Plant Cell* 31, 1899–1912.
669 doi:10.1105/tpc.18.00811.
- 670 Lopes, C., Dias, G., Silveira, F., Rodrigues, F., Pio, L., and Pasqual, M. (2017). Propagação in
671 vitro de pitaya vermelha. *Plant Cell Cult. Micropropag.* 13, 21–27.
- 672 Mahapatra, K., and Roy, S. (2019). An insight into the folding and stability of Arabidopsis
673 thaliana SOG1 transcription factor under salinity stress in vitro. *Biochem. Biophys. Res.*
674 *Commun.* 515, 531–537. doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.183.
- 675 Mahapatra, K., and Roy, S. (2020). An insight into the mechanism of DNA damage response
676 in plants- role of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1: An overview. *Mutat. Res.*
677 *- Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 819–820, 111689.
678 doi:10.1016/j.mrfmmm.2020.111689.
- 679 Mahapatra, K., and Roy, S. (2021). SOG1 transcription factor promotes the onset of
680 endoreduplication under salinity stress in Arabidopsis. *Sci. Rep.* 11, 1–26.
681 doi:10.1038/s41598-021-91293-1.
- 682 Menezes, T. P., Pio, L. A. S., Ramos, J. D., Pasqual, M., and Setotaw, T. A. (2016).
683 Endoreduplication in floral structure, vegetative and fruits of red pitaya with white pulp.
684 *Biosci. J.*, 931–939. doi:10.14393/bj-v32n4a2016-32977.
- 685 Mercado-Silva, E. M. (2018). *Pitaya—Hylocereus undatus* (Haw). Elsevier Inc.
686 doi:10.1016/b978-0-12-803138-4.00045-9.
- 687 Mhamdi, A., and Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development.
688 *Development* 145, dev164376. doi:10.1242/dev.164376.

- 689 Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19.
690 doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- 691 Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with
692 tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- 693 Nakano, Y., and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific
694 peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- 695 Normah, M. N., Sulong, N., and Reed, B.M. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and
696 tropical species: Advances and strategies. *Cryobiology.* 87, 1-14.
697 doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.008
- 698 Nowicka, A., Kovacik, M., Tokarz, B., Vrána, J., Zhang, Y., Weigt, D., et al. (2021).
699 Dynamics of endoreduplication in developing barley seeds. *J. Exp. Bot.* 72, 268–282.
700 doi:10.1093/jxb/eraa453.
- 701 Okello, R. C. O., de Visser, P. H. B., Heuvelink, E., Marcelis, L. F. M., and Struik, P. C.
702 (2016). Light mediated regulation of cell division, endoreduplication and cell expansion.
703 *Environ. Exp. Bot.* 121, 39–47. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.04.003.
- 704 Paige, K. N. (2018). Overcompensation, environmental stress, and the role of
705 endoreduplication. *Am. J. Bot.* 105, 1105–1108. doi:10.1002/ajb2.1135.
- 706 Prudente, D. de O., and Paiva, R. (2017). Plant cryopreservation : Biochemical aspects. *J. Cell*
707 *Dev. Biol.* 1, 1–3. Available at: [http://www.imedpub.com/journal-cell-developmental-](http://www.imedpub.com/journal-cell-developmental-biology/)
708 [biology/](http://www.imedpub.com/journal-cell-developmental-biology/).
- 709 Prudente, D. de O., Paiva, R., Domiciano, D., Souza, L. B. de, Carpentier, S., Swennen, R., et
710 al. (2019). The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora*
711 *ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the
712 antioxidant metabolism. *J. Plant Physiol.* 239, 71–82. doi:10.1016/j.jplph.2019.05.014.
- 713 Prudente, D. de Ol., Paiva, R., Nery, F. C., de Oliveira Paiva, P. D., Alves, J. D., Máximo, W.
714 P. F., et al. (2017). Compatible solutes improve regrowth, ameliorate enzymatic
715 antioxidant systems, and reduce lipid peroxidation of cryopreserved *Hancornia speciosa*
716 Gomes lateral buds. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 53, 352–362. doi:10.1007/s11627-017-
717 9830-9.
- 718 Qi, F., and Zhang, F. (2020). Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress. *Front.*
719 *Plant Sci.* 10, 1–10. doi:10.3389/fpls.2019.01765.
- 720 Raju, R., Bryant, S. J., Wilkinson, B. L., and Bryant, G. (2021). The need for novel
721 cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of
722 biophysical investigation and cell permeability. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*
723 1865, 129749. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129749.
- 724 Ramula, S., Paige, K. N., Lennartsson, T., and Tuomi, J. (2019). Overcompensation: a 30-
725 year perspective. *Ecology* 100, 1–6. doi:10.1002/ecy.2667.

- 726 Ratajczak, E., Małecka, A., Ciereszko, I., and Staszak, A. M. (2019). Mitochondria are
727 important determinants of the aging of seeds. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
728 doi:10.3390/ijms20071568.
- 729 Sakai, A., and Kobayashi, S., and Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of
730 navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell*
731 *Rep.* 9, 30–33. doi.org/10.1007/BF00232130.
- 732 Scholes, D. R., and Paige, K. N. (2015). Plasticity in ploidy: A generalized response to stress.
733 *Trends Plant Sci.* 20, 165–175. doi:10.1016/j.tplants.2014.11.007.
- 734 Scholes, D. R., Rasnick, E. N., and Paige, K. N. (2017). Characterization of *Arabidopsis*
735 *thaliana* regrowth patterns suggests a trade-off between undamaged fitness and damage
736 tolerance. *Oecologia* 184, 643–652. doi:10.1007/s00442-017-3897-1.
- 737 Shvachko, N., and Khlestkina, E. K. (2020). Molecular genetic bases of seed resistance to
738 oxidative stress during storage. *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii* 24, 451–458.
739 doi:10.18699/VJ20.47-O.
- 740 Tian, Y., Gu, H., Fan, Z., Shi, G., Yuan, J., Wei, F., et al. (2019). Role of a cotton
741 endoreduplication-related gene, GaTOP6B, in response to drought stress. *Planta* 249,
742 1119–1132. doi:10.1007/s00425-018-3067-7.
- 743 Torres-Silva, G., Matos, E. M., Correia, L. F., Fortini, E. A., Soares, W. S., Batista, D. S., et
744 al. (2020). Anatomy, Flow Cytometry, and X-Ray Tomography Reveal Tissue
745 Organization and Ploidy Distribution in Long-Term In Vitro Cultures of *Melocactus*
746 Species. *Front. Plant Sci.* 11, 1–13. doi:10.3389/fpls.2020.01314.
- 747 Tsukaya, H. (2019a). Has the impact of endoreduplication on cell size been overestimated?
748 *New Phytol.* 223, 11–15. doi:10.1111/nph.15781.
- 749 Tsukaya, H. (2019b). Re-examination of the role of endoreduplication on cell-size control in
750 leaves. *J. Plant Res.* 132, 571–580. doi:10.1007/s10265-019-01125-7.
- 751 Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., and Kennedy, M. C. (2000). Mitochondrial aconitase is
752 a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J. Biol. Chem.*
753 275, 14064–14069. doi:10.1074/jbc.275.19.14064.
- 754 Velappan, Y., Signorelli, S., and Considine, M. J. (2017). Cell cycle arrest in plants: What
755 distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? *Ann. Bot.* 120, 495–509.
756 doi:10.1093/aob/mcx082.
- 757 Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant
758 systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci.* 151, 59–66.
- 759 Wang, K., Ndathe, R. W., Kumar, N., Zeringue, E. A., Kato, N., and Larkin, J. C. (2020). The
760 CDK Inhibitor SIAMESE Targets Both CDKA;1 and CDKB1 Complexes to Establish
761 Endoreplication in Trichomes1[OPEN]. *Plant Physiol.* 184, 165–175.
762 doi:10.1104/PP.20.00271.

- 763 Wani, K. I., Naeem, M., Castroverde, C. D. M., Kalaji, H. M., Albaqami, M., and Aftab, T.
764 (2021). Molecular mechanisms of nitric oxide (No) signaling and reactive oxygen
765 species (ros) homeostasis during abiotic stresses in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22.
766 doi:10.3390/ijms22179656.
- 767 Wei, Z., Shi, X., Wei, F., Fan, Z., Mei, L., Tian, B., et al. (2019). The cotton endocycle-
768 involved protein SPO11-3 functions in salt stress via integrating leaf stomatal response,
769 ROS scavenging and root growth. *Physiol. Plant.* 167, 127–141. doi:10.1111/ppl.12875.
- 770 Whelehan, L. M., Funnekotter, B., Bunn, E., and Mancera, R. L. (2022). Review: The case for
771 studying mitochondrial function during plant cryopreservation. *Plant Sci.* 315, 111134.
772 doi:10.1016/j.plantsci.2021.111134.
- 773 Wildermuth, M. C., Steinwand, M. A., McRae, A. G., Jaenisch, J., and Chandran, D. (2017).
774 Adapted Biotroph Manipulation of Plant Cell Ploidy. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 537–
775 564. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035458.
- 776 Wos, G., Macková, L., Kubíková, K., and Kolář, F. (2022). Ploidy and local environment
777 drive intraspecific variation in endoreduplication in *Arabidopsis arenosa*. *Am. J. Bot.*
778 109, 259–271. doi:10.1002/ajb2.1818.
- 779 Yoshiyama, K. O., Kaminoyama, K., Sakamoto, T., and Kimura, S. (2017). Increased
780 phosphorylation of ser-gln sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1
781 strengthens the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 29, 3255–
782 3268. doi:10.1105/tpc.17.00267.
- 783 Zamecnik, J., Faltus, M., and Bilavcik, A. (2021). Vitrification solutions for plant
784 cryopreservation: Modification and properties. *Plants* 10. doi:10.3390/plants10122623.
- 785

**ARTIGO 2 - O papel do endociclo em pitaya (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber):
estímulos oxidativos, diferenciação tecidual e crescimento vegetativo**

Capítulo elaborado seguindo as normas da revista Planta (ISSN 1432-2048, JCR: 4,116).

O papel do endociclo em pitaya (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber): estímulos oxidativos, diferenciação tecidual e crescimento vegetativo

Breno Ítalo Durães Santana¹, Renato Paiva^{1*}, Michele Valquíria dos Reis², Lissa Vasconcellos Vilas Boas¹, Elyabe Monteiro Matos³, José Marcello Salabert de Campos³.

¹ Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil.

² Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil.

³ Laboratório de Genética e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

Autor de correspondência: Renato Paiva, renpaiva@ufla.br **Orcid-ID:** 0000-0001-5107-0285.

Conclusão principal: A variação dos níveis de ploidia, via endoreduplicação, em *Hylocereus costaricensis* é responsiva a estímulos oxidativos, está associada às especificidades das funções celulares e regula as taxas de crescimento vegetativo.

Resumo: A pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber) é uma Cactaceae que apresenta rápido crescimento mesmo em condições ambientais adversas. Isso pode estar relacionado aos ciclos de endoreduplicação (endociclos) e ao controle do ciclo celular. Aqui relatamos a descoberta de que estímulos oxidativos em sementes e do desenvolvimento das plântulas regulam o endociclo numa perspectiva espaço-temporal nos tecidos ao longo do desenvolvimento vegetal. A criopreservação de sementes por 60 dias em nitrogênio líquido induziu aumentos nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e atividades de enzimas antioxidantes. A sinalização EROs provavelmente induziu estímulos para endoreduplicação, aumentando a proporção de núcleos octaploides nas plântulas permitindo incrementos de biomassa vegetal. Contudo, ao longo do desenvolvimento, as sucessivas duplicações do genoma permitiram a equiparação dos níveis de ploidia de plântulas oriundas de sementes criopreservadas e não criopreservadas. O endociclo foi essencial para a diferenciação dos tecidos ao longo do desenvolvimento das plantas e os diferentes níveis de ploidia entre os tecidos estão diretamente relacionados às especificações das funções celulares. Hipotetizamos uma relação entre o aumento dos níveis de ploidia, via endociclo, com incrementos de biomassa vegetal durante as fases juvenis (crescimento vegetativo). Contudo, ao atingir a fase adulta reprodutiva foi observado redução dos níveis ploidia dos tecidos constituintes dos cladódios, e isso, a princípio, estaria relacionado com as reduções das taxas de crescimento vegetativos. Esses resultados sugerem que o endociclo em *H. costaricensis* seja um processo altamente dinâmico e modula os níveis de ploidia para diferenciação tecidual e crescimento vegetativo das plantas.

Palavras-chave: Endoreduplicação, mixoploidia, Cactaceae, EROs e endopoliploidia.

1 **Introdução**

2 O ciclo celular desempenha um papel fundamental no crescimento e
3 desenvolvimento das plantas (Qi and Zhang 2020). Ao longo do tempo, o processo do
4 ciclo celular foi amplamente categorizado em quatro estágios cronológicos principais:
5 uma fase pré-sintética de DNA com conteúdo nuclear 2C, denominada fase “G1”; uma
6 fase “S” que compreende a síntese de DNA, com conteúdo nuclear variando entre 2C e
7 4C; uma segunda fase pós-síntese de DNA com um conteúdo nuclear 4C, denominada
8 fase “G2”; e por fim a fase “M” ou mitose (Velappan et al. 2017; Banerjee et al. 2020).
9 O ciclo celular clássico envolve, portanto, a duplicação precisa do estoque de DNA
10 cromossômico durante a fase S e sua subsequente segregação igual nas células filhas após
11 a citocinese no final da fase M (Chevalier et al. 2014).

12 A dinâmica e abundância de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e ciclinas
13 (CYCs) regulam o ciclo celular vegetal (Carneiro et al. 2021). Diferentes complexos
14 CYCs-CDKs conduzem a progressão do ciclo celular fosforilando uma ampla gama de
15 substratos promovendo as transições G1/S e G2/M (Wildermuth et al. 2017). Para que o
16 ciclo celular prossiga, a atividade de CDK deve atingir dois níveis de limiar: um para
17 replicação de DNA (na transição G1/S) e outro para divisão celular (na transição G2/M)
18 (Banerjee et al. 2020). Essas proteínas são reguladas a nível transcricional, pós-
19 traducional ou até mesmo degradadas via proteossomo (Chevalier et al. 2014; Foyer et al.
20 2018) e estímulos ambientais e do desenvolvimento orquestram as interações desses
21 reguladores proteicos (De Simone et al. 2017; Carneiro et al. 2021).

22 A endoreduplicação, também chamada de endoreplicação ou endopoliploidização,
23 é uma variante do ciclo celular em que o genoma é replicado na ausência de mitose
24 causando poliploidização celular (Lang and Schnittger 2020). Em princípio, a
25 endoreduplicação inclui uma replicação completa do genoma (fase S), mas não possui
26 todas as características específicas da fase M, como segregação cromossômica e divisão
27 celular, ou seja, a fase M é seletivamente abortada e a célula reentra no estágio G1 com o
28 dobro de conjuntos cromossômicos (Breuer et al. 2014). As células vegetais podem
29 sucessivamente replicarem seus conteúdos de DNA sem mitose (endociclo), resultando
30 em duplicações dos níveis de ploidia a cada ciclo de endoreduplicação (Wildermuth et al.
31 2017).

32 Nas plantas, a endoreduplicação é parte integrante do desenvolvimento
33 tipicamente associado com o crescimento pós-mitótico de órgãos vegetais, como raízes,
34 hipocótilo e folhas (Matsuda et al. 2018; Del Prete et al. 2019; Mahapatra and Roy 2021).
35 Ela também compreende processos de diferenciação celular terminal em células de
36 grandes volumes, como tricomas (Wang et al. 2020) e em órgãos com alta capacidade de
37 armazenamento de macromoléculas, como endosperma e endocarpo (Farinati et al. 2021;
38 Nowicka et al. 2021). Em frutos de tomate, por exemplo, os ciclos de endoreduplicação
39 (endociclo) permitem obtenção de níveis de ploidia de até 512 C (Chevalier et al. 2014),
40 já células do endosperma de sementes de milho, inicialmente triploides, podem atingir
41 níveis de ploidia superiores a 200 vezes em algumas cultivares (Bauer and Birchler 2006;
42 Rangan 2020).

43 O aumento dos níveis de ploidia por endoreduplicação pode ser visto como um
44 mecanismo de auto-aprimoramento que promove aspectos celulares pré-programados de
45 desenvolvimento da célula (Lang and Schnittger 2020). Os endociclos ocorrem
46 predominantemente em células com grandes volumes e em células com alta atividade
47 metabólica, implicando que o aumento da ploidia eleva a expressão gênica global e a

48 produção macromolecular para atender às altas demandas de energia (Breuer et al. 2014;
49 Wildermuth et al. 2017). Em células do endocarpo de frutos de tomate, por exemplo, as
50 sucessivas duplicações do genoma parecem fornecer um suprimento de energia suficiente
51 para processos bioquímicos nucleares, como replicação de DNA, biogênese de
52 ribossomos, atividade transcricional e síntese de proteínas (Chevalier et al. 2014).

53 Como um modo alternativo de ciclo celular, não é surpreendente que o endociclo
54 utilize muitos elementos do ciclo mitótico, incluindo CYCs, CDKs e inibidores de CDK.
55 Evidências sugerem que o início, a progressão e a saída do endociclo são ajustados por
56 reguladores adicionais que modulam a transcrição e/ou modificação pós-traducional
57 desses reguladores do ciclo celular (Breuer et al. 2014). Para sair do programa mitótico e
58 transitar para o endociclo, a atividade do complexo CYC-CDK na transição G2/M deve
59 ser regulada negativamente, e isso pode ocorrer por meio de proteólise direcionada de
60 CYCs, regulação transcricional de CDKs ou CYCs e/ou inibição da atividade de CDKs
61 por determinados repressores (Wildermuth et al. 2017). Todos esses reguladores proteicos
62 podem ser regulados por estímulos ambientais (De Simone et al. 2017; Foyer et al. 2018).

63 De fato, a exposição de plântulas de *Arabidopsis thaliana* ao Cádmio (Cd) induziu
64 estresse oxidativo alterando os níveis de ploidia das plantas com o decorrer do tempo. As
65 porcentagens de núcleos 2C foram diminuindo à medida que núcleos 16C e 32C
66 aumentavam. A sinalização de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os danos
67 oxidativos no DNA desencadearam estímulos para maior expressão de genes de
68 inibidores de CDK (*SMR4*, *SMR5* e *SMR7*) promovendo a endoreduplicação, a percepção
69 desses estímulos foi mediada possivelmente pelo fator de transcrição (FT) SOG1 (Hendrix
70 et al. 2018). Esse FT desempenha um papel central no controle do ciclo celular,
71 endoreduplicação, reparo nos danos ao DNA e morte celular programada (Hendrix et al.
72 2020; Mahapatra and Roy 2020, 2021).

73 Em Cactaceae, o endociclo é parte integrante do crescimento e desenvolvimento
74 das plantas e esse mecanismo possivelmente está relacionado a uma maior tolerância a
75 estresses ambientais (de Menezes et al. 2012; Menezes et al. 2016; Torres-Silva et al.
76 2020). A variação dos níveis de ploidia em seus tecidos (mixoploidia) é uma característica
77 que permite a diferenciação tecidual, além disso, a otimização do armazenamento de água
78 no parênquima aquífero apresenta uma íntima relação com o endociclo, sendo portanto
79 um traço característico do desenvolvimento de Cactaceae (Torres-Silva et al. 2020). No
80 entanto, a falta de um conhecimento detalhado da ocorrência temporal e espacial da
81 endopoliploidia em uma espécie endoreplicante tem dificultado o estudo dos papéis
82 fisiológicos do endociclo (Bhosale et al. 2018, 2019). Assim, o objetivo deste trabalho foi
83 avaliar os estímulos oxidativos (oriundos da criopreservação de sementes) e do
84 desenvolvimento no endociclo de plântulas de uma Cactaceae, pitaya vermelha
85 (*Hylocereus costaricensis* F.A.C.Weber), afim de se estabelecer relações entre as
86 variações dos níveis de ploidia nos diferentes tecidos e dentro de cada tecido numa
87 perspectiva espaço-temporal ao longo do desenvolvimento das plantas.

88 **Material e métodos**

89 **Coleta, beneficiamento e criopreservação de sementes**

90 Frutos completamente maduros de pitaya vermelha (*H. costaricensis*), oriundos
91 de pomares de produção do Setor de Fruticultura da Universidade Federal de Lavras
92 (UFLA), foram despulpados para obtenção das sementes. Após a retirada da mucilagem,

93 as sementes foram submetidas à secagem em papel toalha sob temperatura ambiente por
94 15 dias, para posterior armazenamento em geladeira (4^oC) até realização do experimento.

95 Sementes sem solução crioprotetora foram acondicionadas em criotubos, e em
96 seguida imersas em nitrogênio líquido (NL). Os tratamentos eram compostos por dois
97 diferentes tempos de criopreservação em NL, 0 (controle) e 60 dias. Imediatamente após
98 a criopreservação, os criotubos foram reaquecidos em banho-maria a 40° C por dois
99 minutos (incluindo o tempo 0 de criopreservação). Uma parte das amostras foi destinada
100 à análise bioquímica, enquanto a outra metade foi desinfestada e semeada em substrato
101 para experimento em sistema semi-hidropônico.

102 **Crescimento vegetativo em sistema semi-hidropônico**

103 As sementes criopreservadas e não criopreservadas foram desinfestadas
104 primeiramente em álcool 70% por 60 segundos e posteriormente imersas em solução de
105 1% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial e tween 20 (duas gotas) por 20 minutos (Lopes
106 et al. 2017), em seguida lavadas em com água destilada para posterior semeadura em
107 tubetes (290 cm³) contendo fibra de coco. Após a germinação, foi padronizada uma
108 plântula (com aproximadamente 5 cm de altura) por tubete e cultivadas por 120 dias.

109 O experimento foi conduzido em ambiente protegido (estufa) no Horto Botânico
110 da UFLA. Os tubetes com os seus respectivos suportes foram alocados em um
111 reservatório retangular de fibras de vidro (300x60x20cm) contendo solução nutritiva
112 (720g de Hidrogood Fert[®] NPK-10-09-28; 540g de Haifa-Cal[®] GG - Ca(NO₃)₂; e 40 g
113 Hidrogood Fert[®] Quelato de Ferro EDTA diluídos em 1000 litros). Um sistema
114 automatizado de bombas permitia a renovação da solução nutritiva duas vezes ao dia.

115 Os tratamentos eram compostos por sementes criopreservadas por 60 dias e não
116 criopreservadas (controle, tempo 0 de criopreservação). O delineamento foi inteiramente
117 casualizados (DIC) com dez repetições (*n*=20) e uma planta por repetição.

118 Os parâmetros avaliativos eram constituídos por componentes bioquímicos
119 (proteínas totais, açúcares não redutores, açúcares solúveis totais, aminoácidos totais e
120 amido) e de crescimento (massa fresca e seca da parte aérea e sistema radicular, altura do
121 maior cladódio e número de brotações). As avaliações foram realizadas aos 120 dias após
122 a semeadura das sementes.

123 Aos 120 dias, dez cladódios de tamanho e massa semelhantes de cada tratamento
124 foram transplantados em vasos de sete litros contendo fibra de coco, fora do sistema semi-
125 hidropônico, visando o espessamento e distinção dos tecidos constituintes dos cladódios
126 (periderme, parênquima aquífero e feixes vasculares) para análise de citometria de fluxo.
127 Periodicamente eram retiradas brotações laterais dos cladódios até os 240 dias de cultivo.
128 A irrigação foi feita manualmente com a solução nutritiva descrita anteriormente.

129 **Análises bioquímicas**

130 **Atividade das enzimas antioxidantes, quantificação de peróxido de hidrogênio e** 131 **peroxidação lipídica**

132 Após a retomada do crescimento, cinco repetições de 0,1 g de sementes de ambos
133 os tratamentos foram maceradas em NL com PVPP (Polivinilpolipirrolidona) insolúvel.

134 As amostras maceradas foram acrescidas de 1,5 mL do tampão de extração composto de
135 fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM e ácido ascórbico 200 mM. O
136 homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante
137 coletado foi utilizado para quantificação das atividades da superóxido dismutase (SOD),
138 catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

139 A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da enzima em inibir a
140 fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis and Ries 1977). As leituras
141 foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima
142 capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da
143 CAT foi determinada conforme Havir and Mchale, (1987). A atividade dessa enzima foi
144 determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3
145 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção
146 molar utilizado foi de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da APX foi determinada segundo
147 Nakano and Asada, (1981), por meio do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato
148 a 290 nm e o coeficiente de extinção molar utilizado foi de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

149 O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi quantificado a partir de 100 mg de sementes
150 maceradas em NL, homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados a 12.000 g por 15
151 minutos, a 4 °C. Foi medida a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo
152 tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e 1 mL de iodeto de potássio (Velikova et al.
153 2000).

154 A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies
155 reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege and Aust, (1978).
156 100 mg de sementes foram macerados em NL acrescido de 20% de PVPP (m/v) e
157 homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi
158 centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas de 250 μL do sobrenadante foram
159 adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v)
160 de TCA), incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 minutos.

161 A paralisação da reação aconteceu por resfriamento rápido em gelo e as leituras
162 foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA formou
163 complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o
164 malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração
165 do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (\text{A}535 -$
166 $\text{A}600)/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico
167 = 1). A peroxidação foi expressa em μmol de MDA g^{-1} de matéria fresca.

168 **Quantificação de amido, sacarose, açúcares redutores, proteínas e aminoácidos**

169 Amostras de cladódios e raízes foram coletadas aos 120 dias de cultivo semi-
170 hidropônico para quantificação de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores,
171 proteínas e aminoácidos. Dez amostras de 0,2 g de material vegetal (cladódios e raízes)
172 de cada tratamento foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar
173 a 65 °C durante 7 dias (estabilização da massa seca) e posteriormente armazenadas em
174 papel tipo craft até o dia das análises. Carboidratos, proteínas e aminoácidos foram
175 extraídos pela homogeneização de 0,2 g de matéria seca (MS) de cladódios ou raízes em
176 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM e pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a

177 5.000 g por 10 minutos coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido e os
178 sobrenadantes, combinados perfazendo um volume final de 10 mL. O extrato bruto foi
179 utilizado para a quantificação de amido e açúcares solúveis totais pelo método Antrona
180 (Dische 1962), os açúcares redutores foram quantificados de acordo com o protocolo
181 descrito por Miller, (1959) utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), proteínas totais
182 pelo método de Bradford, (1976) e aminoácidos totais livres pelo ensaio da ninhidrina
183 (Kendall 1963).

184 **Anatomia vegetal**

185 Para análise de anatomia vegetal, cladódios de plântulas cultivadas por 120 dias
186 em sistema semi-hidropônico dos dois tratamentos de criopreservação de sementes foram
187 seccionados na região do terço médio e fixados em álcool 70%. Foi realizada desidratação
188 em série crescente de álcool (80%, 90% e álcool P.A.), permanecendo por duas horas sob
189 vácuo em cada concentração. Em seguida, foram submetidos a uma mistura de álcool e
190 Historesina® hidroxietilmetacrilato (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) ativada
191 (1:1) sob vácuo por duas horas e transferidas para inclusão overnight do material em
192 historresina ativada pura. O emblocamento foi realizado em historresina com Hardener.

193 As amostras emblocadas foram seccionadas em micrótomo, sendo obtidos cortes
194 transversais com espessura de 5 µm. Os fragmentos foram corados com solução de azul
195 de toluidina 0,5% (Johansen, 1940) e montados em lâminas com glicerol 50% (vv⁻¹). As
196 lâminas foram analisadas e fotografadas com o auxílio de microscópio óptico com câmera
197 acoplada LEICA ICC50 W® (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

198 **Quantificação de DNA e determinação dos níveis de ploidia**

199 Os níveis de ploidia e conteúdo de DNA foram determinadas por citometria de
200 fluxo. Foram realizadas amostragens aos 120 dias em sistema semi-hidropônico, aos 240
201 dias após o transplante e em plantas adultas de pomares de produção da UFLA (coleta
202 realizada em período anterior a emissão de botões florais em plantas com idade
203 aproximada de cinco anos que já iniciaram a fase adulta reprodutivas). Coletou-se
204 amostras de cladódios e raízes aos 120 dias e da periderme, parênquima aquífero, feixes
205 vasculares e raízes aos 240 dias de ambos os tratamentos de criopreservação. Padronizou-
206 se a amostragem dos cladódios na região basal do caule. Nas plantas adultas reprodutivas,
207 selecionou-se cladódios (80 a 100 cm de comprimento) da região basal das plantas para
208 amostragens da periderme, parênquima aquífero e feixes vasculares.

209 Aproximadamente 50 mg de material fresco foram picados com uma lâmina de
210 bisturi descartável de aço em 1 ml de tampão WPB para liberar os núcleos (Loureiro et
211 al. 2007). Os tecidos previamente macerados foram filtrados através de uma malha de
212 nylon de 50 µm e recolhidos num tubo de poliestireno. O filtrado foi corado com 25 µl
213 de solução de iodeto de propídio (1 mg ml⁻¹; Sigma-Aldrich). As amostras foram
214 incubadas a 4°C no escuro e examinadas após 30 minutos. Pelo menos 10.000 núcleos
215 foram analisados em cada amostra. Cinco amostras vegetais de cada tecido em cada um
216 dos tratamentos foram utilizadas para determinação das médias de conteúdo de DNA. O
217 padrão de referência interno usado foi *Vicia faba* (26,90 pg de DNA).

218 Os dados foram adquiridos em um instrumento CytoFLEX (Beckman Coulter Life
219 Sciences, Indianapolis, IN, Estados Unidos) no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da

220 Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e, em seguida, plotados e analisados no
221 programa CytExpert 2.0.1. O conteúdo de DNA nuclear (pg) foi estimado de acordo com
222 equação proposta por Doležel and Bartos, 2005.

223 **Análise estatística**

224 Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e
225 submetidos à análise de variância e quando significativos, as médias foram comparadas
226 pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$). Procedeu-se test t de student ou
227 análise descritiva dos dados quando o número de parcelas amostrais não permitia a análise
228 de variância ($n < 20$). Todos esses procedimentos foram realizados com auxílio do software
229 Sisvar 5.0 (Ferreira, 2014).

230 **Resultados**

231 **Análise do metabolismo antioxidante de sementes criopreservadas**

232 A análise das médias pelo teste t de student revelou significância ($p < 0,05$) para os
233 níveis de H_2O_2 e atividades enzimáticas da APX e SOD. Já as médias dos níveis de MDA
234 e atividade enzimática da CAT não diferiram entre si ($p > 0,05$). A criopreservação de
235 sementes de pitaya vermelha por 60 dias em NL permitiu incrementos significativos
236 (58,21%) nos níveis de H_2O_2 (Fig. 1a) quando comparada ao tratamento controle (0,053
237 $mmol H_2O_2 g^{-1} MF$). As médias dos danos oxidativos às membranas celulares (MDA)
238 foram similares e não diferiram entre os tratamentos (Fig. 1b). A atividade enzimática da
239 SOD foi maior nas sementes criopreservadas (Fig. 1c), a reação de dismutação dessa
240 enzima foi 32,87% superior nas sementes imersas em NL quando comparada ao
241 tratamento controle (871,71 Unid. SOD $min^{-1} g^{-1} MF$). A atividade da APX (Fig. 1d)
242 também foi maior em sementes criopreservadas, esse tratamento exibiu incremento de
243 18,56% na atividade dessa enzima em relação a sementes não criopreservadas (11,81
244 $nmol ASA min^{-1} g^{-1} MF$). A capacidade de eliminar H_2O_2 pela CAT (Fig. 1e) foi similar
245 em ambos os tratamentos.

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

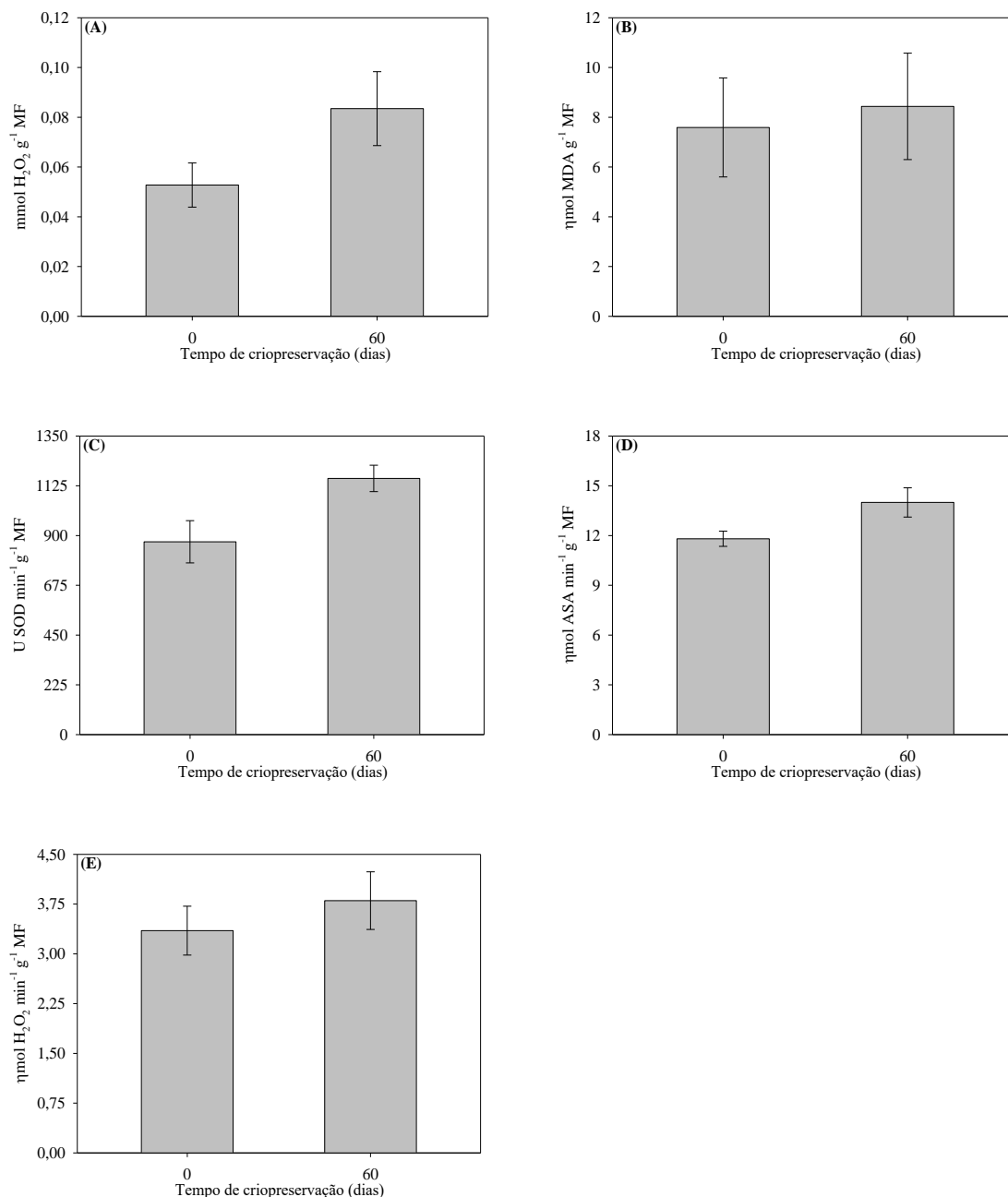
257

258

259

260

261



262 **Fig. 1.** Níveis de H₂O₂ (A), malondialdeído (B), atividade enzimática da Superóxido
 263 Desmutase (C), atividade enzimática da Ascorbato Peroxidase (D) e atividade enzimática
 264 da Catalase (E) de dois de tempos de criopreservação de sementes de pitaya vermelha
 265 (*Hylocereus costaricensis*) em nitrogênio líquido. As barras de erro representam o desvio
 266 padrão.

267 **Análise de crescimento de plântulas e quantificação de macromoléculas**

268 Após 120 dias de semeadura, as plântulas oriundas da criopreservação de
 269 sementes por 60 dias apresentaram, em todas as variáveis biométricas, maiores médias e
 270 diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) quando comparadas ao tratamento controle (Tabela
 271 1). As variáveis altura, número de brotações, massa fresca e seca da parte aérea, massa
 272 fresca e seca das raízes, massa fresca e seca total das plântulas oriundas do tratamento

273 com criopreservação por 60 dias apresentaram incrementos relativos (IR%) ao tratamento
274 sem criopreservação (controle) (Tabela 1).

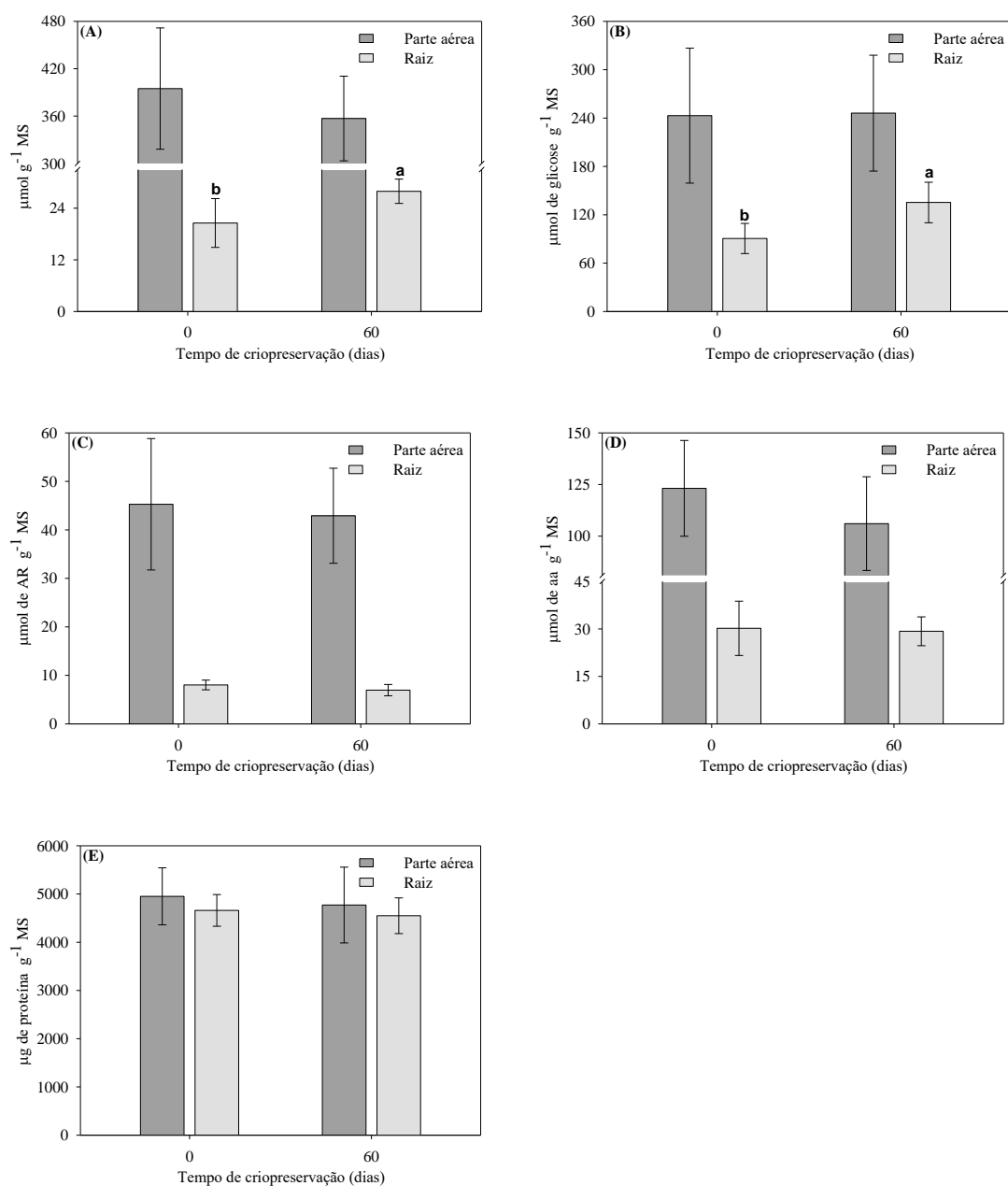
275 **Tabela 1.** Variáveis morfométricas de plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus*
276 *costaricensis*) cultivadas em sistema semi-hidropônico por 120 dias oriundas de sementes
277 de dois tempos de criopreservação (0 e 60 dias) em nitrogênio líquido.

Parâmetros avaliativos	Tempo de criopreservação (dias)		
	0	60	
Variáveis morfométricas	média	média	IR (%)
Altura (cm)	15,9 ± 3,16 B	20,22 ± 3,69 A	27,17
Número de brotações	12,6 ± 5,10 B	20,9 ± 5,41 A	65,87
Massa fresca parte aérea (g)	29,2 ± 5,65 B	42,8 ± 3,49 A	46,57
Massa seca parte aérea (g)	1,22 ± 0,27 B	1,74 ± 0,16 A	42,62
Massa fresca sistema radicular (g)	0,08 ± 0,02 B	0,12 ± 0,03 A	50,00
Massa seca sistema radicular (g)	0,06 ± 0,03 B	0,1 ± 0,02 A	66,67
Massa fresca total (g)	29,28 ± 5,65 B	42,92 ± 3,51 A	46,58
Massa seca total (g)	1,29 ± 0,29 B	1,84 ± 0,17 A	55,00

278 Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey
279 ($p < 0,05$); IR(%): incremento relativo ao tratamento sem criopreservação de sementes
280 (controle, tempo 0).

281 As análises de quantificação de macromoléculas revelaram perfis distintos dessas
282 moléculas entre os órgãos da planta (cladódios e raízes). Não foram observadas diferenças
283 estatísticas ($p > 0,05$) entre as médias dos teores de amido (Fig. 2a), açúcares solúveis
284 totais (Fig. 2b), açúcares redutores (Fig. 2c), aminoácidos (Fig. 2d) e proteínas (Fig. 2e)
285 dos cladódios nas duas condições de criopreservação. Somente as médias dos teores de
286 amido (Fig. 2a) e açúcares solúveis totais (Fig. 2b) das raízes diferiram entre si ($p < 0,05$).
287 A criopreservação de sementes permitiu incrementos de 35,89 e 49,33% dessas
288 moléculas, respectivamente.

289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308



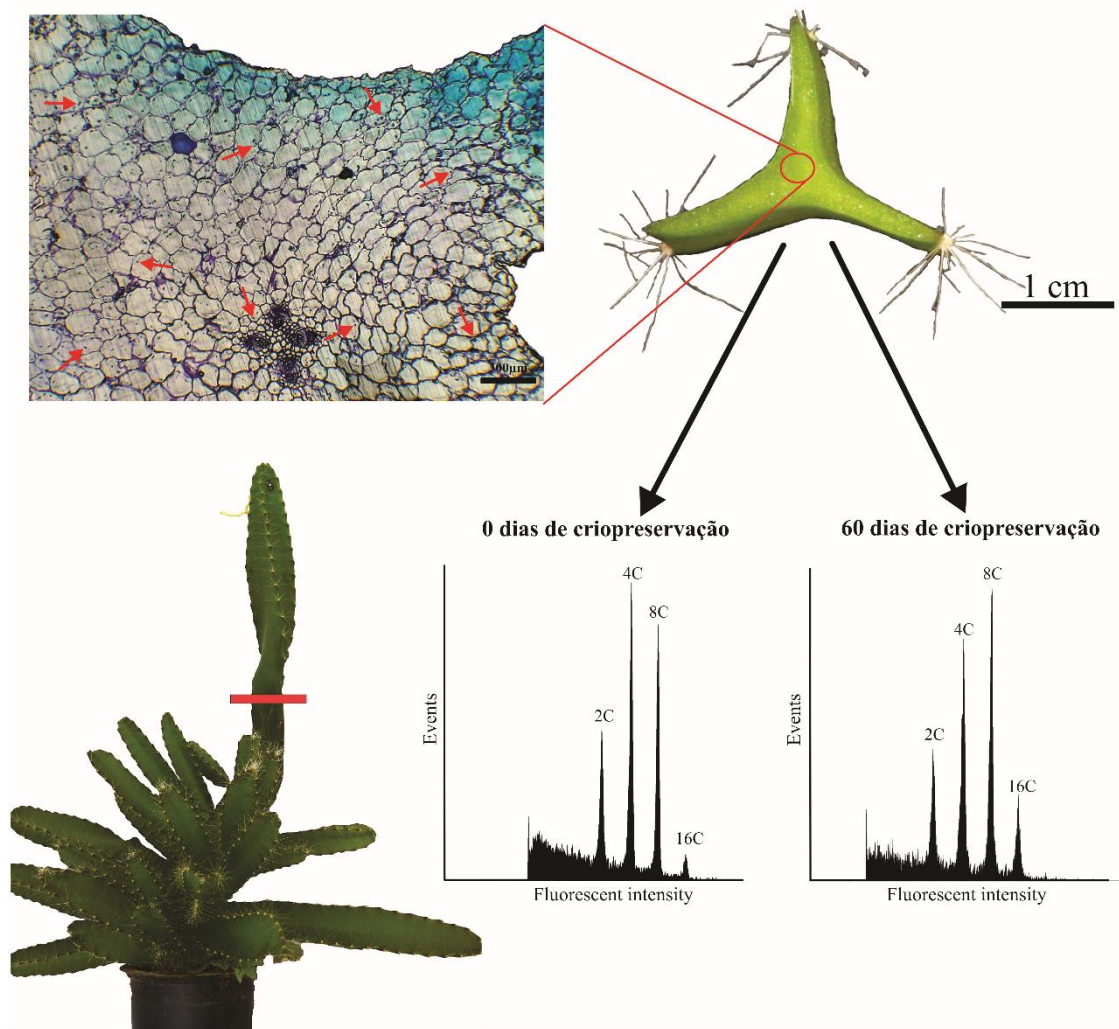
310 **Fig. 2.** Quantificação dos teores de macromoléculas na parte aérea (cladódios) e raízes de
 311 plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) oriundas de dois tempos de
 312 criopreservação de sementes e cultivadas em sistema semi-hidropônico por 120 dias.
 313 Teores de amido (A), açúcares solúveis totais (B), açúcares redutores (C), aminoácidos
 314 (D) e proteínas (E). As barras de erro representam o desvio padrão. Barras seguidas da
 315 mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

316 **Análise de citometria de fluxo**

317 Aos 120 dias de cultivo em sistema semi-hidropônico, não foi possível estabelecer
 318 delimitações precisas entre os tecidos constituintes dos cladódios (parênquima aquífero e
 319 periderme). Todas as regiões topográficas apresentaram células com grandes volumes
 320 (característica parênquima aquífero) com a presença de cloroplastos (característica

321 periderme) em ambos os tratamentos de criopreservação (Fig. 3). A análise de citometria
 322 de fluxo dos cladódios revelou que, até esta data, as plântulas oriundas de sementes não
 323 criopreservadas (controle) e criopreservadas (60 dias em NL) exibiam níveis de ploidia
 324 similares, até 16C (Fig. 3).

325



326

327 **Fig. 3.** Diagrama representativo da segmentação (barra vermelha) do cladódio de
 328 plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) cultivadas em sistema semi-
 329 hidropônico por 120 dias para análise de anatomia vegetal. Os histogramas representam
 330 os níveis de ploidia dos cladódios oriundos dos dois tratamentos de criopreservação de
 331 sementes. Setas vermelhas no corte transversal anatômico do cladódio indicam a presença
 332 de cloroplastos em células com grande volume celular.

333 As porcentagens de núcleos em cada nível de ploidia se mostraram distintas
 334 (Tabela 2), plântulas provenientes do tratamento controle 23,45; 40,79; 30,46 e 5,3% dos
 335 núcleos eram 2C, 4C, 8C e 16C, respectivamente, ao passo que no tratamento com
 336 criopreservação seus valores correspondiam a 14,38; 31,43; 39,68 e 14,51%. O pico 16C
 337 é possivelmente o estágio G2 de núcleos 8C. Apenas 35,76% dos núcleos eram
 338 octaploides no tratamento controle (30,46 + 5,3%), enquanto 54,19% dos núcleos
 339 apresentaram oito conjuntos cromossômicos no tratamento com criopreservação de
 340 sementes (39,68 + 14,51%). A porcentagem de núcleos 2C e 4C das raízes foram similares

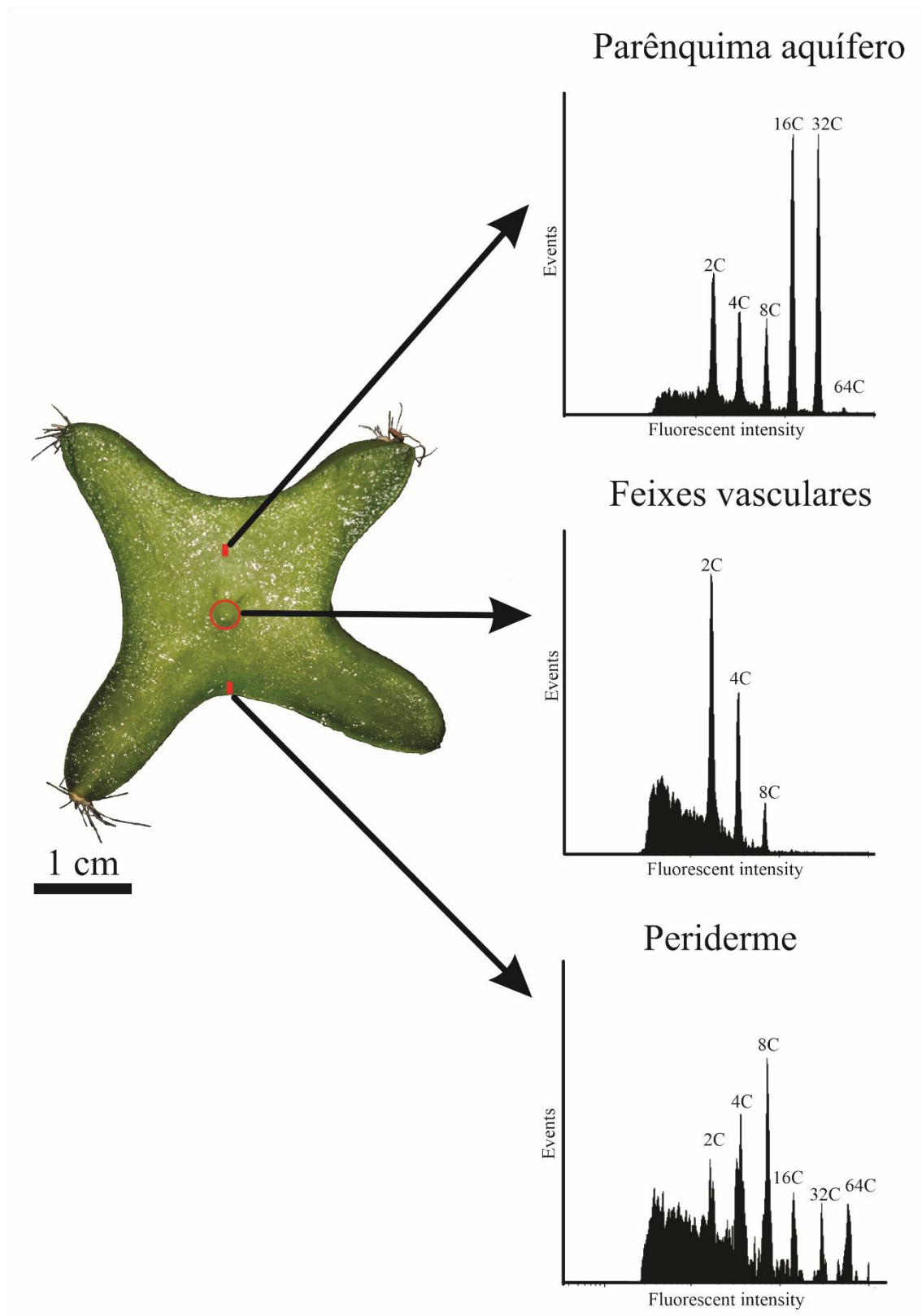
341 em ambos os tratamentos, aproximadamente 75% dos núcleos eram diploides e 25% dos
 342 núcleos tetraploides. Não houve diferenças significativas no conteúdo de DNA entre os
 343 tratamentos, tecidos e níveis de ploidia.

344 **Tabela 02.** Descrição da porcentagem de núcleos e conteúdo de DNA em cada nível de
 345 ploidia por tecido de plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) cultivadas
 346 por 120 em sistema semi-hidropônico oriundas de dois tempos de criopreservação de
 347 sementes.

Tempo de criopreservação (dias)	Tecido	Variáveis	Ploidia			
			2C	4C	8C	16C
0	Cladódio	Conteúdo DNA	5,63 ±	11,24 ±	21,39 ±	43,83 ±
		(pg)	0,2	0,49	0,77	3,96
		Núcleos (%)	23,45 ±	40,79 ±	30,46 ±	5,3 ±
	Raiz	Conteúdo DNA	2,31	3,18	4,58	3,67
		(pg)	5,92 ±	12,03 ±	---	---
		Núcleos (%)	0,31	0,43	---	---
60	Cladódio	Conteúdo DNA	74,47 ±	25,53 ±	---	---
		(pg)	3,78	3,33	---	---
		Núcleos (%)	5,74 ±	11,14 ±	22,20 ±	42,39 ±
	Raiz	Conteúdo DNA	0,35	0,92	1,65	1,30
		(pg)	14,38 ±	31,43 ±	39,68 ±	14,51 ±
		Núcleos (%)	2,57	1,98	5,12	3,89
Raiz	Conteúdo DNA	6,06 ±	12,27 ±	---	---	
	(pg)	0,25	0,37	---	---	
	Núcleos (%)	75,49 ±	24,51 ±	---	---	
		Núcleos (%)	3,08	3,21	---	---

348 *pg = picograma.

349 Aos 240 dias de indução do espessamento das mudas, os níveis de ploidia dos
 350 tecidos constituinte dos cladódios (periderme, parênquima aquífero e feixes vasculares)
 351 mostraram uma clara distinção do número de conjuntos cromossômicos entre os tecidos
 352 (Fig. 4), contudo não foram observadas diferenças entre os tratamentos de
 353 criopreservação de sementes (Tabela 3). A periderme e o parênquima aquífero exibiram
 354 ploidia de até 64C, os feixes vasculares até 8C já as raízes até 4C.



355

356 **Fig. 4.** Diagrama representativo da segmentação do cladódio de pitaya vermelha
 357 (*Hylocereus costaricensis*) transplantedo e induzido ao espessamento aos 240 dias.
 358 Cladódios seccionados transversalmente tiveram seus tecidos segmentados (feixes
 359 vasculares, parênquima aquífero e periderme) manualmente para análise de citometria de
 360 fluxo. Os histogramas representam os níveis de ploidia de cada tecido.

361 A porcentagem de núcleos em cada nível de ploidia também se mostrou distinta
362 (Tabela 3), cuja a maior parte dos núcleos da periderme (61,57 e 56,15% nos tempos 0 e
363 60 dias, respectivamente) era até 8C, no parênquima aquífero 53,47 e 56,24% dos núcleos
364 (nos tempos 0 e 60 dias, respectivamente) exibiam ploidia igual ou superior a 16C e tanto
365 os feixes vasculares (58,80 e 55,44%, respectivamente) quanto as raízes (75,35% em
366 ambos) a prevalência de ploidia era de apenas de dois conjuntos cromossômicos (2C).
367 Não houve diferenças significativas no conteúdo de DNA entre os tratamentos, tecidos e
368 níveis de ploidia.

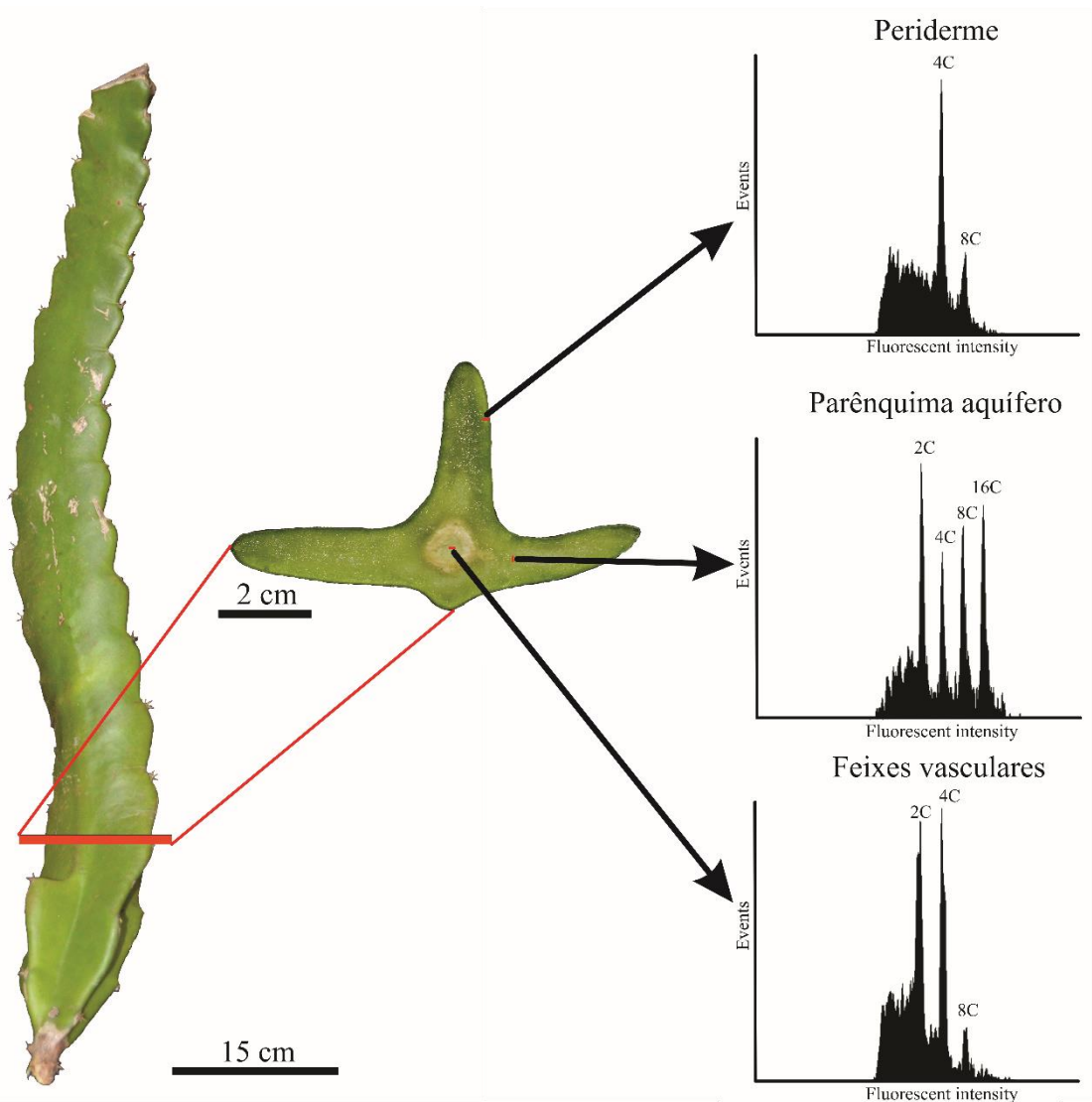
369

Tabela 3. Descrição da porcentagem de núcleos e conteúdo de DNA em cada nível de ploidia por tecido de plântulas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) oriundas de dois tempos de criopreservação de sementes após 240 dias de transplântio das mudas.

Tempo de criopreservação (dias)	Tecido	Variáveis	Ploidia						
			2C	4C	8C	16C	32C	64C	
0	PE	Conteúdo DNA (pg)	5,63±0,20	11,03±0,35	21,99±0,26	43,70±0,43	87,59±2,98	169,42±7,18	
		Núcleos (%)	22,14±0,77	18,94±6,62	20,49±8,40	13,16±3,17	19,27±13,50	6,00±3,41	
	PA	Conteúdo DNA (pg)	5,56±0,41	11,14±0,91	22,39±1,96	43,82±3,96	85,60±7,35	165,24±15,85	
		Núcleos (%)	21,36±6,04	15,49±2,38	9,67±1,93	19,87±9,85	28,18±7,00	5,42 ±4,17	
	FV	Conteúdo DNA (pg)	5,37±0,16	10,99±0,87	20,86±0,84	---	---	---	
		Núcleos (%)	58,80±5,11	33,64±4,33	6,75±1,53	---	---	---	
	RZ	Conteúdo DNA (pg)	5,99±0,22	11,95±0,51	---	---	---	---	
		Núcleos (%)	75,35±3,55	24,65±3,55	---	---	---	---	
	60	PE	Conteúdo DNA (pg)	5,73±0,22	11,24±0,49	22,42±1,11	44,85±2,13	87,93±4,53	170,00±8,34
			Núcleos (%)	25,85±12,53	19,64±9,14	10,66±2,72	12,89±4,30	26,57±17,54	5,85±3,09
PA		Conteúdo DNA (pg)	5,45±0,28	10,78±0,38	21,39±0,77	42,38±1,30	83,76±2,27	165,27±5,14	
		Núcleos (%)	20,98±7,38	14,08±4,81	9,53±1,13	24,89±5,66	28,02±8,23	3,33±2,76	
FV		Conteúdo DNA (pg)	5,73±0,35	11,27±0,67	22,20±1,65	---	---	---	
		Núcleos (%)	55,44±2,74	34,98±1,37	9,58±1,86	---	---	---	
RZ		Conteúdo DNA (pg)	6,20±0,16	12,42±0,33	---	---	---	---	
		Núcleos (%)	75,35±3,10	24,65±3,10	---	---	---	---	

PE = periderme, PA = parênquima aquífero, FV = feixes vasculares, RZ = raízes e pg = picograma.

370 As análises de citometria de fluxo dos tecidos dos cladódios de plantas adultas de
 371 pomares de produção revelaram, na maioria das amostras, a presença de dois picos de ploidia
 372 na periderme, quatro no parênquima aquífero e três nos feixes vasculares (Fig. 5). Uma amostra
 373 do parênquima aquífero e duas dos feixes vasculares apresentaram acréscimo de um pico de
 374 ploidia (32C e 16C, respectivamente), porém pouco representativos, sendo possivelmente
 375 núcleos em estágio G2.



376

377 **Fig. 5.** Diagrama representativo da segmentação de cladódios de plantas adultas de pomares de
 378 produção de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*). Cortes transversais na região basal
 379 foram realizados para amostragem dos tecidos do cladódio (feixes vasculares, parênquima
 380 aquífero e periderme) para análise de citometria de fluxo. Os histogramas representam os níveis
 381 de ploidia de cada tecido.

382 Os conteúdos de DNA nos dois picos de ploidia da periderme (10,61 e 22,47 pg)
 383 indicaram que esses núcleos, possivelmente, sejam tetraploides e octaploides (Tabela 4).
 384 Núcleos com quatro conjuntos cromossômicos (4C) eram mais representativos nesse tecido
 385 (70,49%). O parênquima aquífero apresentou ploidia até 16C e 53,14% dos núcleos exibiam
 386 ploidia igual ou superior a 8C (Tabela 4). Os feixes vasculares exibiram ploidia até 8C,
 387 47,90% dos núcleos eram diploides e 87,73% dos núcleos apresentavam ploidia até 4C (Tabela 4).

388 **Tabela 4.** Descrição da porcentagem de núcleos e conteúdo de DNA em cada nível de ploidia
 389 por tecido de plantas adultas de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) de pomares de
 390 produção.

Tecido	Variáveis	Ploidia				
		2C	4C	8C	16C	32C
PE	Conteúdo DNA (pg)	---	10,61 ± 1,23	22,47±2,03	---	---
	Núcleos (%)	---	70,49 ± 8,09	29,51±8,09	---	---
PA	conteúdo DNA (pg)	6,05±0,43	11,76 ± 0,71	23,55±1,19	46,40±2,42	89,43±0,00
	Núcleos (%)	26,07±3,11	20,78 ± 3,64	29,74±12,37	22,40±10,90	1,0±2,23
FV	Conteúdo DNA (pg)	6,33±1,18	12,57±2,26	24,38±4,83	46,78±12,81	---
	Núcleos (%)	47,90±9,56	39,83±4,97	10,77±2,58	1,50 ±2,34	---

391 PE = periderme, PA = parênquima aquífero, FV = feixes vasculares, RZ = raízes e pg =
 392 picograma.

393

394 **Discussão**

395 O aumento expressivo dos níveis de H₂O₂ (58,21%) em sementes criopreservadas por
 396 60 dias (Fig. 1a) revela um possível efeito estressor da criopreservação nas sementes de pitaya
 397 vermelha. Contudo, os níveis de danos oxidativos às membranas celulares (MDA) foram
 398 similares em ambos os tratamentos (Fig. 1b), possivelmente em decorrência dos aumentos nas
 399 atividades das enzimas antioxidantes (Fig. 1c, d, e), principalmente da SOD e APX. Isso sugere
 400 que a criopreservação de sementes não promoveu estresse oxidativo, mas possivelmente uma
 401 sinalização oxidativa. As espécies reativas de oxigênio (EROs) não têm um efeito
 402 exclusivamente prejudicial sobre a célula e seus componentes, essas moléculas são de
 403 fundamental importância na iniciação de diversos processos biológicos associados ao
 404 desenvolvimento das plantas e defesa contra estressores bióticos e abióticos (Czarnocka and
 405 Karpiński 2018; Mhamdi and Van Breusegem 2018).

406 A referida iniciação pode ser desencadeada por transduções de sinais que medeiam
 407 reações redox principalmente nos resíduos de cisteína de proteínas (Dumanović et al. 2021).
 408 Nas plantas, a exposição ao estresse é frequentemente acompanhada por diminuição do
 409 crescimento e parada do ciclo celular, e sinais redutivos e oxidativos são necessários para as
 410 transições dentro de fases do ciclo celular (De Simone et al. 2017). Essas progressões de fases
 411 são principalmente governadas por uma complexa maquinaria interativa de CYCs e CDKs, e
 412 tanto as atividades quanto os níveis de transcrição dessas proteínas são afetados por
 413 perturbações redox (Mhamdi & Van Breusegem 2018). As CYCs e CDKs exibem resíduos de
 414 cisteínas expostos, sendo portanto, potenciais alvos de regulação oxidativa pós-traducional
 415 (Foyer et al. 2018). A nível transcricional, fatores de transcrição (TF), como o SOG1, atuam
 416 como sensores de danos oxidativos ao DNA e modulam respostas no progresso do ciclo celular
 417 por meio da expressão de genes do ciclo celular vegetal (Mahapatra and Roy 2020, 2021).

418 A análise de crescimento revelou que todos os parâmetros biométricos das plântulas de
 419 pitaya oriundas da criopreservação de sementes por 60 dias foram significativamente superiores
 420 ($p < 0,05$) em comparação ao tratamento controle (Tabela 1). Os incrementos de massa fresca

421 ou massa seca variaram de 42,62 a 66,67% (Tabela 1). Esses resultados sugerem que a
422 criopreservação de sementes induziu estímulos para alteração do padrão de crescimento e
423 acúmulo de biomassa vegetal nas plântulas de pitaya, e isso pode estar relacionado às divisões
424 celulares e controle do ciclo celular vegetal. Notavelmente, é de amplo conhecimento que a
425 sinalização EROs pode induzir modificações na dinâmica e abundância de CYCs e CDKs nos
426 pontos de controle do ciclo celular alterando as taxas de proliferativas celulares (Qi and Zhang
427 2020). Espécies reativas como o ânion superóxido (O_2^-), por exemplo, induzem estímulos para
428 maior expressão de genes do ciclo celular (*CYCD3*) permitindo maior taxa proliferativa de
429 células (Lee et al. 2017).

430 A análise de citometria de fluxo revelou níveis de ploidia similares em ambos os
431 tratamentos, até 16C (Fig. 3). Curiosamente, as porcentagens de núcleos 2C, 4C e 8C dos
432 cladódios de cada tratamento se mostraram distintas (Tabela 2). A proporção de núcleos
433 octaploides (incluindo núcleos em estágio G2, 16C) em plântulas oriundas da criopreservação
434 de sementes (54,19%) foi superior em relação ao tratamento controle (35,76%). Isso traz
435 inferências de que as alterações do ciclo celular mediada pelos estímulos oxidativos talvez não
436 estejam relacionadas as taxas proliferativas celulares, mas sim a desvios no ciclo celular. A
437 endoreduplicação é um processo de desenvolvimento abrangente definido como uma
438 duplicação do genoma nuclear sem mitose que resulta na duplicação de cromossomos a cada
439 ciclo (Wos et al. 2022). Mediado por um desvio do ciclo celular, a endoreduplicação ocorre
440 pela supressão do complexo CDK/CYC na transição G2/M permitindo a entrada no endociclo
441 (Breuer et al. 2014; Wildermuth et al. 2017; Mahapatra and Roy 2020).

442 Os estímulos promotores de endoreduplicação podem ocorrer por meio de sinalização
443 ou estresse oxidativo (Barkla et al. 2018; Li et al. 2019; Hendrix et al. 2020). A interrupção de
444 cadeia transportadora de elétrons por ciprofloxacina, por exemplo, resultou numa sinalização
445 EROs retrógrada alterando o progresso do ciclo celular permitindo a entrada no endociclo.
446 SOG1 intermediou a sinalização oxidativa e o controle da expressão de genes do ciclo celular,
447 esse TF permitiu o aumento da expressão de *SMR5* e *SMR7*, inibidores de CDKs,
448 desencadeando respostas na transição G2/M promovendo a endoreduplicação (Duan et al.
449 2020). No presente estudo a criopreservação de sementes de pitaya vermelha por 60 dias
450 possivelmente induziu estímulos oxidativos para a indução da endoreduplicação.

451 O aumento dos níveis de ploidia, via endoreduplicação, está comumente associado a
452 uma maior tolerância a estresses ambientais (Scholes and Paige 2015; Lang and Schnittger
453 2020; Wos et al. 2022), muito embora esse processo de desenvolvimento também permita
454 incrementos significativos na biomassa vegetal em algumas espécies vegetais (Scholes et al.
455 2017; Liu et al. 2019; Tian et al. 2019; Wei et al. 2019), como observado no presente estudo
456 (Tabela 1). Essas mudanças no padrão de crescimento e tolerância ambiental podem ser
457 explicadas pelo aprimoramento da expressão gênica global resultando em mudanças nos
458 fenótipos no âmbito celular, metabólico, morfológico e genético (Scholes and Paige 2015; Paige
459 2018).

460 As duplicações sucessivas do genoma via endoreduplicação apresentam uma íntima
461 relação com o aumento do volume celular (Tsukaya 2019). Essa característica permite a
462 diferenciação de determinadas células vegetais (Wang et al. 2020). Células especializadas em
463 armazenamento, como endosperma e endocarpo, presenciam ciclos de endoreduplicação
464 (endociclo) o que lhes permitem maior volume celular para armazenamento de macromoléculas

465 (Chevalier et al. 2014; Nowicka et al. 2021). Neste estudo, os teores de amido, açúcares solúveis
466 totais, açúcares redutores, aminoácidos e proteínas dos cladódios não diferiram entre os
467 tratamentos (Fig. 2a-e), somente as médias de amido e açúcares solúveis totais das raízes foram
468 estatisticamente diferentes (Fig. 2a-b).

469 Ainda que os teores dessas macromoléculas sejam representativos, componentes da
470 massa seca total das plântulas como celulose, hemicelulose, fibras, pectinas e ligninas também
471 são de significativa relevância na constituição do corpo da planta. É digno de nota que o
472 aumento dos níveis de ploidia apresenta uma intrínseca relação com a constituição e
473 propriedades da parede celular (Bhosale et al. 2019). Em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado
474 que os teores de polissacarídeos da matriz da parede celular (hemicelulose e pectina)
475 correlacionaram positivamente com os níveis de ploidia (Corneillie et al. 2019). Logo, o
476 aumento da massa seca da pitaya pode estar relacionado, também, a outros componentes
477 celulares.

478 As taxas de incremento de massa fresca da parte aérea (46,57%) e massa seca do sistema
479 radicular (66,67%) evidenciaram que a criopreservação de sementes permitiu maior acúmulo
480 de água nos cladódios e biomassa vegetal (carbono) nas raízes. Os maiores teores de amido e
481 açúcares solúveis totais das raízes (Fig. 2a-b) podem ser resultantes de uma maior exportação
482 de açúcares da parte aérea, uma vez que plântulas oriundas da criopreservação de sementes (60
483 dias em NL) apresentaram maior área fotossintética (altura e número de brotações). Vale
484 ressaltar também, que ao contrário de tecidos de reservas como endosperma e endocarpo, cujo
485 armazenamento é majoritariamente de macromoléculas, a principal substância presente em
486 células de armazenamento em Cactaceae é a água (Hultine et al. 2019) e o incremento na massa
487 fresca da parte aérea é possivelmente resultante do maior acúmulo dessa substância em
488 detrimento dos ciclos de endoreduplicação.

489 As análises de citometria de fluxo do material induzido ao espessamento (240 dias)
490 revelaram diferentes níveis de ploidia (mixoploidia) em cada tecido constituinte do cladódio
491 (Tabela 3). A periderme e o parênquima aquífero exibiram ploidia até 64C (Fig. 4), isso
492 comprova que endociclo é parte integrante do crescimento e desenvolvimento vegetal da pitaya
493 vermelha e que suas sucessivas rodadas de duplicação do genoma variam de acordo com o
494 estágio de desenvolvimento da planta. Além disso, não foram observadas diferenças
495 significativas nas porcentagens de núcleos entre os tratamentos (Tabela 3), logo a
496 criopreservação de sementes de pitaya por 60 dias apenas adiantou uma rodada de
497 endoreduplicação nas plântulas jovens (até 120 dias) e o progresso do desenvolvimento vegetal
498 das plântulas permitiu a equiparação dos níveis de ploidia entre os tratamentos de
499 criopreservação (0 e 60 dias em NL).

500 De fato, a endoreduplicação é parte integrante do desenvolvimento de Cactacea (de
501 Menezes et al. 2012). Essa variante do ciclo celular permite a diferenciação dos tecidos
502 resultando na otimização das funções celulares e na adaptação a ambientes sazonais (Menezes
503 et al. 2016). Em cladódios de duas espécies de *Melocactus*, por exemplo, foram observados que
504 os maiores níveis de ploidia eram encontrados no parênquima aquífero (até 32C), cujas as
505 células exibiam quase três vezes o tamanho das células periféricas (periderme), como
506 consequência da endoreduplicação (Torres-Silva et al. 2020). De modo similar, no presente
507 estudo a maior parte dos núcleos do parênquima aquífero (53,47 e 56,24%) exibiam ploidia
508 igual ou superior a 16C, ao passo que entre 61,57 e 56,15% dos núcleos da periderme eram até

509 8C. O predomínio de núcleos com altos níveis de ploidia no parênquima aquífero é, portanto,
510 um traço de desenvolvimento pelo qual os endociclos promovem a diferenciação celular para
511 acumular água.

512 Os endociclos ocorrem predominantemente em células com grandes volumes e em
513 células com alta atividade metabólica, implicando que o aumento da ploidia eleva a expressão
514 gênica global e a produção macromolecular para atender às altas demandas de energia (Breuer
515 et al. 2014). Em células da periderme de Cactaceae isso pode ser uma característica interessante,
516 pois o predomínio de níveis intermediários de ploidia (até 8C, como observado neste estudo)
517 permitiria aumentos na atividade metabólica (fotossíntese) e na expansão celular para
518 armazenamento de água. Análises comparativas de plantas diploides, tetraploides naturais e
519 sintéticos de *Dianthus broteri* revelaram que os indivíduos poliploides apresentaram maiores
520 taxas de fotossíntese líquida (A_N), condutância estomática (g_m), taxa máxima de transporte de
521 elétrons (ETR_{max}) e eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), evidenciando que a duplicação
522 de conjuntos cromossômicos pode fornecer vantagens seletivas para o aumento da capacidade
523 fotossintética das plantas (Domínguez-Delgado et al. 2021).

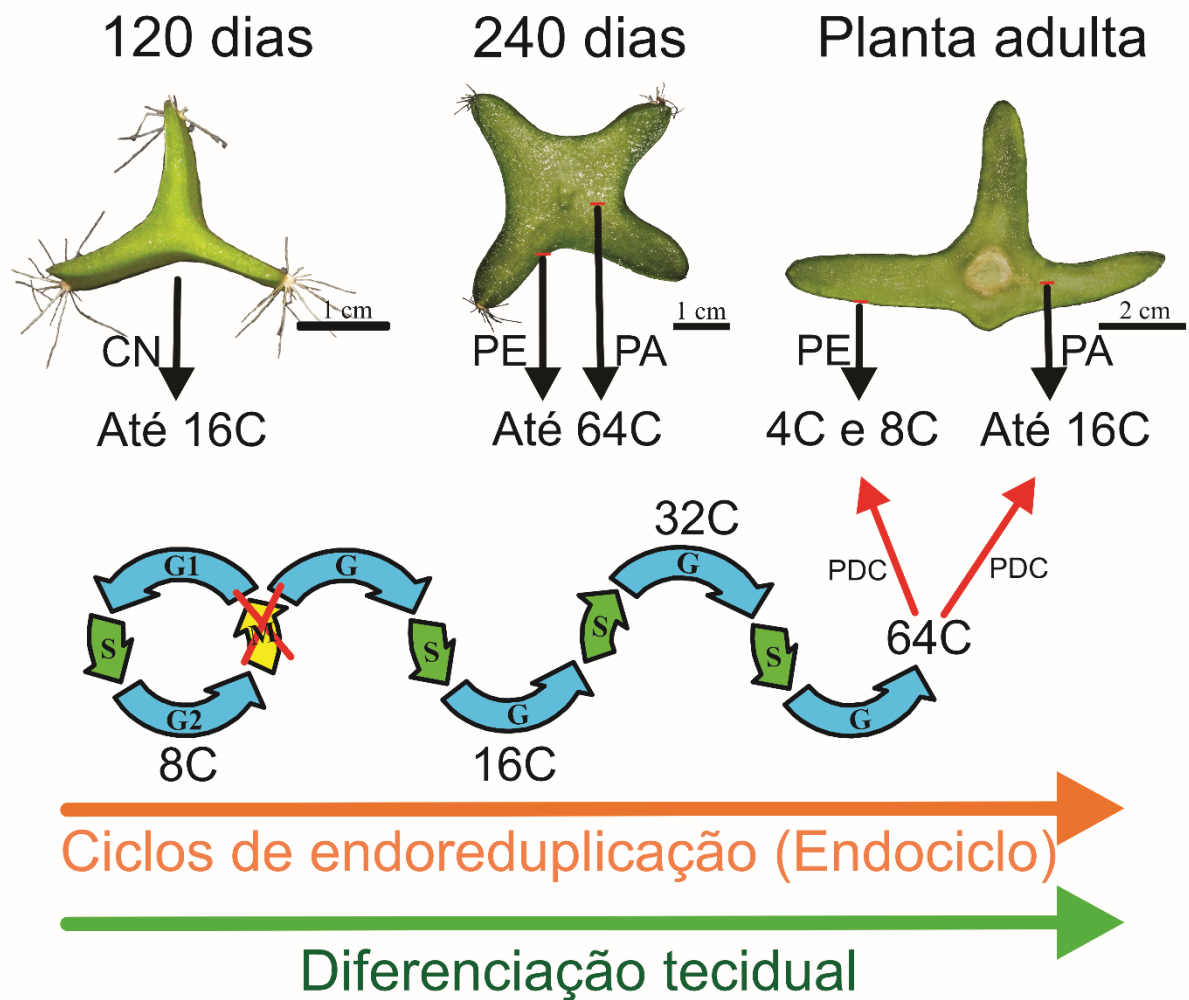
524 Os níveis de ploidia e conteúdo de DNA das raízes aos 120 dias (Tabela 2) e aos 240
525 dias (Tabela 3) foram similares. Isto é, não houve progresso dos níveis de ploidia (endociclo)
526 com o desenvolvimento das plantas. Por se tratar se de um tecido meristemático em constante
527 divisão celular, não é descartada a hipótese de que o pico 4C seja um estágio G2 de núcleos 2C.
528 Além disso, o cariótipo de espécies do gênero *Hylocereus* é predominantemente diploide
529 (Grimaldo-Juárez et al. 2001). A prevalência de células com menor conteúdo de DNA (2C),
530 como as observadas nas raízes dessa espécie, permite uma rápida replicação do genoma e
531 divisão celular (Scholes and Paige 2015). Isso pode se traduzir em uma vantagem considerável
532 para os cactos, pois permite a rápida recuperação e proliferação das raízes durante as estações
533 esporádicas com poucas chuvas que trazem vida a um ambiente natural árido (Torres-Silva et
534 al. 2020).

535 Os feixes vasculares compreendem um tecido altamente complexo, e como tal,
536 apresenta vários tipos celulares em sua composição, como elementos de vaso, fibras, elementos
537 de tubo crivado e células companheiras (Lucas et al. 2013; Cho et al. 2017). Esses tipos
538 celulares compartilham algumas características em comum, como células de pequeno diâmetro
539 com alto grau de espessamento da parede celular secundária, isso contribui para uma maior
540 eficiência no transporte de substâncias a longas distâncias e também para um maior suporte
541 mecânico das plantas (Lucas et al. 2013; Kamon and Ohtani 2021).

542 No presente estudo, os feixes vasculares apresentaram prevalência de núcleos 2C (58,80
543 e 55,44%) (Tabela 3). A manutenção de baixos níveis de ploidia nos feixes vasculares é uma
544 característica favorável para a condução de soluções aquosas, pois não compromete a razão
545 superfície/volume das células condutoras, uma vez que o aumento do volume celular e
546 modificações na parede celular estão frequentemente associados com aumentos dos níveis de
547 ploidia (Bhosale et al. 2018, 2019). Além disso, componentes de enrijecimento da parede
548 celular secundária (celulose e lignina) são mais prevalentes em células com menores níveis de
549 ploidia (Corneillie et al. 2019) e aumentos significativos dos níveis de ploidia poderiam
550 comprometer as estruturas biomecânicas de sustentação das plantas.

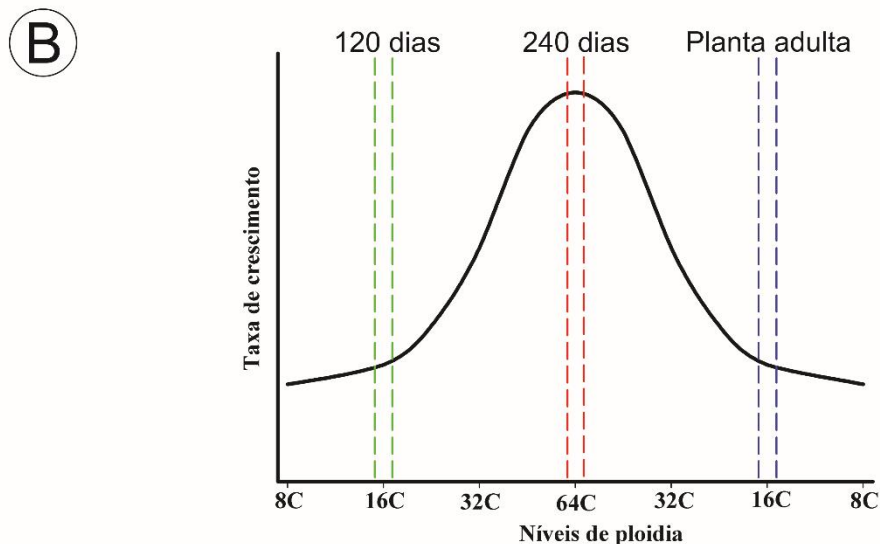
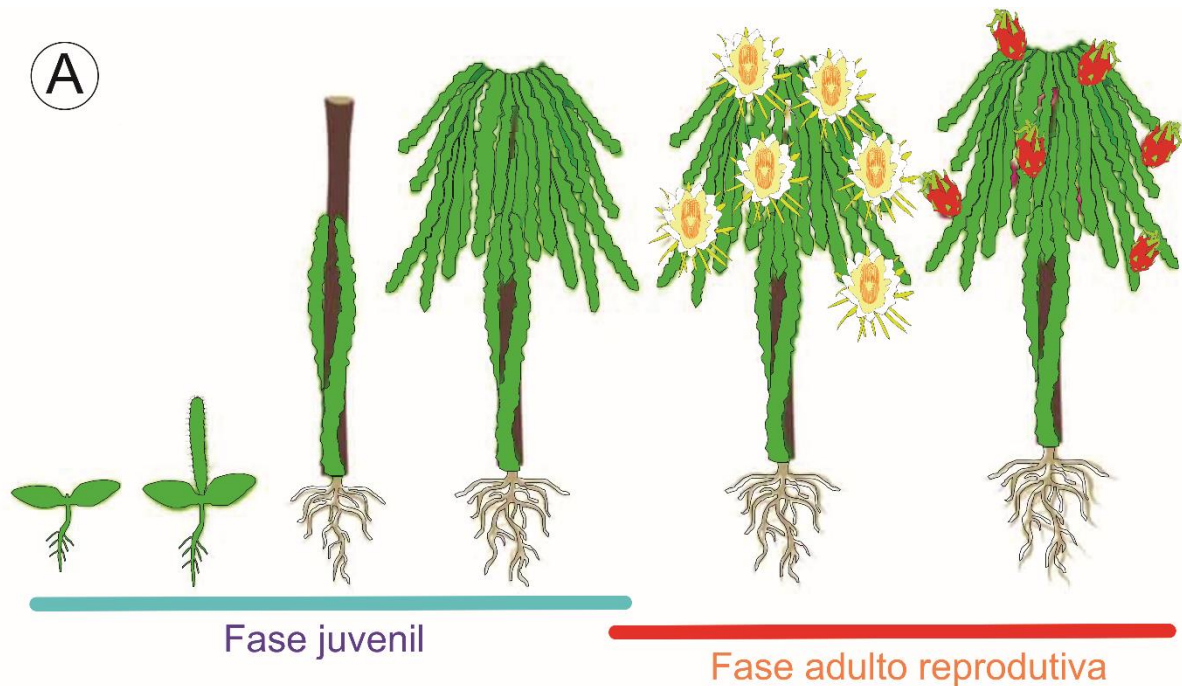
551 Curiosamente, os níveis de ploidia dos tecidos dos cladódios de plantas adultas de
552 pomares de produção apresentaram estabilização ou até mesmo redução dos níveis de ploidia
553 dos tecidos (Fig. 5). Na periderme foi observada apenas dois níveis de ploidia (4C e 8C), já no
554 parênquima aquífero os núcleos exibiam ploidia até 16C com uma maior prevalência de núcleos
555 8C e 16C (Tabela 4), valores estes distintos da amostragem anterior, cujos núcleos eram em sua
556 maioria iguais ou superiores a 16C (Tabela 3). Os feixes vasculares apresentaram diminuição
557 dos níveis de núcleos 2C e aumento de núcleos 4C (Tabelas 3,4), contudo, em ambas as
558 amostragens os percentuais de núcleos até 4C eram similares (90,42 e 92,44% aos 240 dias e
559 87,73% em plantas adultas). Em *Arabidopsis thaliana*, células do xilema apresentam uma maior
560 prevalência de núcleos 4C e prevê-se que a endoreduplicação e o espessamento da parede
561 celular secundária ocorram mais precocemente, resultando em uma diminuição do crescimento
562 radial celular. Isso sugere uma peculiar ligação funcional entre a endoreduplicação e a
563 arquitetura da parede celular nos tecidos vasculares (Bhosale et al. 2018).

564 Muito embora a redução dos níveis de ploidia e diploidização sejam eventos muito bem
565 descritos na história evolutiva das plantas (Mandáková and Lysak 2018; Qiao et al. 2019), esses
566 processos ocorrem ao longo de uma considerável escala evolutiva, na ordem de milhares ou até
567 milhões de anos (Viciant and Casacuberta 2017). Uma provável hipótese para esses eventos em
568 uma curta escala de tempo estaria envolvida não na redução do nível de ploidia das células em
569 si, mas sim em mudanças de ploidia a nível tecidual. Possivelmente células 4C e 8C da
570 periderme apresentaram maiores taxas proliferativas aumentando suas proporções no tecido, já
571 as demais células (2C, 16C, 32C e 64C) permaneceram em fases estacionárias no ciclo celular
572 (G0) ou foram induzidas a morte celular programada (PDC) (Fig. 6). Esse mesmo raciocínio
573 também pode ser aplicado às células do parênquima aquífero, aumentando a frequência de
574 células 8C e 16C na fase adulta reprodutiva.



575
 576 **Fig. 6.** Modelo esquemático da relação entre os níveis de ploidia e diferenciação tecidual dos
 577 tecidos constituintes do cladódio de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) em função dos
 578 estágios de desenvolvimento das plantas e ciclos de endoreduplicação (A). CN=Cladódio não
 579 diferenciado; PA=Parênquima aquífero; PE=periderme; PCD= morte celular programada.

580 Incrementos de massa fresca em algumas espécies estão comumente associados aos
 581 ciclos de endoreduplicação (Liu et al. 2019; Tian et al. 2019; Wei et al. 2019). No presente
 582 estudo, os aumentos dos níveis de ploidia dos cladódios (periderme e parênquima aquífero) nas
 583 fases juvenis (120 e 240 dias) podem ter contribuído para a diferenciação tecidual (Fig. 6) e
 584 crescimento vegetativo das plantas nessas fases de desenvolvimento (Fig. 7a, b). Notavelmente,
 585 plantas quando atingem a fase adulta reprodutiva diminuem suas taxas de crescimento
 586 vegetativo (Kim et al. 2021). Ao adentrar nessa fase fenológica, a redução dos níveis de ploidia
 587 dos cladódios da pitaya vermelha possivelmente permitiu redução das taxas de crescimento
 588 vegetativo (Fig. 7a, b). Isso evidencia um alto grau de dinamismo do endociclo durante as fases
 589 de desenvolvimento da pitaya vermelha, sugerindo uma intrínseca relação entre o aumento dos
 590 níveis de ploidia com o aumento da biomassa das plantas, principalmente nas fases juvenis onde
 591 o crescimento vegetativo é um traço característico de desenvolvimento.



592

593 **Fig. 7.** Representação esquemática das fases de desenvolvimento da pitaya vermelha
 594 (*Hylocereus costaricensis*) (A). Gráfico representativo da hipótese proposta de variação dos
 595 níveis de ploidia dos tecidos constituintes do cladódio com as taxas de crescimento vegetativo
 596 das plantas ao longo das fases de desenvolvimento (B).

597

598

599

600

601

602

603

Esses resultados revelam que o endociclo em pitaya vermelha é um processo altamente dinâmico que modula todas as fases de desenvolvimento das plantas. Esse mecanismo também é responsivo a estímulos oxidativos, o que permite a obtenção de uma complexa rede de interações de componentes ambientais, moleculares e ontogenéticos na diferenciação tecidual ao longo do desenvolvimento das plantas numa perspectiva espaço-temporal. Essas múltiplas interações elencam o endociclo como um regulador mestre no crescimento, desenvolvimento e possivelmente nas respostas generalizadas ao estresse ambiental em plantas de pitaya vermelha.

604

Conclusão

605 Aqui, relatamos que estímulos oxidativos, oriundos da criopreservação de sementes em
 606 NL por 60 dias, possivelmente induziram a endoreduplicação aumentando a proporção de
 607 núcleos octaploides em cladódios de pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*). Os aumentos
 608 dos níveis de ploidia estariam atrelados aos incrementos de biomassa vegetal. A progressão das
 609 rodadas de endoreduplicação (endociclo) permitiu a diferenciação tecidual (periderme,
 610 parênquima aquífero e feixes vasculares), dando maior especificidade às funções celulares.
 611 Elencamos evidências de que a variação dos níveis de ploidia não ocorre apenas a nível tecidual,
 612 mas também a nível temporal com o progresso do desenvolvimento das plantas em cada tecido.
 613 Nas fases juvenis (até 240 dias de cultivo), os aumentos dos níveis de ploidia nos cladódios (até
 614 64C) permitiram maiores taxas de crescimento vegetativo, enquanto na fase adulta reprodutiva
 615 a diminuição dos níveis de ploidia (até 16C) é acompanhada possivelmente por reduções das
 616 taxas de crescimento vegetativo. Esses resultados sugerem que o endociclo seja um mecanismo
 617 altamente dinâmico que modula os níveis de ploidia para diferenciação tecidual e regulação das
 618 taxas de crescimento numa perspectiva espaço-temporal ao longo do desenvolvimento das
 619 plantas de pitaya.

620 **Referências bibliográficas**

- 621 Banerjee G, Singh D, Sinha AK (2020) Plant cell cycle regulators: Mitogen-activated protein
 622 kinase, a new regulating switch? *Plant Sci* 301:110660.
 623 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110660>
- 624 Barkla BJ, Rhodes T, Tran KNT, et al (2018) Making epidermal bladder cells bigger:
 625 Developmental-and salinity-induced endopolyploidy in a model halophyte. *Plant Physiol*
 626 177:615–632. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00033>
- 627 Bauer MJ, Birchler JA (2006) Organization of endoreduplicated chromosomes in the
 628 endosperm of *Zea mays* L. *Chromosoma* 115:383–394. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0068-2>
- 630 Bhosale R, Boudolf V, Cuevas F, et al (2018) A spatiotemporal dna endoploidy map of the
 631 arabidopsis root reveals roles for the endocycle in root development and stress adaptation.
 632 *Plant Cell* 30:2330–2351. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00983>
- 633 Bhosale R, Maere S, De Veylder L (2019) Endoreplication as a potential driver of cell wall
 634 modifications. *Curr Opin Plant Biol* 51:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.04.003>
- 635 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities
 636 of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- 637 Breuer C, Braidwood L, Sugimoto K (2014) Endocycling in the path of plant development.
 638 *Curr Opin Plant Biol* 17:78–85. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.007>
- 639 Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. In: ACADEMIC P (ed) *Methods in*
 640 *enzymology*, 1978th, 52nd edn. pp 302–310
- 641 Carneiro AK, Montessoro P da F, Fusaro AF, et al (2021) Plant cdks—driving the cell cycle
 642 through climate change. *Plants* 10:. <https://doi.org/10.3390/plants10091804>
- 643 Chevalier C, Bourdon M, Pirrello J, et al (2014) Endoreduplication and fruit growth in tomato:
 644 Evidence in favour of the karyoplasmic ratio theory. *J Exp Bot* 65:2731–2746.
 645 <https://doi.org/10.1093/jxb/ert366>
- 646 Cho H, Dang TVT, Hwang I (2017) Emergence of plant vascular system: roles of hormonal

- 647 and non-hormonal regulatory networks. *Curr Opin Plant Biol* 35:91–97.
648 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.013>
- 649 Corneillie S, De Storme N, Van Acker R, et al (2019) Polyploidy affects plant growth and alters
650 cell wall composition. *Plant Physiol* 179:74–87. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00967>
- 651 Czarnocka W, Karpiński S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production,
652 scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic Biol Med*
653 122:4–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011>
- 654 de Menezes TP, Gomes W de A, Pio LAS, et al (2012) Micropropagação e endoreduplicação
655 em pitaya vermelha, *hylocereus undatus haw.* *Biosci J* 28:868–876
- 656 De Simone A, Hubbard R, De La Torre NV, et al (2017) Redox Changes during the Cell Cycle
657 in the Embryonic Root Meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants Redox Signal*
658 27:1505–1519. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6959>
- 659 Del Prete S, Molitor A, Charif D, et al (2019) Extensive nuclear reprogramming and
660 endoreduplication in mature leaf during floral induction. *BMC Plant Biol* 19:1–19.
661 <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1738-6>
- 662 Dische Z (1962) Methods in carbohydrates chemistry. In: R. WHISTLER MW (Ed.). (ed)
663 *Methods in carbohydrates chemistry*, 1962nd, 2. edn. New York, pp 478– 512
- 664 Doležel J, Bartoš J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size.
665 *Ann Bot* 95:99–110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- 666 Domínguez-Delgado JJ, López-Jurado J, Mateos-Naranjo E, Balao F (2021) Phenotypic
667 diploidization in plant functional traits uncovered by synthetic neopolyploids in *Dianthus*
668 *broteri*. *J Exp Bot* 72:5522–5533. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab179>
- 669 Duan S, Hu L, Dong B, et al (2020) Signaling from Plastid Genome Stability Modulates
670 Endoreplication and Cell Cycle during Plant Development. *Cell Rep* 32:108019.
671 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108019>
- 672 Dumanović J, Nepovimova E, Natić M, et al (2021) The Significance of Reactive Oxygen
673 Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Front Plant Sci*
674 11:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>
- 675 Farinati S, Forestan C, Canton M, et al (2021) Regulation of fruit growth in a peach slow
676 ripening phenotype. *Genes (Basel)* 12:. <https://doi.org/10.3390/genes12040482>
- 677 Ferreira D (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência*
678 *e Agrotecnologia* 32:109–112
- 679 Foyer CH, Wilson MH, Wright MH (2018) Redox regulation of cell proliferation:
680 Bioinformatics and redox proteomics approaches to identify redox-sensitive cell cycle
681 regulators. *Free Radic Biol Med* 122:137–149.
682 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.047>
- 683 Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiol* 59:315–318.
684 [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60843-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60843-0)
- 685 Grimaldo-Juárez O, García-Velázquez A, Ortiz-Cereceres J, Ruiz-Posadas LM (2001)
686 Características cariotípicas de seis genótipos de pitahaya (*Hylocereus* spp). *Rev Chapingo*
687 *Ser Hortic VII*:177–186. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2000.08.056>

- 688 Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and Developmental Characterization of Multiple
689 Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiol* 84:450–455.
690 <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- 691 Hendrix S, Iven V, Eekhout T, et al (2020) Suppressor of Gamma Response 1 Modulates the
692 DNA Damage Response and Oxidative Stress Response in Leaves of Cadmium-Exposed
693 *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 11:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00366>
- 694 Hendrix S, Keunen E, Mertens AIG, et al (2018) Cell cycle regulation in different leaves of
695 *Arabidopsis thaliana* plants grown under control and cadmium-exposed conditions.
696 *Environ Exp Bot* 155:441–452. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.06.026>
- 697 Hultine KR, Dettman DL, English NB, Williams DG (2019) Giant cacti: Isotopic recorders of
698 climate variation in warm deserts of the Americas. *J Exp Bot* 70:6509–6519.
699 <https://doi.org/10.1093/jxb/erz320>
- 700 Kamon E, Ohtani M (2021) Xylem vessel cell differentiation: A best model for new integrative
701 cell biology? *Curr Opin Plant Biol* 64:102135. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102135>
- 702 Kendall PA (1963) Use of the ninhydrin reaction for quantitative estimation of amino groups
703 in insoluble specimens. *Nature* 197:1305–1306
- 704 Kim YS, Park CS, Lee DY, et al (2021) Phenological growth stages of Korean ginseng (*Panax*
705 *ginseng*) according to the extended BBCH scale. *J Ginseng Res* 45:527–534.
706 <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2020.12.006>
- 707 Lang L, Schnittger A (2020) Endoreplication — a means to an end in cell growth and stress
708 response. *Curr Opin Plant Biol* 54:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.006>
- 709 Lee DJ, Choi HJ, Moon ME, et al (2017) Superoxide serves as a putative signal molecule for
710 plant cell division: overexpression of CaRLK1 promotes the plant cell cycle via
711 accumulation of O₂⁻ and decrease in H₂O₂. *Physiol Plant* 159:228–243.
712 <https://doi.org/10.1111/ppl.12487>
- 713 Li F, Wang L, Zhang Z, et al (2019) ZmSMR4, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI)
714 gene in maize (*Zea mays* L.), functions as a key player in plant growth, development and
715 tolerance to abiotic stress. *Plant Sci* 280:120–131.
716 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.007>
- 717 Liu Z, Chen G, Gao F, et al (2019) Transcriptional repression of the APC/C activator genes
718 *ccs52a1/a2* by the mediator complex subunit MED16 controls endoreduplication and cell
719 growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 31:1899–1912. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00811>
- 720 Lopes C, Dias G, Silveira F, et al (2017) Propagação in vitro de pitaia vermelha. *Plant Cell Cult*
721 *Micropropag* 13:21–27
- 722 Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant
723 DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Ann Bot* 100:875–888.
724 <https://doi.org/10.1093/aob/mcm152>
- 725 Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, et al (2013) The Plant Vascular System: Evolution,
726 Development and Functions. *J Integr Plant Biol* 55:294–388.
727 <https://doi.org/10.1111/jipb.12041>
- 728 Mahapatra K, Roy S (2021) SOG1 transcription factor promotes the onset of endoreduplication
729 under salinity stress in *Arabidopsis*. *Sci Rep* 11:1–26. <https://doi.org/10.1038/s41598-021->

- 730 91293-1
- 731 Mahapatra K, Roy S (2020) An insight into the mechanism of DNA damage response in plants-
732 role of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1: An overview. *Mutat Res - Fundam*
733 *Mol Mech Mutagen* 819–820:111689. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111689>
- 734 Mandáková T, Lysak MA (2018) Post-polyploid diploidization and diversification through
735 dysploid changes. *Curr Opin Plant Biol* 42:55–65.
736 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.001>
- 737 Matsuda M, Iwata Y, Koizumi N, Mishiba K ichiro (2018) DNA double-strand breaks promote
738 endoreduplication in radish cotyledon. *Plant Cell Rep* 37:913–921.
739 <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2278-5>
- 740 Menezes TP, Pio LAS, Ramos JD, et al (2016) Endoreduplication in floral structure, vegetative
741 and fruits of red pitaya with white pulp. *Biosci J* 931–939. [https://doi.org/10.14393/bj-](https://doi.org/10.14393/bj-v32n4a2016-32977)
742 [v32n4a2016-32977](https://doi.org/10.14393/bj-v32n4a2016-32977)
- 743 Mhamdi A, Van Breusegem F (2018) Reactive oxygen species in plant development. *Dev* 145:.
744 <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- 745 Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal*
746 *Chem* 31:426–428
- 747 Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase
748 in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880
- 749 Nowicka A, Kovacik M, Tokarz B, et al (2021) Dynamics of endoreduplication in developing
750 barley seeds. *J Exp Bot* 72:268–282. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa453>
- 751 Paige KN (2018) Overcompensation, environmental stress, and the role of endoreduplication.
752 *Am J Bot* 105:1105–1108. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1135>
- 753 Qi F, Zhang F (2020) Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress. *Front Plant Sci*
754 10:1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01765>
- 755 Qiao X, Li Q, Yin H, et al (2019) Gene duplication and evolution in recurring polyploidization-
756 diploidization cycles in plants. *Genome Biol* 20:1–23. [https://doi.org/10.1186/s13059-](https://doi.org/10.1186/s13059-019-1650-2)
757 [019-1650-2](https://doi.org/10.1186/s13059-019-1650-2)
- 758 Rangan P (2020) Endosperm variability: From endoreduplication within a seed to higher ploidy
759 across species, and its competence. *Seed Sci Res* 30:173–185.
760 <https://doi.org/10.1017/S0960258520000148>
- 761 Scholes DR, Paige KN (2015) Plasticity in ploidy: A generalized response to stress. *Trends*
762 *Plant Sci* 20:165–175. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.007>
- 763 Scholes DR, Rasnick EN, Paige KN (2017) Characterization of *Arabidopsis thaliana* regrowth
764 patterns suggests a trade-off between undamaged fitness and damage tolerance. *Oecologia*
765 184:643–652. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3897-1>
- 766 Tian Y, Gu H, Fan Z, et al (2019) Role of a cotton endoreduplication-related gene, GaTOP6B,
767 in response to drought stress. *Planta* 249:1119–1132. [https://doi.org/10.1007/s00425-018-](https://doi.org/10.1007/s00425-018-3067-7)
768 [3067-7](https://doi.org/10.1007/s00425-018-3067-7)
- 769 Torres-Silva G, Matos EM, Correia LF, et al (2020) Anatomy, Flow Cytometry, and X-Ray
770 Tomography Reveal Tissue Organization and Ploidy Distribution in Long-Term In Vitro

- 771 Cultures of *Melocactus* Species. Front Plant Sci 11:1–13.
772 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01314>
- 773 Tsukaya H (2019) Has the impact of endoreduplication on cell size been overestimated? New
774 Phytol 223:11–15. <https://doi.org/10.1111/nph.15781>
- 775 Velappan Y, Signorelli S, Considine MJ (2017) Cell cycle arrest in plants: What distinguishes
776 quiescence, dormancy and differentiated G1? Ann Bot 120:495–509.
777 <https://doi.org/10.1093/aob/mcx082>
- 778 Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in
779 acid rain-treated bean plants. Plant Sci 151:59–66
- 780 Vicient CM, Casacuberta JM (2017) Impact of transposable elements on polyploid plant
781 genomes. Ann Bot 120:195–207. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx078>
- 782 Wang K, Ndathe RW, Kumar N, et al (2020) The CDK Inhibitor SIAMESE Targets Both
783 CDKA;1 and CDKB1 Complexes to Establish Endoreplication in Trichomes1[OPEN].
784 Plant Physiol 184:165–175. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00271>
- 785 Wei Z, Shi X, Wei F, et al (2019) The cotton endocycle-involved protein SPO11-3 functions in
786 salt stress via integrating leaf stomatal response, ROS scavenging and root growth. Physiol
787 Plant 167:127–141. <https://doi.org/10.1111/ppl.12875>
- 788 Wildermuth MC, Steinwand MA, McRae AG, et al (2017) Adapted Biotroph Manipulation of
789 Plant Cell Ploidy. Annu Rev Phytopathol 55:537–564. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035458>
- 791 Wos G, Macková L, Kubíková K, Kolář F (2022) Ploidy and local environment drive
792 intraspecific variation in endoreduplication in *Arabidopsis arenosa*. Am J Bot 109:259–
793 271. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1818>
- 794
795
796