

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE VARIEDADES
SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO**

HÉLDER LIMA CARVALHO

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JUNHO – 2014**

MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE VARIEDADES
SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO

HÉLDER LIMA CARVALHO

Bioquímico

Universidade Federal de Viçosa – 2007

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADORA: Dr^a FERNANDA VIDIGAL DUARTE SOUZA

COORIENTADORA: Dr^a MARIA ANGÉLICA PEREIRA DE CARVALHO COSTA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS, BA, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Hélder Lima.

Micropropagação e criopreservação de variedades silvestres de abacaxizeiro / Hélder Lima Carvalho.– Cruz das Almas, 2014.

75 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr^a Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Coorientador: Prof^a Dr^a Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2014.

1. Cultura de tecidos. 2. Abacaxi. 3. Banco de germoplasma. I. Souza, Fernanda Vidigal Duarte. II. Costa, Maria Angélica Pereira de Carvalho. III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. V. Título.

CDD: 571.538 – 21. ed.

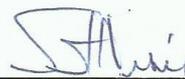
CDU: 636.085

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
HÉLDER LIMA CARVALHO



Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)



Prof. Dr. José Geraldo de Aquino Assis
Universidade Federal da Bahia - UFBA



Prafa. Dra. Claudinéia Regina Pelacani Cruz
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos
Vegetais em

AGRADECIMENTOS

A todos os meus ancestrais e protetores espirituais, por terem cuidado de mim e intercedido por mim nos momentos difíceis. Vocês já deram prova de suas forças e serão igualmente correspondidos quando chegar o momento.

A minha mãe, por ter me deixado morar em sua barriga por nove meses, e como se não bastasse, ter me ninado, alimentado, nutrido, acalentado, abraçado, beijado, amado, protegido, segurado nos braços, colocado para dormir, levado ao médico, me recuperado de doenças, me recuperado de tristezas, me dado a melhor educação que estava a seu alcance e por ter feito isso de forma incondicional e ininterrupta pelos últimos 27 anos e 3 meses, 24 horas por dia, 7 dias por semana, sem nunca ter dado qualquer sinal de cansaço.

A meu pai, por ter feito tudo que estava a seu alcance para me cuidar, educar e sustentar e por todos os cuidados e conselhos nos anos em que moramos juntos.

A minha irmã por ser uma amiga tão importante! Te amo!

A minha avó por todos os momentos que vivemos juntos! Te amo pra sempre!

A Renatêna por ser tão lendenha!

A minha orientadora, Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza, pelo aconselhamento vigilante em todas as etapas do trabalho, por toda a ajuda, por todas as correções, reuniões, ensinamentos e por ter me ajudado em um dos momentos mais difíceis da vida.

A Dr. Everton Hilo, por toda a ajuda imprescindível, sem a qual não seria possível a conclusão deste trabalho! Tenho grande consideração por você! Pode contar comigo no que for necessário! Espero que sejamos amigos até o fim!

A Cata e a João Batista, colegas de Embrapa, por terem sido sempre tão prestativos nas coletas.

A Dr^a. Maria Agélica, por ter coorientado este trabalho e pelos ensinamentos nas disciplinas da Pós.

Aos pesquisadores da Embrapa, em especial Dr^a. Tatiana Junghans, Dr^a Janay Almeida, Dr. Antônio Souza, por serem sempre tão excelentes cientistas e exemplos profissionais; a Dr. Carlos Ledo, verdadeiro alquimista da Estatística,

por ter sido meu professor na Pós e especialmente porque sem ele diversas análises do trabalho seriam muito difíceis; a Dr^a. Cláudia Fortes e Dr. Sebastião por serem professores tão marcantes e importantes na Pós. Qualidade de ensino é com vocês!

A todos os colegas da Embrapa e do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelo companheirismo, em especial Tânia Conceição, Fabiana Aud e todos os estagiários.

A todos os autores citados, por terem gerado subsídios para a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma pela elaboração desta dissertação e para a minha formação acadêmica.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, por ter permitido o ajuste de horários para que eu pudesse cursar Mestrado.

A todos que foram esquecidos.

Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Página

RESUMO
ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL.....1

Capítulo 1

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE VARIEDADES
SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO.....22

Capítulo 2

CRIOPRESERVAÇÃO DE ACESSOS SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO.....53

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....71

ANEXOS.....72

MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE VARIEDADES SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO

Hélder Lima Carvalho

Orientadora: Dr^a Fernanda Vidigal Duarte Souza

Coorientadora: Dr^a Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO

O abacaxizeiro é o representante mais importante da família Bromeliaceae, que conta com aproximadamente 58 gêneros e 3352 espécies. O Brasil é um dos maiores produtores de abacaxi do mundo. A cultura de tecidos revelou-se uma estratégia apropriada para a produção em larga escala de mudas de abacaxizeiro e de diversas outras espécies, mas a maioria dos estudos existentes concentram-se em cultivares de *A. comosus* var. *comosus*, ignorando o grande potencial residente em acessos silvestres para utilização ornamental, produção de fibras e fitoterápicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a morfogênese e o potencial propagativo de diferentes variedades botânicas de abacaxizeiro no seu estabelecimento e micropropagação *in vitro* e a possibilidade de se utilizar a criopreservação como estratégia de conservação deste valioso germoplasma. Caules e coroas de plantas de *A. macrodontes* e *A. comosus* com suas diversas variedades botânicas foram utilizados como material de partida para o estabelecimento *in vitro*. Foi acompanhada a multiplicação *in vitro* de diversas variedades botânicas de *A. comosus*. A criopreservação foi realizada com *A. comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *erectifolius*. Obteve-se a confirmação de que existe diferença de aptidão morfogênética entre diferentes seções do caule do abacaxizeiro, de modo independente da variedade botânica. *A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *ananassoides* demonstraram melhor aptidão morfogênética que os demais materiais estudados, demonstrando que o protocolo utilizado foi bastante satisfatório para essas variedades. A criopreservação proporcionou regeneração média de cerca de 50 % para os acessos estudados, criando a perspectiva de criação de um criobanco como duplicata de conservação de germoplasma de abacaxizeiro a longo prazo.

Palavras chave: acessos silvestres; banco de germoplasma; cultura de tecidos; conservação *in vitro*.

MICROPROPAGATION AND CRYOPRESERVATION OF WILD VARIETIES OF PINEAPPLE

Hélder Lima Carvalho

Advisor: Dr^a Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-Advisor: Dr^a Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

ABSTRACT

The pineapple is the most important representative of the Bromeliaceae family, which includes approximately 58 genera and 3352 species. Brazil is one of the major producers of pineapples in the world. Tissue culture has proven to be an appropriate strategy for large-scale production of pineapple plants and several other species, but most studies focus on cultivars of *A. comosus* var. *comosus*, ignoring the great potential resident in wild accessions for ornamental use, fiber production and herbal medicine. This study aimed to evaluate the morphogenesis and propagation potential of different botanical varieties of pineapple in its establishment and *in vitro* micropropagation and the possibility of using cryopreservation as a strategy for conservation of this valuable germplasm. Crowns and stems of plants of *A. comosus* and *A. macrodontes* with its various botanical varieties were used as the starting material for the *in vitro* establishment. *In vitro* multiplication of several botanical varieties of *A. comosus* was followed. Cryopreservation was performed with *A. comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *bracteatus* and *A. comosus* var. *erectifolius*. We obtained confirmation that there is difference in morphogenetic fitness between different sections of the stem of pineapple, independently of the botanical variety. *A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *bracteatus* and *A. comosus* var. *ananassoides* showed better morphogenetic fitness than the other materials studied, demonstrating that the protocol used was quite satisfactory for these varieties. Cryopreservation provided a medium regeneration of about 50 % for the accessions, creating the prospect of developing a criobank as duplicate of pineapple germplasm conservation for long term.

Keywords: germplasm bank; wild accessions; tissue culture; *in vitro* conservation.

INTRODUÇÃO

A Cultura do Abacaxi

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] está entre as frutas tropicais mais consumidas no mundo e seu cultivo tem gerado emprego e renda (ARAÚJO et al., 2008; DANSO et al., 2008). Segundo dados da FAO (2014), o Brasil foi o terceiro maior produtor de abacaxi em 2012, tendo produzido 2,478 milhões de toneladas, ficando a Tailândia em primeiro (2,650 milhões), Costa Rica em segundo (2,484 milhões) e Filipinas em quarto (2,397 milhões).

Além do uso para alimentação, outras variedades de *A. comosus* têm sido usadas como plantas ornamentais (SOUZA et al., 2009; 2012), para extração de fibras (OLIVEIRA et al., 2008; LEÃO et al., 2009) e fitoterápicos (SUN et al., 2002). Em anos recentes, o abacaxizeiro tem sido estudado como fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis (HOSSAIN et al., 2008) e de enzimas de interesse industrial, como a bromelina (ABÍLIO et al., 2009).

O abacaxizeiro é o representante mais importante da família *Bromeliaceae*, que conta com aproximadamente 58 gêneros e 3352 espécies (LUTHER, 2012) e tem seu provável centro de origem na Amazônia, região em que se encontra o maior número de materiais silvestres ou cultivados (BAKER; COLLINS, 1939; FERREIRA; CABRAL, 1993; SOUZA et al., 2012).

De acordo com d'Eeckembrugge e Leal (2003), o gênero *Ananas* compreende duas espécies: *Ananas comosus* e *Ananas macrodontes*. A espécie *A. comosus*, por sua vez, inclui cinco variedades botânicas: *Ananas comosus* var. *ananassoides*, *Ananas comosus* var. *bracteatus*, *Ananas comosus* var. *comosus*,

Ananas comosus var. *erectifolius* e *Ananas comosus* var. *parguazensis*. O abacaxi comestível é da variedade *comosus*, enquanto que o *A. comosus* var. *erectifolius* tem aplicação na produção de fibras e como ornamental, enquanto *A. comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *parguazensis* possuem potencial ornamental e têm sido usados em programas de melhoramento genético para essa finalidade (SOUZA et al., 2012).

O abacaxizeiro pode ser propagado sexuadamente por meio de sementes e assexuadamente através de mudas, utilizando-se coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão, obtidas por seccionamento do caule, quebra da dominância apical, tratamento químico durante a diferenciação floral ou pelo cultivo *in vitro* (CUNHA et al., 2005; USMAN et al., 2013).

Na propagação *in vivo* a taxa de multiplicação costuma ser baixa, variando de 11 a 17 plantas a cada cinco meses, partindo-se de uma planta inteira (LIEU et al., 2004). Além disso, esse tipo de propagação pode disseminar pragas e doenças, tornando-se um problema para o cultivo pelas perdas significativas que causa (BE; DEBERGH, 2006).

A propagação *in vitro* por meio da cultura de tecidos é uma alternativa mais vantajosa do ponto de vista numérico, permitindo a obtenção de até 10.000 plantas em seis meses (SONEJI et al., 2002; SOUZA et al., 2013).

A Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos revelou-se uma estratégia apropriada para a produção em larga escala de mudas de abacaxizeiro (FIROOZABADY; GUTERSON, 2003; SRIPAORAYA et al., 2003; FIROOZABADY; MOY, 2004; AMIN et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008; DANSO et al., 2008; SOUZA et al., 2013) e de diversas outras espécies vegetais (JAIN, 2001; KÄRKÖNEN; KOUTANIEMI, 2010; BAIRU et al., 2011; SMULDERS; KLERK, 2011; IBRAHIM, 2012; OGERO et al., 2012; MALUTA et al., 2013).

Isso se deve à possibilidade de produzir plantas livres de doenças com vantagens em relação aos recursos de sementes ou estacas, além de proporcionar altas taxas de propagação, gerando milhares de plantas a partir de um número de explantes relativamente baixo em um curto período de tempo (BONGA et al., 2010; WEATHERS et al., 2010). Recentemente, foi demonstrada a possibilidade de se realizar limpeza viral em plantas de abacaxizeiro previamente contaminadas com o vírus PMWaV (*Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus*), causador da murcha do abacaxizeiro, tendo-se obtido plantas saudáveis a partir de plantas infectadas por meio da excisão e cultivo de ápices caulinares de plantas *in vitro* (SOUZA et al., 2010).

O crescimento de órgãos vegetais depende principalmente de uma combinação entre divisão e expansão celular. Esses processos são fortemente regulados por fatores ambientais, como luz, temperatura e umidade, e por fatores endógenos, como fitormônios (RAI et al., 2011). A coordenação sequencial de múltiplos processos celulares é um componente importante da regulação do crescimento de órgãos vegetais, sendo afetada por fatores como o status nutricional, o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de estresse abiótico (ALABADI; BLAZQUEZ, 2009). Com efeito, em condições *in vitro*, os explantes foram removidos de seu ambiente original e transferidos para um recipiente contendo meio nutritivo que disponibiliza concentrações não fisiológicas de substâncias orgânicas e inorgânicas em condições artificiais, resultando em significativa exposição a estresse (SMULDERS; KLERK, 2011).

A flexibilidade da programação de desenvolvimento de células e tecidos vegetais observada na cultura de tecidos está diretamente associada à capacidade das células somáticas vegetais de reverter o processo de diferenciação. A

totipotência das células vegetais, princípio fundamental deste conjunto de técnicas, implica na capacidade de regeneração de uma planta completa a partir de uma única célula, posto que ela possui toda a informação genética necessária para isso (GALLO; CROCOMO, 1995).

Os reguladores de crescimento vegetais são os fatores mais importantes envolvidos no controle de processos celulares que resultam no desenvolvimento *in vitro* (FEHER et al., 2003). Auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno são hormônios vegetais de ocorrência natural que podem ser adicionados ao meio nutritivo. Dentre estes, as auxinas e citocininas são as mais empregadas na cultura de tecidos vegetais para regular a divisão e a diferenciação celular nos explantes (RAI et al., 2011). No entanto, outros reguladores de crescimento vegetais e um considerável número de outras substâncias de indução de crescimento, como poliaminas, jasmonatos, brassinosteróides, oligossacarinas, esteróis, fosfoinositósídeos e ácido salicílico, também possuem papéis regulatórios específicos que não devem ser ignorados (GASPAR et al., 1996; JIMENEZ, 2005).

As citocininas estimulam a divisão celular e a perda da dominância apical, tendo aplicação no processo de morfogênese. O BAP (6-benzilaminopurina) é a citocinina sintética que geralmente proporciona melhores resultados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), sendo preferida em relação às demais (como a cinetina) devido a sua alta eficácia e baixo custo (KRIKORIAN, 1991). Este regulador de crescimento induz à formação de grande número de brotos e proporciona altas taxas de multiplicação em diversos sistemas *in vitro* (HU; WANG, 1983).

As auxinas (do grego *auxein*, que significa “crescer, aumentar”) são responsáveis pelo alongamento celular diferencial e produzem diversas respostas *in vitro*, variando da formação de calos (FIROOZABADY; MOY, 2004) ao desenvolvimento de raízes (LEITZKE et al., 2009). Auxinas são utilizadas em meios nutritivos para complementar o teor endógeno ou suprir as necessidades dos meristemas isolados, possuindo um importante papel no crescimento vertical das plantas. A primeira auxina natural descoberta foi o AIA (ácido 3-indolacético), sendo coincidentemente a mais abundante auxina e a de maior relevância fisiológica nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009). O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o ANA (ácido α -naftalenoacético) são auxinas sintéticas frequentemente utilizadas em meios nutritivos para estimular o alongamento (OVERVOORDE et al., 2010).

A micropropagação é a produção rápida de milhares de clones de uma planta a partir de células ou tecidos vegetais *in vitro* por meio da cultura de tecidos (OGERO et al., 2012). Um protocolo eficiente de micropropagação passa por uma série de estágios, cada um com um conjunto específico de requisitos, a saber: o estabelecimento *in vitro*, por meio da iniciação de cultivos assépticos; multiplicação dos brotos; enraizamento; e aclimatização (PATI et al., 2006).

Estabelecimento *In Vitro*

Para micropropagar ou conservar plantas *in vitro* de uma determinada espécie, primeiro é necessário desenvolver uma estratégia para seu estabelecimento (COSTA et al., 2007). No estabelecimento *in vitro*, uma porção da planta com potencial propagativo (explante) é desinfestada e transferida para meio nutritivo (SOUZA et al., 2013). Como o explante é obtido de uma planta que se encontra, na maioria das vezes, em contato com o ar e o solo, a contaminação microbiana é uma das grandes dificuldades do processo e pode tornar-se uma limitação (DANTAS et al., 2002). A definição do explante adequado a ser utilizado é o outro problema a ser enfrentado, principalmente em espécies pouco estudadas (KIELSE et al., 2009).

O tipo de explante deve ser escolhido de acordo com a sua capacidade de se adequar às condições *in vitro*, sendo preferidos os que contenham maior proporção de tecido meristemático, facilitando a expressão da totipotência. Diversos explantes, como sementes, estacas, gemas, meristemas, ápices caulinares e segmentos nodais podem ser utilizados no estabelecimento *in vitro* e sua escolha deve considerar o nível de diferenciação do tecido utilizado e o objetivo da micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SOUZA et al., 2013).

O estabelecimento *in vitro* é uma fase crítica da micropropagação, pois nesse período a taxa de sobrevivência dos explantes costuma ser baixa em virtude da resistência de microrganismos aos procedimentos de desinfestação, da oxidação e da adequação ao ambiente *in vitro* e suas respectivas condições de cultivo (CAMPOS et al., 2007).

Em abacaxizeiro, os explantes mais utilizados na fase de estabelecimento são as gemas axilares, que são preferencialmente tratadas para desinfestação com

álcool e hipoclorito de sódio, lavadas com água autoclavada e inoculadas em meio sólido contendo sais e vitaminas MS suplementado com sacarose e concentrações variáveis dos reguladores de crescimento BAP e ANA (DREW, 1980; ALMEIDA et al., 2002; BARBOZA et al., 2004; SILVA et al., 2007; PASQUAL et al., 2008; MORAES et al., 2010; SOUZA et al., 2012).

Multiplicação *In Vitro* e Aplicações

A multiplicação *in vitro* consiste na regeneração e proliferação de diversos brotos a partir dos ápices caulinares, plantas ou calos obtidos durante a fase de estabelecimento em um meio nutritivo asséptico (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

Assim como na fase de estabelecimento, a escolha adequada do meio nutritivo para a fase de multiplicação é essencial, considerando a importante influência dos componentes minerais, vitaminas, reguladores de crescimento e carboidratos no processo (RAMAGE; WILLIAMS, 2002; CAO et al., 2003; ASMAR et al., 2011). Outros elementos que influenciam a multiplicação *in vitro* são a espécie, genótipo ou cultivar e fatores físicos, como luz, temperatura, sala de crescimento, umidade interna do frasco e concentração de CO₂ (READ, 1988; PATI et al., 2006).

A multiplicação *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro foi alcançada utilizando-se meios nutritivos enriquecidos com BAP (BE; DEBERGH, 2006) e combinações de BAP com ANA (FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003), AIA (HAMAD; TAHA, 2008), AIB (ácido indolbutírico) (BOXUS et al., 1991), 2,4-D (LIU et al., 1989), ANA e AIB (SONEJI et al., 2002), ANA e AIA (MATHEWS; RANGAN, 1979) e AIA e AIB (TEIXEIRA et al., 2006). Foram relatados cerca de 30 diferentes tratamentos hormonais para a micropropagação de abacaxizeiro, refletindo sua facilidade de manejo e propagação *in vitro* (HAMAD; TAHA, 2008).

A propagação *in vitro* a partir do cultivo de ápices caulinares reduzidos (domo meristemático e primórdios foliares) tem-se mostrado eficiente para eliminar infecções virais em algumas espécies de importância econômica (CASSELLS, 2000; RAO, 2004; RAMGAREEB et al., 2010; WANG et al., 2011), incluindo o abacaxi (SOUZA et al. 2010). A limpeza viral de matrizes a serem usadas no cultivo *in vitro* é determinante para a produção de plantas sadias e para sua propagação em larga escala (ROUT et al., 2006).

Esse artifício, combinado com a crioterapia, é particularmente interessante para a limpeza de plantas infectadas por vírus, pois agentes químicos têm sido eficazes para eliminar bactérias e fungos do ambiente de cultivo (FACCIOLI; MARANI, 1998; WANG; VALKONEN, 2009).

Conservação de Germoplasma

Diversas espécies vegetais estão ameaçadas de extinção ao redor do mundo em decorrência do desaparecimento de ecossistemas naturais provocado pela atividade humana. Mais de 50 % das espécies vegetais são endêmicas em 34 *hotspots* globais de biodiversidade. Esses 34 *hotspots* de biodiversidade, que já ocuparam 15,7 % da superfície terrestre, em anos recentes ocupavam apenas cerca de 2,3 % (REED et al., 2011).

Tendo em vista que os recursos genéticos vegetais são a base da segurança alimentar e a garantia de seu abastecimento, além de serem imprescindíveis para o melhoramento genético e para a evolução das espécies vegetais, esse cenário de alerta motivou uma série de acordos internacionais com a finalidade de conservá-los, como a Convenção da Diversidade Biológica da ONU, de 1993, e a criação do Comitê Internacional de Recursos Genéticos Vegetais (IBPGR) (FOWLER; HODGKIN, 2004).

A conservação de germoplasma pode ocorrer *in situ*, isto é, no local de ocorrência natural da espécie ou em seu centro de origem, e *ex situ*, ou seja, em locais diversos daquele de sua ocorrência natural. Enquanto a conservação *in situ* consiste na proteção de áreas de preservação ambiental, reservas, parques ecológicos e outros, buscando perpetuar habitats pré-existentes sem que ocorra interrupção do ciclo evolutivo, a conservação *ex situ* compreende a remoção dos recursos genéticos vegetais para fora de seu habitat, onde haja espaço e recursos para sua preservação em condições artificiais, a saber, em coleções de campo, laboratórios, câmaras frias ou criotânques. O modo mais adequado de conservação *ex situ* para uma dada espécie depende de suas características particulares e das respostas de seu material propagativo aos métodos de conservação (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

Existe um consenso de diversos autores (ROWNTREE, 2006; SARASAN et al., 2006; PACHECO et al., 2009; REED et al., 2011) sobre a importância das duas modalidades principais de conservação. Eles consideram a conservação *in situ* por si só como insuficiente para lidar com os desafios e ameaças às espécies, necessitando de complementação por meio de estratégias de conservação *ex situ*.

Bancos de sementes são formas frequentes de conservação *ex situ*, especialmente para plantas propagadas sexuadamente (SHIBLI et al., 2006). No entanto, há um número significativo de espécies para as quais os bancos de sementes não são uma opção disponível (REED et al., 2011).

Muitas espécies de fruteiras têm características que dificultam sua conservação pelos meios tradicionais. Elas possuem sementes intermediárias (mamão, banana, citros, etc.) ou recalcitrantes (manga, abacate, jaca, lichia, etc.) em relação à tolerância à dessecação, que podem ser armazenadas por não mais que algumas semanas (CHAUDHURY; MALIK, 2003).

Adicionalmente, diversas fruteiras são propagadas vegetativamente, sendo preservadas *in vivo* no campo ou em jardins botânicos, nos quais são utilizados brotos, raízes, estacas, bulbos ou outras estruturas durante a multiplicação. A conservação em campo, além de laboriosa, expõe as plantas a pragas e estresses ambientais, podendo levar a perdas de valiosos acessos (SHIBLI et al., 2006; OZUDOGRU et al., 2010).

A conservação *in vitro* por meio da cultura de tecidos destaca-se como uma importante ferramenta para a preservação de espécies de propagação vegetativa, como banana (AGRAWAL et al., 2010), cana-de-açúcar (LEMONS et al., 2002), batata (SARKAR; NAIK, 1998), diversas fruteiras (ENGELMANN, 1991; RAI et al., 2009) e diversas briófitas (ROWNTREE et al., 2011).

O cultivo sistematizado de poucas cultivares e a antropização desordenada de áreas cultivadas tem causado erosão genética no gênero *Ananas*, demandando ações voltadas para a conservação desse importante germoplasma (CABRAL; SOUZA, 2006).

A conservação de germoplasma em campo é uma estratégia que vem sendo utilizada (CABRAL et al., 2008), ainda que fatores bióticos e abióticos se constituam em problemas que podem levar a perdas significativas neste tipo de coleção.

Assim, estratégias a partir de ferramentas biotecnológicas, como a criopreservação, tornam-se alternativas de interesse para a implementação de duplicatas de segurança.

Conservação *In Vitro*

A conservação *in vitro* envolve tanto o armazenamento de plantas e tecidos para curto e médio prazos em condições de crescimento lento quanto o armazenamento para longo prazo por meio da criopreservação, usualmente em nitrogênio líquido (-196 °C) (ENGELMANN, 2011).

A conservação em condições de crescimento lento envolve procedimentos que permitem a manutenção de plantas *in vitro* em condições assépticas com baixa frequência de subcultivos periódicos, sem que sua viabilidade e capacidade de crescimento sejam afetadas. A redução no número de subcultivos leva a diminuição nos custos da conservação, no trabalho manual e no risco de contaminação (OZUDOGRU et al., 2010).

Dependendo da espécie, os subcultivos podem ser programados para uma vez a cada vários meses, a cada ano ou a cada dois anos e, nesses casos, é razoável considerar a conservação *in vitro* como um método de conservação a médio prazo (ENGELMANN, 1991; TYAGI; PRAKASH, 2004; SHARMA et al., 2007). A realização dos subcultivos depende prioritariamente das taxas de crescimento das plantas nas condições estabelecidas. A estratégia mais frequente para conservação em crescimento lento é a combinação de baixa temperatura (geralmente 2-5 °C para espécies de clima temperado, 15-25 °C para espécies de clima tropical) com baixa intensidade luminosa. Essas condições têm consequências fisiológicas, especialmente a diminuição de processos como respiração celular, perda de água, produção de etileno e perda da turgescência foliar, contribuindo para a redução de seu metabolismo e conseqüentemente de seu crescimento (LAMBARDI; CARLO, 2003; REED, 1992).

Algumas estratégias para a conservação *in vitro* envolvem mudanças na composição do meio nutritivo, como por exemplo a diminuição das concentrações de sais ou carboidratos, a adição de reguladores que retardam o crescimento como o ácido abscísico, a adição de componentes osmoticamente ativos e até mesmo a

adição de uma camada de óleo mineral sobre o explante, para diminuir sua capacidade de captar oxigênio (WITHERS; ENGELMANN, 1997).

As poucas experiências com conservação *in vitro* de abacaxizeiro registradas na literatura geralmente envolvem um ou poucos genótipos. Zee e Munekata (1992) descreveram um método para conservação *in vitro* de dois acessos de *Ananas comosus* var. *comosus* e um acesso de *Ananas comosus* var. *bracteatus* a 25 °C e fotoperíodo de 16 horas por 12 meses utilizando meio nutritivo contendo 1/4 da concentração de sais MS suplementado com vitaminas e sacarose na ausência de reguladores de crescimento. Já Canto et al. (2004) testaram a conservação *in vitro* do híbrido PE x SC-60 a 27 °C e fotoperíodo de 16 horas por 12 meses utilizando meio nutritivo MS suplementado com sacarose 30 g L⁻¹ e paclobutrazol (PBZ) 1 mg L⁻¹, observando, contudo, mudanças morfológicas indesejáveis (formato de roseta), especialmente nos primeiros 30 dias. Estes autores concluíram que o meio nutritivo mais adequado para a conservação do híbrido em questão é o meio MS suplementado com sacarose 30 g L⁻¹ na ausência de reguladores de crescimento.

Criopreservação

A criopreservação consiste na conservação de germoplasma a temperaturas ultrabaixas (-196 °C) em um ambiente criogênico, como o nitrogênio líquido, mantendo sua viabilidade (DAY et al., 2008; HAMILTON et al., 2009). A essa temperatura, as divisões celulares e os processos metabólicos são praticamente interrompidos, permitindo a conservação por um período de tempo teoricamente ilimitado (ENGELMANN, 2004).

As vantagens desse método são o baixo custo, minimização do espaço necessário para a conservação e diminuição da mão-de-obra e tempo utilizados para a manutenção dos cultivos. Uma vez armazenados, não há risco de nova contaminação por fungos ou bactérias. Ao mesmo tempo, o material criopreservado tem maior probabilidade de manter sua estabilidade genética, já que evita os subcultivos periódicos (HARDING, 2004; KACZMARCZYK et al., 2012).

A conservação de recursos genéticos vegetais a longo prazo por meio da criopreservação envolve o congelamento sistemático de calos, embriões, ápices

caulinares e meristemas, estruturas complexas com composição celular heterogênea que requerem tratamentos de proteção prévios para garantir sua integridade estrutural (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2004). Particularmente em espécies tropicais, os tratamentos de proteção são necessários para induzir artificialmente tolerância a baixas temperaturas, já que estas são extremamente sensíveis às condições ambientais da criopreservação (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

A maioria das células vegetais vivas possuem altas quantidades de água congelável e por isso são extremamente sensíveis a temperaturas abaixo de 0 °C. Essas células precisam ser desidratadas antes da incubação em nitrogênio líquido para evitar a formação de cristais de gelo, que podem destruir organelas e causar danos irreversíveis à membrana plasmática, comprometendo sua sobrevivência. A desidratação excessiva, por outro lado, pode levar a danos como desnaturação protéica e desequilíbrio metabólico devido ao aumento na concentração de solutos (WANG et al., 2009). Os sistemas de criopreservação disponíveis foram desenvolvidos com o objetivo de minimizar esses danos, e podem ser resumidas em três metodologias principais: congelamento lento, vitrificação e encapsulamento-desidratação (SANTOS, 2000).

O método de congelamento lento consiste no resfriamento contínuo até uma temperatura previamente definida como temperatura de pré-congelamento (geralmente, -40 °C) a uma taxa de congelamento controlada, usando um congelador programável, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 1997). Este método é o mais antigo e foi utilizado com sucesso para a criopreservação de suspensões celulares, porém, pode resultar em grande perda de água, além de necessitar de ajustes precisos na taxa de congelamento (GROUT, 2007).

O encapsulamento-desidratação consiste na captura de explantes em cápsulas de alginato de sódio, cultivo destas cápsulas em meio nutritivo contendo altos níveis de sacarose, desidratação das cápsulas em sílica gel e imersão em nitrogênio líquido. Uma das principais vantagens desse método é o aumento no número de explantes que sobrevivem à exposição ao nitrogênio líquido, pois a cápsula cumpre a função de proteger o tecido da exposição à temperatura ultrabaixa (SHERLOCK et al., 2005).

A vitrificação compreende a transição da água para o estado vítreo, um estado semissólido e amorfo no qual ela apresenta alta viscosidade, porém sem que

ocorra formação de cristais. Isso é alcançado por meio da desidratação dos tecidos por meio de tratamento químico para um teor de umidade em que não há água disponível para a cristalização quando o material biológico é incubado em nitrogênio líquido. Algumas vantagens desse método são a limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, a proteção contra mudanças no pH e a prevenção de colapso celular durante a perda da água, resultando na diminuição de reações químicas indesejáveis que poderiam levar à deterioração de seu conteúdo (BENSON et al., 2007).

Os poucos relatos de tentativas de criopreservação em abacaxizeiro envolvem predominantemente *Ananas comosus* var. *comosus* (GÁMEZ-PASTRANA et al., 2004; GONZÁLEZ-ARNAO et al., 1998; MARTÍNEZ-MONTERO et al., 2005). Gámez-Pastrana et al. (2004) relatam de 0 a 45 % de regeneração após incubação em nitrogênio líquido para a cultivar MD-2, utilizando a solução PVS2 (*Plant Vitrification Solution*) como agente de crioproteção. Martínez-Montero et al. (2005) relatam 25-45% de regeneração máxima após incubação em nitrogênio líquido, tendo regeneração limitada nas cultivares Red Spanish (25%) e Cabezona (33%).

Finalmente, somando-se o pouco conhecimento existente a respeito das diferenças entre variedades botânicas de abacaxizeiro em relação a seu comportamento *in vitro* com a crescente demanda por produtos diferenciados advindos do abacaxi e a necessidade premente relacionada à conservação do germoplasma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a morfogênese e o potencial propagativo de variedades botânicas no seu estabelecimento *in vitro*, assim como a possibilidade de se utilizar a criopreservação como estratégia de conservação deste valioso germoplasma.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, G. M. F.; HOLSCHUH, H. J.; BORA, P. S.; OLIVEIRA, E. F. Extração, atividade da bromelina e análise de alguns parâmetros químicos em cultivares de abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 1117-1121, 2009.
- AGRAWAL, A.; SANAYAIMA, R.; TANDON, R.; TYAGI, R. K. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 703-711, 2010.
- ALABADI, D.; BLASQUEZ, M. A. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 409-417, 2009.
- ALMEIDA, W. A. B.; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 296-300, 2002.
- AMIN, M. N.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, K. W.; AHMED, R.; HOSSAIN, M. S.; AHMED, M. B. Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf derived callus cultures of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Giant Kew]. **International Journal of Botany**, v. 1, p. 128-132, 2005.
- ARAÚJO, R. F.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro 'SmoothCayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Revista Ceres**, v. 55, p. 455-460, 2008.
- ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 533-538, 2011.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 147-173, 2011.
- BAKER, K.; COLLINS, J. L. Notes on the distribution and ecology of *Ananas* and *Pseudananas* in South America. **American Journal of Botany**, v. 26, p. 697-702, 1939.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 725-733, 2004.
- BE, L. V.; DEBERGH, P. C. Potential low cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 191-194, 2006.
- BENSON, E. E.; HARDING, K.; JOHNSTON, J. W. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.) **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Humana Press, p. 163-184, 2007.
- BONGA, J. M.; KLIMASZEWSKA, K. K.; VON ADERKAS, P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 241-254, 2010.

- BOXUS, P.; TERZI, J. M.; LIEVES, C.; PYLYSER, M.; NGABOYAMAHINA, P.; DUHEM, K. Improvement and perspectives of micropropagation techniques applied to some hot climate plants. **Acta Horticulturae**, v. 389, p. 55-59, 1991.
- CABRAL, J. R. S.; SOUZA, F. V. D. Breeding for ornamental pineapple. In: Pineapple News International Society for Horticultural Science, v. 13, p. 14-16, 2006.
- CABRAL, J. R. S.; FERREIRA, F. R.; SOUZA, F. V. D.; MACHADO, C. F. Banco ativo de germoplasma de abacaxi. In: II Simpósio brasileiro de recursos genéticos, v. 1, p. 299, 2008.
- CAMPOS, R. A. S.; AÑEZ, L. M. M.; DOMBROSKI, J. L. D.; DIGNART, S. L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 30-36, 2007.
- CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 717-720, 2004.
- CAO, X.; FORDHAM, I.; DOUGLASS, L.; HAMMERSCHLAG, F. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 255-259, 2003.
- CASSELLS, A. C. Contamination Detection and Elimination in Plant Cell Culture. In: SPIER, R. E. (Ed.) **Encyclopedia of cell technology**, v. 1, 2000. p. 577-586.
- CHAUDHURY, R.; MALIK, S. K. Strategies for achieving short-, medium- and long-term conservation of desiccation-sensitive seeds. In: CHAUDHURY, R., PANDEY, R., MALIK, S. K., BHAG, M. (Eds.) ***In vitro* conservation and cryopreservation of tropical fruit species**, IPGRI Office for South Asia and NBPGR, Nova Delhi, 2003. p. 191-200.
- COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 68-72, 2007.
- CUNHA, G. A. P.; REINHARDT, D. H.; MATOS, A. P.; SOUZA, L. F. S.; SANCHES, N. F.; CABRAL, J. R. S.; ALMEIDA, O. A. **Recomendações Técnicas para o Cultivo do Abacaxizeiro**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005. (Circular Técnica nº 73).
- D'ECKEMBRUGGE, G. C.; LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P., PAULL, R. E., ROHRBACH, K. G. (Eds.): **The pineapple: botany, production and uses**. New York, CABI Publishing, 2003. p. 13-32.
- DANSO, K. E.; AYEK, K. O.; ODURO, V.; AMITEYE, S.; AMOATEY, H. M. Effect of 6-Benzylaminopurine and Naphthalene Acetic Acid on *In Vitro* Production of MD2 Pineapple Planting Materials. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, p. 614-619, 2008.

- DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 10, p. 391-407, 2002.
- DAY, J. G.; HARDING, K. C.; NADARAJAN, J.; BENSON, E. E. Cryopreservation, conservation of bioresources at ultra low temperatures. In: WALKER, J. M.; RAPLEY, R. (Eds.) **Molecular Biomethods Handbook**. 2008. p. 917-947.
- DREW, R. A. Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. **Queensland Agricultural Journal**, v. 106, p. 447-451, 1980.
- ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 112, p. 9-18, 1997.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 5-16, 2011.
- FACCIOLI, V. C.; MARANI, F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: HADIDI, A. (Ed.) **Plant Virus Disease Control**, American Phytopathological Society, 1998. p. 346-380.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Agricultural statistics database. Disponível em: faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse. Acesso em: Mai, 2014.
- FEHER, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Pineapple Germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 334, p. 23-26, 1993.
- FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 844–850, 2003.
- FIROOZABADY, E.; MOY, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 67–74, 2004.
- FOWLER, C.; HODGKIN, T. Plant genetic resources for food and agriculture: assessing Global Availability. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 29, p. 10.1-10.37, 2004.
- GALLO L. A.; CROCOMO O. J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: FILHO A. B., KIMATI H., AMORIM L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: **Agronômica Ceres**. p. 495-505, 1995.

GÁMEZ-PASTRANA, R.; MARTÍNEZ-OCAMPO, Y.; BERISTAIN, C. I.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T. An Improved Cryopreservation Protocol for Pineapple Apices Using Encapsulation-Vitrification. **CryoLetters**, v. 25, p. 405-414, 2004.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRÁ, C.; MARTÍNEZ-MONTERO, M. E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) ápices. **CryoLetters**, v. 19, p. 375-382, 1998.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 92, p. 1-13, 2008.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CLAVERO-RAMÍREZ, I.; LÓPEZ-ARANDA, J. M. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 341-351, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa p. 183-260, 1998.

GROUT, B. W. W. Cryopreservation of Plant Cell Suspensions. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, p. 153-162, 2007.

HAMAD, A. M.; TAHA, R. M. The effect of different hormones and incubation periods on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) cv. Smooth Cayenne shoot tip culture. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 386-391, 2008.

HAMILTON, K. N.; TURNER, S. R.; ASHMORE, S. E. Cryopreservation. In: OFFORD, C. A. & MEAGHER, P. F. (Eds.) *Plant Germplasm Conservation in Australia: Strategies and Guidelines for Developing, Managing and Utilising Ex Situ Collections*, p. 128-129, 2009.

HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **CryoLetters**, v. 25, p. 3-22, 2004.

HOSSAIN, A. B. M. S.; SALEH, A. A.; AISHAH, S.; BOYCE, A. N.; CHOWDHURY, P. P.; NAQUIDDIN, M. Bioethanol Production from Agricultural Waste Biomass as a Renewable Bioenergy Resource in Biomaterials. **IFMBE Proceedings**, v. 21, parte 3, p. 300-305, 2008.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (eds). *Handbook of plant cell culture – techniques for propagation and breeding*. New York: MacMillan Publishing Company. p. 177-277, 1983.

IBRAHIM, M. A. In Vitro Plant Regeneration of Local Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Via Direct and Indirect Organogenesis. **Genetics and Plant Physiology**, v. 2, p. 187-191, 2012.

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, p. 153-166, 2001.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vivo* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.

KACZMARCZYK, A.; FUNNEKOTTER, B.; MENON, A.; PHANG, P. Y.; AL-HANBALI, A.; BUNN, E.; MANCERA, R. L. Current Issues in Plant Cryopreservation. In: Current Frontiers in Cryobiology. KATKOV, I. I. (Ed.), p. 417-438, 2012.

KÄRKÖNEN, A.; KOUTANIEMI, S. Lignin Biosynthesis Studies in Plant Tissue Cultures. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 176-185, 2010.

KIELSE, P.; FRANCO, E. T. H.; PARANHOS, J. T.; LIMA, A. P. S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rígida*. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1088-1094, 2009.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. H.; MROGINSKI, L. A. (eds.). Cultivo de tejidos em la agricultura - Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. p. 41-78, 1991.

LAMBARDI, M.; CARLO, A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. Micropropagation of woody trees and fruits. Kluwer, Holanda, p. 815-840, 2003.

LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 227-238, 2009

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 582-587, 2009.

LEMO, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1359-1364, 2002.

LIEU, P. N.; TINH, N.N.; VUI, P.V.; KHAI, T.P.; TEISSON, C. Study of multiplication rate of conventional propagation in vivo of Cayenne (*A. comosus* L.). Impact de 10 années de coopération française sur l'amélioration des productions fruitières au Vietnam - **SOFRI. Conférence**, p. 1– 11, 2004.

LIU, L. J.; ROSA-MARQUEZ, E.; LAZARDI, E. Smooth leaf (spineless) red Spanish pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) propagated *in vitro*. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 73, p. 301-311, 1989.

LUTHER, H. E. An alphabetical list of Bromeliad binomials. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; **The Bromeliad Society International**, 2012.

MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI, M. L.; AMBROSANO, G. M. B.; RODRIGUES, P. H. V. Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1303-1307, 2013.

MARTÍNEZ-MONTNERO, M. E.; MARTÍNEZ, J.; ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. Cryopreservation of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) Apices and Calluses. **Proceedings of the IVth International Symposium on Pineapple**, p. 127-131, 2005.

MATHEWS, V. H.; RANGAN, T. S. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant *in vitro* culture of pineapple. **Scientia Horticulturae**, v. 11, p. 319-328, 1979.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; BRUNO, R. L. A.; FILHO, J. C.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 1. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 932-936, 2010.

OGERO, K. O.; MBURUGU, G. N.; MWANGI, M.; OMBORI, O.; NGUGI, M. *In vitro* Micropropagation of Cassava Through Low Cost Tissue Culture. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, p. 205-209, 2012.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; SOUSA, F. I. B.; SILVA, R. J. F. Estrutura foliar de curauá em diferentes intensidades de radiação fotossinteticamente ativa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, 2008.

OVERVOORDE, P.; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T. Auxin Control of Root Development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, 2010.

OZUDOGRU, E. A.; PREVIATI, A.; LAMBARDI, M. In Vitro Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants, **Methods in Molecular Biology**, v. 589, p. 303-324, 2010.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; VALLS, J. F. M.; MANSUR, E. Micropropagation and in vitro conservation of wild *Arachis* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 239-249, 2009.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 45-49, 2008.

PATI, P. K.; RATH, S. P.; SHARMA, M.; SOOD, A.; AHUJA, P. S. *In vitro* propagation of rose – a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 94-114, 2006.

RAI, M. K.; ASTHANA, P.; SINGH, S. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. The encapsulation technology in fruit plants – A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 671-679, 2009.

RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N. S.; GUPTA, H. A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 179-190, 2011.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 38, p. 116-124, 2002.

RAMGAREEB, S.; SNYMAN, S. J.; VAN ANTWERPEN, T.; RUTHEFORD, R. S. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. Cultivar NCo376) using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 175-181, 2010.

RAO, N. K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 136-145, 2004.

READ, P. E. Stock plants influence micropropagation success. **Acta Horticulturae** (ISHS), v. 226, p. 41-52, 1988.

REED, B. M. Cold storage of strawberries *in vitro*: A comparison of three storage systems. **Fruit Varieties Journal**, v. 46, p. 98-102, 1992.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 1-4, 2011.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; MOHAN JAIN, S. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 531-560, 2006.

ROWNTREE, J. K. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophytes culture for conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 87, p. 191-201, 2006.

ROWNTREE, J. K.; PRESSEL, S.; RAMSAY, M. M.; SABOVLJEVIC, A.; SABOVLJEVIC, M. *In Vitro* Conservation of European Bryophytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 55-64, 2011.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SARASAN, V.; CROPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDER-GAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in past decades. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, p. 206-214, 2006.

SARKAR, D.; NAIK, P. S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. **Euphytica**, v. 102, p. 275-280, 1998.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L. P. Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 177-234, 2010.

SHARMA, N.; SATSANGI, R.; PANDEY, R.; DEVI, S. V. *In Vitro* Clonal Propagation and Medium Term Conservation of *Brahmi* [*Bacopa monnieri* (L) Wettst]. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, v. 16, p. 139-143, 2007.

SHERLOCK, G.; BLOCK, W.; BENSON, E. E. Thermal Analysis of the Plant Encapsulation-Dehydration Cryopreservation Protocol Using Silica Gel As the Desiccant. **CryoLetters**, v. 26, p. 45-54, 2005.

SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, N. A.; SUBAIH, W. S.; AJLOUNI, M. M. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources: A Review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 372-382, 2006.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1257-1260, 2007.

SMULDERS, M. J. M.; KLERK, G. J. de. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 137-146, 2011.

SONEJI, J. R.; RAO, P. S.; MHATRE, M. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 77, p. 28-32, 2002.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. Introdução à micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 152 p.

SOUZA, F. V. D.; ANDRADE, E. C. de; JUNGHANS, D. T.; CARVALHO, H. L.; SANTOS, K. C. dos. Cultivo de meristemas apicais de plantas in vitro para limpeza viral em abacaxi. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Natal-RN, Pdf 703, 2010.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 59, p. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2ed., Brasília, v. 1, p. 345-372, 2013.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus*). **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 450–454, 2003.

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: Artmed, 4.^a Ed., 2009.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient médium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 375-378, 2006.

TYAGI, R. K.; PRAKASH, S. Genotype- and sex-specific protocols for *in vitro* micropropagation and medium-term conservation of jojoba. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 19-23, 2004.

USMAN, I. S.; ABDULMALIK, M. M.; SANI, L. A.; MUHAMMAD, A. N. Development of an efficient protocol for micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. Smooth Cayenne). **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 2053-2056, 2013.

WANG, B.; MA, Y.; ZHANG, Z.; WU, Z.; WU, Y.; WANG, Q.; LI, M. Potato viruses in China. **Crop Protection**, v. 30, p. 1117-1123, 2011.

WANG, Q. C.; PANIS, B.; ENGELMANN, F.; LAMBARDI, M.; VALKONEN, J. P. T. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. **Annals of Applied Biology**, v. 154, p. 351-363, 2009.

WANG, Q.; VALKONEN, J. P. T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 119-122, 2009.

WEATHERS, P. J.; TOWLER, M. J.; XU, J. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1339-1351, 2010.

WITHERS, L. A.; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. Biotechnology in agriculture. Marcel Dekker, Nova Iorque, p. 57-88, 1997.

ZEE, F. T.; MUNEKATA, M. In Vitro Storage of Pineapple (*Ananas* spp.) Germplasm. **HortScience**, v. 27, p. 57-58, 1992.

CAPÍTULO 1

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE VARIEDADES SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE VARIEDADES SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO

RESUMO

O gênero *Ananas* é o de maior importância econômica da família das bromeliáceas. A ação antrópica e o uso de poucas cultivares no plantio de abacaxi vem causando erosão genética no gênero, demandando a aplicação de estratégias de conservação. Dentre as estratégias de conservação disponíveis, destaca-se a conservação *in vitro*, eficaz para a conservação de espécies de propagação vegetativa a curto e médio prazo. O estabelecimento e a multiplicação *in vitro* são etapas cruciais nos processos de conservação e micropropagação. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de *A. macrodontes* e *A. comosus* com suas diferentes variedades botânicas durante o estabelecimento e a multiplicação para integração ao BAG *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram obtidos caules de acessos silvestres dessas duas espécies e coroas de acessos silvestres de *A. comosus* para extração das gemas, desinfestação e introdução *in vitro*. O caule foi dividido em seções a fim de se rastrear o comportamento das gemas de acordo com seu posicionamento na planta. As gemas foram inoculadas em meio MS suplementado com sacarose 3,0 % (m/v), BAP 0,5 mg L⁻¹, ANA 0,01 mg L⁻¹ e Phytigel® 2,5 g L⁻¹. Aos 45 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de gemas contaminadas, número de gemas intumescidas e plantas formadas. Para a etapa de multiplicação utilizou-se o meio MS suplementado com sacarose 3,0 % (m/v), BAP 0,5 mg L⁻¹, ANA 0,2 mg L⁻¹ e Phytigel® 2,5 g L⁻¹, por quatro subcultivos realizados em intervalos de 45 dias. O número de plantas foi registrado ao final de cada subcultivo. As elevadas taxas de contaminação em *A. macrodontes* impediram sua introdução *in vitro*. Foi possível o estabelecimento e a multiplicação de todos os acessos de *A. comosus*. As melhores respostas morfogenéticas foram obtidas com os acessos de *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *erectifolius* cujas taxas de crescimento geométrico se mostraram relativamente estáveis. Gemas provenientes das regiões superior e média apresentaram o melhor desempenho nas duas etapas do trabalho.

Palavras-chave: abacaxi; acessos silvestres; conservação *in vitro*; micropropagação.

IN VITRO ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF WILD VARIETIES OF PINEAPPLE

ABSTRACT

The genus *Ananas* is the most economically important genus of the family *Bromeliaceae*. The human action and the use of fewer varieties in cultivation of pineapple is causing genetic erosion in the genus, demanding the implementation of conservation strategies. Among the conservation strategies available, there is *in vitro* conservation, effective for the conservation of vegetatively propagated species for short and medium term. The *in vitro* establishment and multiplication are crucial steps in the processes of conservation and micropropagation. The objective of this study was to evaluate the behavior of *A. macrodontes* and *A. comosus* with its various botanical varieties during the establishment and multiplication for integration to the *in vitro* active germplasm bank at Embrapa Mandioca e Fruticultura. Stems of wild accessions of these two species and crowns of wild accessions of *A. comosus* were obtained for the extraction of buds, disinfection and introduction *in vitro*. The stem was divided into sections in order to track the behavior of the buds according to their position on the plant. Buds were inoculated on MS medium supplemented with 3.0 % sucrose (w / v) , 0.5 mg L⁻¹ BAP , NAA 0.01 mg L⁻¹ and Phytigel ® 2.5 g L⁻¹. After 45 days of cultivation, the following variables were evaluated: number of infected buds, number of intumescenced buds and plants formed. The multiplication was carried out in MS medium supplemented with 3.0 % sucrose (w / v), 0.5 mg L⁻¹ BAP , NAA 0.2 mg L⁻¹ and Phytigel ® 2.5 g L⁻¹, by four subcultures performed at intervals of 45 days. The number of plants was recorded at the end of each subculture. The high contamination rates in *A. macrodontes* impeded the *in vitro* establishment. All accessions of *A. comosus* were introduced and established. The best morphogenetic response were obtained with the *A. comosus* var. *bracteatus* and, *A. comosus* var. *erectifolius* accessions that the geometric growth rates were stable. Buds from the upper and middle sections showed the best performance in both phases of the work.

Keywords: *in vitro* conservation; pineapple; tissue culture; wild accessions.

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro, pertencente ao gênero *Ananas* Mill., é o representante mais importante da família Bromeliaceae, que conta com aproximadamente 58 gêneros e 3352 espécies (LUTHER, 2012) e tem seu provável centro de origem na Amazônia, região em que se encontra o maior número de materiais silvestres ou cultivados (BAKER; COLLINS, 1939; FERREIRA; CABRAL, 1993).

O gênero *Ananas* é dividido em duas espécies: *A. macrodontes* E. Morren, e *A. comosus* (L.) Merr., que inclui cinco variedades botânicas: *A. comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *erectifolius* e *A. comosus* var. *parguazensis* (COPPENS D'EECKEMBRUGGE; LEAL, 2003).

O abacaxi está entre as fruteiras tropicais mais consumidas e apreciadas no mundo e é cultivado em várias regiões (ARAÚJO et al., 2008; DANSO et al., 2008).

Entretanto, na última década, o uso de variedades do gênero tem sido diversificado, destacando-se o uso de suas fibras como reforço vegetal para a formação de compósitos (LEÃO et al., 2009), como plantas ornamentais (SOUZA et al., 2012; SOUZA et al., 2014), como fitoterápico (SUN et al., 2002) e até como matéria-prima para produção de biocombustíveis (HOSSAIN et al., 2008). Essa diversificação tem sido pautada de forma significativa em variedades silvestres do gênero, deixando evidente a relevância de se ampliar os estudos sobre esses materiais.

Por outro lado, a erosão genética no gênero vem aumentando devido ao plantio de poucas cultivares e a ações antrópicas nos locais de origem (CABRAL et al., 2008). Em vista disso, a conservação desse germoplasma passa a ser estratégica, considerando ainda todo o contexto atual de mudanças climáticas. Vale destacar que o desenvolvimento de novas variedades que possam ser relevantes em condições adversas depende prioritariamente de variabilidade genética conservada.

A conservação de germoplasma envolve estratégias *in situ*, no local de origem e *ex situ*, dentre as quais se destaca a conservação *in vitro*, considerada

como uma metodologia eficaz para a conservação de espécies de propagação vegetativa a curto e médio prazo (AGRAWAL et al., 2010; ENGELMANN, 2000).

O Banco Ativo de Germoplasma *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi estabelecido em 2003 com o objetivo de tornar-se uma duplicata de segurança da coleção de campo e garantir matrizes sadias frente ao avanço do PMWaV (*Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus*), vírus causador da murcha do abacaxizeiro que foi responsável pela perda de vários acessos (SOUZA et al., 2005). Dessa forma, ampliar a coleção *in vitro* pela introdução de novos materiais tem se tornado uma atividade de rotina para o germoplasma de abacaxi conservado nesta Instituição.

No caso específico da coleção de campo conservada na Embrapa, vários acessos revelaram ter elevado potencial comercial, tanto no mercado de alimentos quanto no mercado de ornamentais, com lançamento de híbridos comestíveis resistentes a fusariose (SOUZA, 2010; VENTURA et al., 2009) e desenvolvimento de híbridos ornamentais de alto valor agregado (SOUZA et al., 2013).

A crescente demanda por material de interesse ornamental no Brasil e no mundo, o aumento do número de biofábricas e a necessidade de mudas para diversas finalidades requerem o desenvolvimento de métodos eficazes de micropropagação desses acessos.

Considerando ambas as finalidades, tanto a conservação *in vitro* de germoplasma quanto a micropropagação, as fases de estabelecimento *in vitro* e o potencial propagativo das espécies são cruciais.

A maioria dos estudos publicados a respeito do estabelecimento e da multiplicação *in vitro* de abacaxi apresentam metodologias variáveis, mas quase sempre concentradas em acessos de *A. comosus* var. *comosus* com fins de obtenção de material comestível para o mercado alimentício (ALMEIDA et al., 2002; BARBOZA et al., 2004; BE; DEBERGH, 2006; SILVA et al., 2007; FIROOZABADY; MOY, 2004; MORAES et al., 2010), sendo raros os trabalhos em que o foco foi o material com finalidade de produção de fibras ou ornamental, ainda assim incluindo apenas uma variedade (SANTOS et al., 2000; DIAS et al., 2008; PASQUAL et al., 2008; CARVALHO et al., 2009).

De um modo geral, a posição e idade dos explantes são fatores importantes para a eficiência do estabelecimento *in vitro* (PIERIK, 1990). A influência da posição

do explante sobre o êxito do estabelecimento *in vitro* foi comprovada por meio de estudos em batata (PEREIRA et al., 2005), macieira (PEREIRA; FORTES, 2001), carvalho (SAN-JOSÉ et al., 1988), maracujazeiro (FARIA et al., 2007) e mandioca (VIDAL et al., 2013). A experiência prática sugere que pode haver influência do local de extração dos explantes sobre a eficiência do estabelecimento de abacaxizeiro, ainda que não haja registro formal na literatura.

Em vista do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta morfogênética *in vitro* de variedades botânicas de *A. comosus* e de *A. macrodontes* nas etapas de estabelecimento e multiplicação das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizadas plantas inteiras, com cerca de um ano de idade, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Abacaxi) (Figura 1a) e pertencentes às seguintes variedades botânicas: *Ananas comosus* var. *ananassoides* (5 acessos); *A. comosus* var. *bracteatus* (5 acessos); *A. comosus* var. *comosus* (5 acessos), *A. comosus* var. *erectifolius* (3 acessos) e *A. comosus* var. *parguazensis* (5 acessos), assim como da espécie *A. macrodontes* (5 acessos). Foram utilizadas três plantas de cada acesso, considerando-se cada planta uma repetição. Os acessos coletados para o trabalho foram selecionados com base na disponibilidade no BAG Abacaxi *in vivo*.

Gemas axilares de diferentes seções do caule

As plantas foram retiradas do campo, tiveram suas folhas reduzidas (Figura 1b) e removidas cuidadosamente para expor o talo com as gemas (Figura 1c), que foi lavado abundantemente com água de torneira e transportado para o laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

O caule foi dividido em três regiões designadas como: i) inferior, ii) mediana e iii) superior (Figura 1c). Foram consideradas da região inferior as gemas localizadas entre a primeira gema visível em contato com as raízes e o local onde aparecem os últimos meristemas radiculares; como gemas da região mediana, as

que se localizavam desde a primeira gema visível após os últimos meristemas radiculares até o ponto de inflexão do caule do abacaxizeiro; e a partir daí até o ápice caulinar, como gemas da região superior.

Cada gema foi excisada por meio de um pequeno corte transversal poucos milímetros abaixo de sua base, seguido por um segundo corte, feito por trás da gema, em sentido longitudinal, perfazendo um ângulo de 180 ° (Figura 1d). As gemas foram transferidas para câmaras de fluxo laminar em frascos autoclavados, devidamente identificados a fim de se iniciar o procedimento de desinfestação.

Gemas axilares de coroas de abacaxizeiro

Os acessos que apresentavam plantas em frutificação com presença de coroas já desenvolvidas foram utilizados para se avaliar a resposta morfogênética de gemas provenientes deste tipo de estrutura reprodutiva, sendo quatro acessos de *A. comosus* var. *comosus*, quatro de *A. comosus* var. *bracteatus* e três de *A. comosus* var. *ananassoides*.

Uma coroa de cada um desses acessos foi coletada com auxílio de faca de laboratório, sendo efetuado um corte transversal em relação ao eixo da haste, no topo do fruto (Figura 1e). As coroas foram lavadas abundantemente em água corrente e transportadas em sacos plásticos até o laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. A coroa não foi dividida em regiões, devido ao comprimento de sua base, que torna difícil a divisão, e à ausência de diferenças morfológicas que, embora estejam presentes no caule, não estão presentes de forma pronunciada na coroa, inviabilizando a utilização de critérios bem definidos para a divisão em regiões.

As folhas da coroa foram cuidadosamente removidas com auxílio de pinça e bisturi, revelando as gemas em sua base, que foram excisadas como descrito para o caule (Figura 1f) e transferidas para frascos autoclavados e devidamente identificados.

Desinfestação

Os procedimentos de desinfestação e estabelecimento das gemas foram iguais tanto para as de coroa como para as de caule.

As gemas foram lavadas com detergente comercial antes de serem levadas para a câmara de fluxo laminar sob condições assépticas e tratadas com solução de álcool 70 % (v/v) por 5 minutos, seguida por imersão em solução de água sanitária comercial (hipoclorito de sódio 2,0 - 2,5 %) 30 % (v/v), contendo três gotas de detergente Tween[®] por litro, por 15 minutos. Foram realizados três procedimentos de lavagem com água deionizada autoclavada para remover o hipoclorito de sódio remanescente, completando o procedimento de desinfestação (Figura 1g).

Condições de Cultivo na Fase de Estabelecimento

Após a desinfestação, as gemas (em número mínimo de seis por planta) foram reduzidas para se retirar o excesso de tecidos, antes de serem introduzidas em tubos de ensaio (uma gema por tubo) contendo meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com sacarose 3,0 % (m/v), BAP 0,5 mg L⁻¹, ANA 0,01 mg L⁻¹ e Phytigel[®] 2,5 g L⁻¹ previamente autoclavado a 120 °C por 20 minutos (Figura 1h). Os tubos de ensaio devidamente identificados foram distribuídos ao acaso em sala de crescimento com condições de incubação de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 μmol m⁻² s⁻¹.

Avaliações na etapa de estabelecimento

Aos 45 dias de cultivo (Figura 1i) foram avaliadas as seguintes variáveis: número de gemas contaminadas, número de gemas intumescidas e número de plantas formadas por variedade botânica e região do caule. Gemas verdes e intumescidas tendem a formar plantas na fase de estabelecimento ou após a transferência para meio de multiplicação. Entretanto, como nem sempre gemas que intumescem formam plantas, decidiu-se por realizar a contagem separada de gemas intumescidas e gemas que formaram plantas.

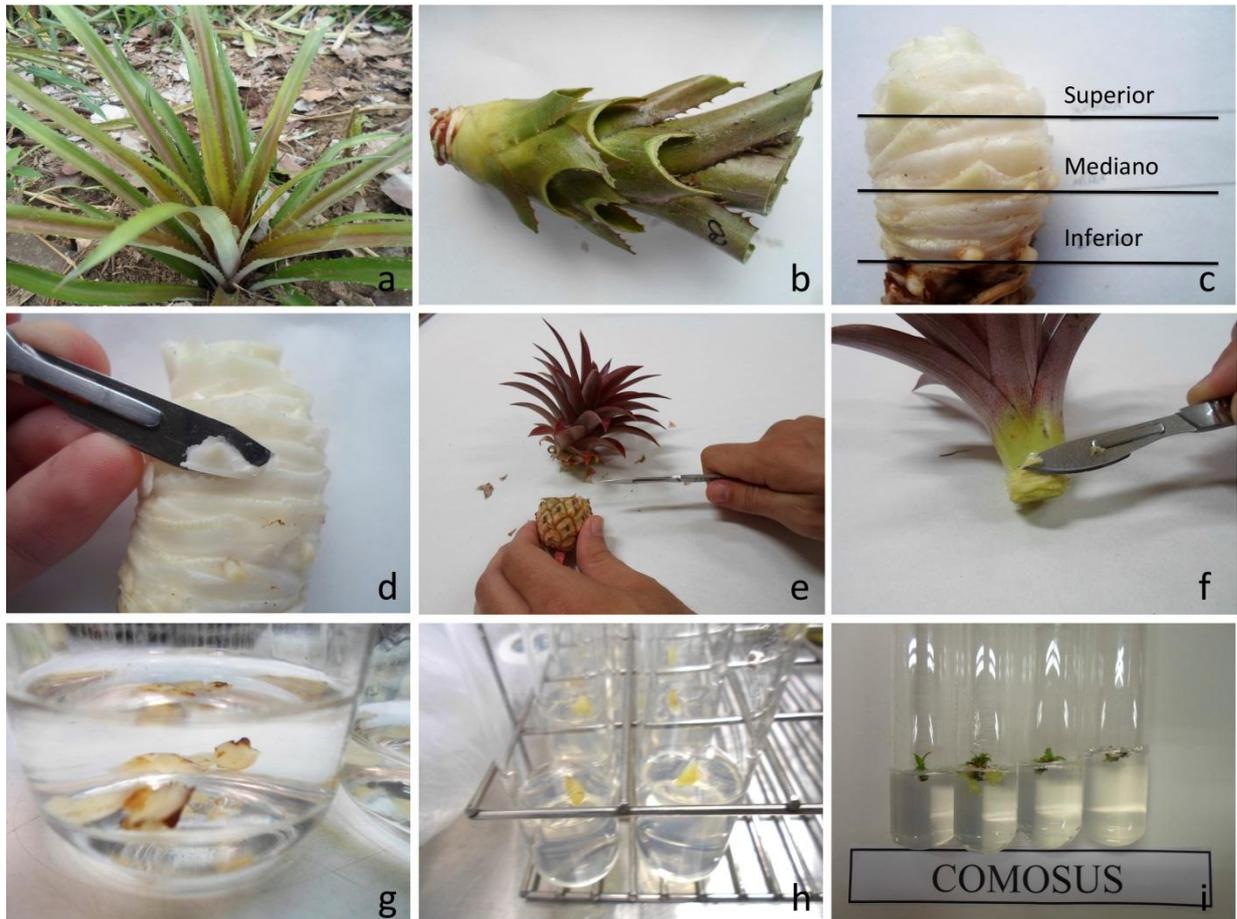


Figura 1. Etapas de estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro. a) planta em campo; b) redução das folhas; c) remoção das folhas e exposição das gemas do caule; d) excisão das gemas do caule; e) separação da coroa do fruto; f) excisão das gemas da coroa; g) desinfestação das gemas; h) gemas inoculadas em meio de cultivo *in vitro*; i) plantas após 45 dias de inoculadas em meio de cultivo *in vitro*.

Condições de cultivo e multiplicação dos acessos

As gemas intumescidas e as plantas formadas oriundas do desenvolvimento de gemas do caule foram transferidas para meio de multiplicação formado por sais e vitaminas MS suplementado com sacarose 3,0 % (m/v), BAP 0,5 mg L⁻¹, ANA 0,2 mg L⁻¹ e Phytigel[®] 2,5 g L⁻¹, em frascos. O procedimento de subcultivo compreendeu a limpeza das raízes, a retirada das folhas mais velhas e o seccionamento do caule, para promover a quebra da dominância apical, favorecendo a formação de brotos adventícios. Nas condições deste estudo, apenas plantas com maior diâmetro (acima de 0,5 cm) foram seccionadas, de modo que as demais foram transferidas inteiras para o meio de multiplicação. Foram realizados quatro subcultivos sucessivos, em intervalo de 45 dias, registrando-se o número de brotos formados por variedade botânica e por região do caule, que originou as plantas. A partir destes

dados foi calculada uma taxa de crescimento geométrico, conforme a seguinte fórmula:

$$F = \left[\sqrt[t]{\frac{V_f}{V_i}} - 1 \right] \times 100$$

Em que:

F é a taxa de crescimento geométrico;

V_f é o número de plantas ao final de cada subcultivo;

V_i é o número de plantas ao final do subcultivo anterior;

t é o tempo entre os subcultivos, em dias.

Delineamento e análise experimental

Para o estabelecimento de gemas do caule, foi realizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 X 3 (variedades x regiões do caule), sendo realizado teste de Scott-Knott para os materiais e teste de Tukey para as regiões do caule, a 5 % de significância, em caso de teste F significativo. Os dados de contaminação das gemas também foram expressos em porcentagem.

Para o estabelecimento de gemas da coroa, foi realizado um delineamento inteiramente casualizado desbalanceado com 3 tratamentos (variedades) e variado número de repetições (correspondentes ao número de acessos de cada material), utilizando o teste de Tukey para compará-los, a 5 % de significância, no caso de teste F significativo.

As análises de variância e os testes de médias foram realizados por meio do programa SAS (SAS Institute, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento de gemas do caule

Foi observada diferença significativa entre as variedades botânicas/ espécie e região do caule para a o total de gemas (Anexo A). *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *ananassoides* e *A. macrodontes* foram similares quanto ao número de gemas na seção inferior, que por sua vez foi superior quando comparado a *A. comosus* var. *paraguayensis* e *A. comosus* var. *erectifolius*. Já *A. comosus* var. *erectifolius* apresentou o maior número de gemas na seção mediana, quando comparada às demais variedades. Na região superior, os maiores números de gemas foram registrados em *A. comosus* var. *erectifolius* e *A. comosus* var. *bracteatus* (Tabela 1).

Tabela 1. Número total de gemas por variedade botânica e número médio de gemas por região do caule

Variedades/ Espécie	Total de Gemas	Região do caule		
		Inferior	Mediana	Superior
<i>A. macrodontes</i>	14,19	3,55 aB	6,00 bA	4,64 bAB
<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	11,18	3,18 aA	4,73 bA	3,27 bA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	16,45	4,36 aB	6,36 bA	5,73 aAB
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	13,54	3,36 aB	6,00 bA	4,18 bB
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	15,55	2,11 bB	8,11 aA	5,33 aAB
<i>A. comosus</i> var. <i>paraguayensis</i>	11,27	2,73 bC	5,09 bA	3,45 bB

*Letras minúsculas comparam diferentes variedades/ espécie dentro de cada região do caule, nas colunas, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Letras maiúsculas comparam diferentes regiões do caule dentro de cada variedade/ espécie, nas linhas, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Os resultados deixam evidente que a região mediana do caule, independente da variedade botânica, é onde mais se concentram gemas, assim como existem diferenças na formação de gemas entre os materiais avaliados.

O número total de gemas distribuídas ao longo do talo pode ser um primeiro aspecto a ser avaliado no potencial propagativo destas variedades botânicas, ainda que, *in vitro*, outros fatores possam ser mais determinantes, como a competência das células para responder às condições de cultivo estabelecidas. É desejável possuir material propagativo em grande quantidade na fase de estabelecimento, aumentando a probabilidade do êxito nessa etapa, que pode ser bastante limitante.

Um dos maiores obstáculos nesta fase inicial é a contaminação por microrganismos de origem fúngica e/ou bacteriana, que em decorrência da riqueza nutricional do meio nutritivo se multiplicam de forma acelerada tornando-se fatais aos explantes inoculados.

Os resultados das taxas de contaminação na fase de estabelecimento mostraram que houve uma interação significativa entre as variedades/ espécie e região do caule sobre a contaminação microbiana (Anexo B). As variedades/ espécie que apresentaram maiores índices de contaminação, independente da região, foram *A. macrodontes* e *A. comosus* var. *erectifolius*, enquanto as demais variedades apresentaram baixa contaminação nesta fase (Tabela 2). Na região inferior, *A. macrodontes* foi o material que mais sofreu contaminação, com mais de 70% de suas gemas afetadas. A maior contaminação das gemas da região inferior foi comum a diversos materiais. Sabe-se que, no campo, essa região do caule do abacaxi encontra-se praticamente enterrada no solo, proporcionando maior acesso aos microrganismos que podem ser mais difíceis de remover com o procedimento de desinfestação utilizado neste trabalho. No caso de *A. macrodontes*, os elevados índices de contaminação podem ser explicados pelo fato de sua propagação ser por estolões, um caule lateral capaz de formar vegetativamente outras plantas e que é subterrâneo. Silveira et al. (2006), estabelecendo 17 acessos de abacaxizeiro silvestre por gemas axilares, observaram altas taxas de contaminação, variando de 16 a 100%, principalmente nas variedades botânicas *A. comosus* var. *ananassoides* e em *A. macrodontes*.

Pereira et al. (2006), ao estabelecer explantes de bromeliáceas com vistas à micropropagação, também encontraram elevadas taxas de contaminações para *A. macrodontes*, optando por sua introdução via sementes e utilizando as plântulas *in vitro* como material de partida. Inocularam 32 sementes, obtendo 87,5% de sementes germinadas, em aproximadamente 30 dias. Essa pode ser uma alternativa interessante a ser usada para o estabelecimento *in vitro* desse material.

Outro aspecto que pode ser considerado em relação às gemas da região inferior é o fato de serem mais velhas e o tecido que as circunda ser mais lignificado e, portanto, apresentar maior resistência à penetração do agente descontaminante. Tornar mais eficiente a quebra da tensão superficial do tecido, que é feita pela imersão em álcool por poucos minutos antes da desinfestação, pode ser uma alternativa de melhorar os resultados. Com exceção do *A. comosus* var.

ananassoides, a medida que se distanciam da base do caule a porcentagem de gemas contaminadas diminui (Tabela 2). Os menores índices de contaminação foram registrados em *A. comosus* var. *bracteatus* com apenas 14% de suas gemas contaminadas, que se encontram na região inferior do caule.

Tabela 2. Porcentagens e médias de gemas contaminadas em cada região do caule de diferentes variedades/ espécies do gênero *Ananas*

Variedades/ Espécie	Região do caule		
	Inferior	Mediana	Superior
<i>A. macrodontes</i>	74,36 (2,64) aA	39,39 (2,36) aA	9,80 (0,45) aB
<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	31,43 (1,00) bA	17,31 (0,82) bA	33,33 (1,09) aA
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	14,58 (0,64) bA	0 (0) bA	1,59 (0,09) aA
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	40,54 (1,36) bA	19,70 (1,18) bA	6,52 (0,27) aA
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	68,42 (1,44) bAB	42,47 (3,44) aA	20,83 (1,11) aB
<i>A. comosus</i> var. <i>paraguayensis</i>	26,67 (0,72) bA	8,93 (0,45) bA	2,63 (0,09) aA

* Letras minúsculas comparam diferentes materiais dentro de cada região, nas colunas, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Letras maiúsculas comparam diferentes regiões do caule dentro de cada material, nas linhas, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os números entre parênteses são as médias de gemas contaminadas em cada região do caule.

A fase de estabelecimento é determinante para o sucesso de todo o processo. É nesta fase que se deve determinar as condições mais favoráveis para induzir a competência celular, que pode ser definida como o potencial de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação (FÉHER et al., 2003). Fatores relacionados à condição fisiológica do explante, às características da espécie e condições experimentais, como a composição do meio de cultura e a atmosfera no interior dos frascos durante o cultivo podem ser fundamentais para o estabelecimento da competência e recepção dos sinais para desencadear a resposta morfogênica por meio do processo de diferenciação celular.

Nas condições determinadas por esse trabalho, não foi possível obter essa indução de competência para *A. macrodontes*, que teve o estabelecimento *in vitro* influenciado pela contaminação.

Com relação ao intumescimento das gemas, houve influência das variedades botânicas sobre as médias de gemas intumescidas e plantas formadas durante a fase de estabelecimento *in vitro* (Anexos C, D). *A. comosus* var.

bracteatus, *A. comosus* var. *erectifolius* e *A. comosus* var. *comosus* apresentaram maior resposta morfogênica nesta fase com maiores números de gemas intumescidas e plantas formadas que *A. comosus* var. *paraguayensis*, *A. comosus* var. *ananassoides* e *A. macrodontes* (Tabela 3). Vários fatores podem influenciar essa resposta, como idade da planta, condição fitossanitária etc. Neste estudo, ainda que se tenha buscado padronizar ao máximo as plantas usadas, considerando, principalmente a idade e a sanidade do material de partida, vale destacar que as plantas já apresentam diferenças desde as condições de campo. *A. macrodontes*, por ser uma outra espécie do gênero *Ananas*, difere dos outros acessos, o que pode ter influenciado neste resultado (SOUZA et al., 2007). Na Figura 2 é possível observar que gemas desta variedade, além das contaminações, apresentaram problemas de oxidação dos tecidos e sequer chegaram a intumescer. O intumescimento das gemas é a primeira resposta ao meio de cultivo utilizado e configura o início do desenvolvimento morfogênico *in vitro*. As variedades que apresentaram os melhores resultados nesta fase proporcionaram posteriormente os melhores resultados quanto ao número de plantas obtido (Figura 2).

Nesta etapa inicial a porcentagem de plantas formadas é ainda baixa, comparando-se com o intumescimento das gemas, o que é esperado para abacaxi. O processo de intumescimento das gemas e formação das primeiras plantas em abacaxi, em meio sólido, é variável podendo dar-se entre 30 e 90 dias (SOUZA et al. 2013), o que pode explicar as diferenças observadas entre os materiais, já que essa primeira avaliação foi realizada aos 45 dias de cultivo.

Tabela 3. Porcentagens e médias de gemas intumescidas e plantas formadas por material estabelecido *in vitro*.

Variedades/ Espécie	Intumescidas	Plantas
<i>A. macrodontes</i>	5,13 (0,24) c	1,28 (0,06) b
<i>A. comosus</i> . var. <i>ananassoides</i>	7,32 (0,27) c	7,32 (0,27) b
<i>A. comosus</i> . var. <i>bracteatus</i>	41,44 (2,27) a	19,34 (1,06) a
<i>A. comosus</i> . var. <i>comosus</i>	22,82 (1,03) b	17,45 (0,79) a
<i>A. comosus</i> . var. <i>erectifolius</i>	35,71 (1,85) a	12,14 (0,63) a
<i>A. comosus</i> . var. <i>paraguayensis</i>	12,90 (0,48) c	3,23 (0,12) b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os números entre parênteses são as médias de gemas intumescidas e plantas formadas.

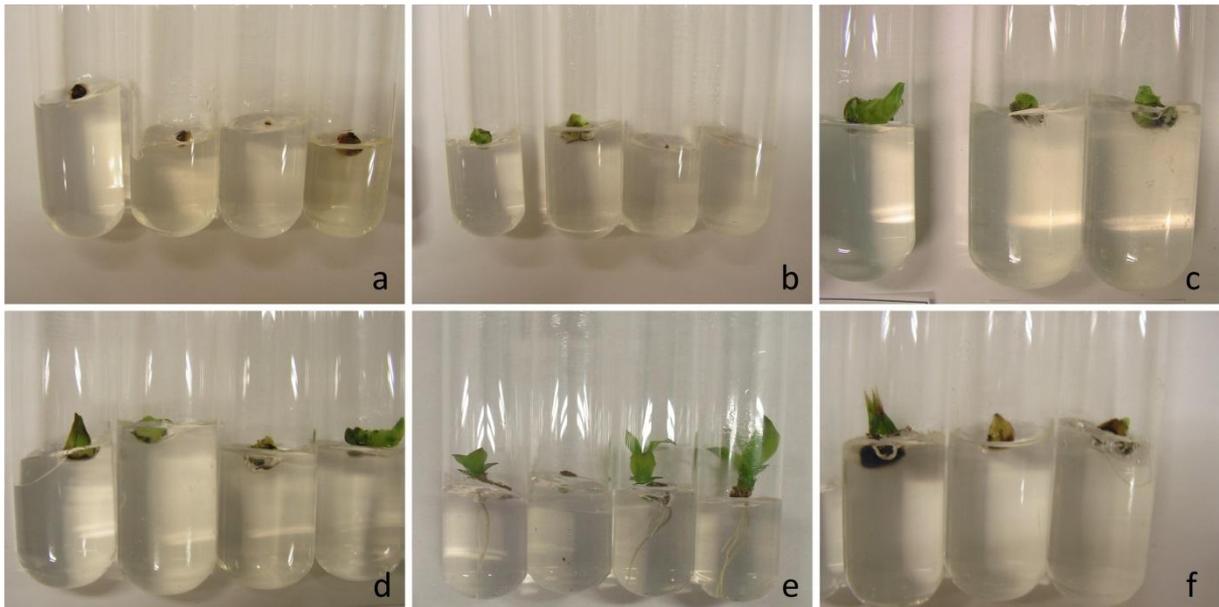


Figura 2. Gemas após 45 dias de estabelecidas *in vitro* nas diferentes variedades botânicas e espécie. a) *A. macrodentes*; b) *A. comosus* var. *ananassoides*; c) *A. comosus* var. *bracteatus*; d) *A. comosus* var. *comosus*; e) *A. comosus* var. *erectifolius*; f) *A. comosus* var. *parguazensis*.

A região do caule influenciou o intumescimento das gemas e a posterior formação e desenvolvimento das plantas (Anexos C, D). As regiões mediana e superior apresentaram os melhores resultados em termos de gemas intumescidas e plantas formadas em comparação com a região inferior, tornando-se mais adequadas para o estabelecimento *in vitro* destas variedades (Tabela 4; Figura 3).

Tabela 4. Porcentagens e médias de gemas intumescidas e plantas formadas por região do caule durante o estabelecimento *in vitro*.

Variedades/ Espécie	Intumescidas	Plantas
Superior	28,37 (1,25) a	13,83 (0,61) a
Mediana	23,76 (1,42) a	10,44 (0,63) a
Inferior	10,10 (0,33) b	6,73 (0,22) b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os números entre parênteses são as médias de gemas intumescidas e plantas formadas.

Mais uma vez, a idade das gemas pode ser uma explicação, já que as gemas da região inferior são formadas primeiro, e por serem mais antigas que as gemas das regiões mediana e superior, podem apresentar uma aparência mais lenhosa, o que influencia na liberação de compostos fenólicos por estes tecidos na fase de estabelecimento, além de poder dificultar a absorção dos nutrientes do meio

de cultivo. A liberação de compostos fenólicos é um dos problemas que podem ocorrer na fase de estabelecimento, tornando o meio tóxico para o explante e impedindo seu desenvolvimento, enquanto a absorção de nutrientes nesta etapa pode ser o fator determinante para o melhor desenvolvimento das gemas. Não existe, para abacaxi, registros destas taxas de absorção *in vitro* em diferentes etapas. Em trabalho realizado a fim de medir a absorção de macronutrientes no estabelecimento *in vitro* de bananeiras, Diniz e Alves (1999) observaram que as maiores taxas de absorção de todos os nutrientes foram registradas nos 20 primeiros dias de cultivo.



Figura 3. Gemas após 45 dias de estabelecidas *in vitro* nas diferentes regiões do caule. a) região superior; b) região mediana; c) região inferior.

Gemas da Coroa

A contaminação em gemas de coroa foi menor do que as registradas em gemas do caule. Por outro lado, o desempenho de *A. comosus* var. *bracteatus* quanto ao número de gemas intumescidas e de plantas formadas foi superior ao das outras duas variedades, confirmando um melhor potencial morfogênético, como observado com as gemas do caule (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagens e médias do total de gemas, gemas contaminadas, gemas intumescidas e plantas formadas por variedade botânica no ensaio de estabelecimento de gemas de coroa.

Variedades	Total	Contaminadas	Intumescidas	Plantas
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	17,00 a	5,88 (1,00) a	35,29 (6,00) a	51,47 (8,75) a
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	11,25 a	6,67 (0,75) a	20,00 (2,25) b	11,11 (1,25) b
<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	7,33 a	0 (0) a	4,55 (0,33) b	4,55 (0,33) b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os números entre parênteses são as médias de cada variável por coroa.

O uso de gemas de coroa, principalmente considerando materiais oriundos do BAG em campo, é recomendado, já que dessa forma não há necessidade de se usar uma planta inteira do acesso. Vários acessos introduzidos no BAG *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram introduzidos por meio de gemas de coroa.

Também usando gemas de coroa, os acessos de *A. comosus* var. *bracteatus* apresentaram os melhores resultados, com maior número de plantas formadas ao final da etapa de estabelecimento.

Os acessos desta variedade em condições de campo apresentam porte superior as demais variedades e com grande número de perfilhamentos (SOUZA et al., 2012) o que pode estar relacionado também ao bom desempenho *in vitro*. Não houve confirmação sobre a maior aptidão morfogenética de *A. comosus* var. *comosus*, já que esta apresentou desempenho estatisticamente igual ao de *A. comosus* var. *ananassoides*.

Não obstante tenha havido diferença significativa entre *A. comosus* var. *bracteatus* e as demais variedades botânicas, não foi observada diferença significativa com relação à variável número total de gemas, muito embora a diferença absoluta entre as médias de *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *ananassoides* seja de quase 10 gemas (Anexos E-H). Isso ocorreu porque, por meio da ferramenta estatística utilizada, a DMS (diferença mínima significativa) ficou em 9,93, colocando essas médias nos extremos do aceitável para a igualdade. Esse tipo de resultado levanta o questionamento sobre a pertinência deste tipo de análise para trabalhos dessa natureza. Alguns trabalhos de cultura de tecidos já buscam adequar ferramentas estatísticas às peculiaridades deste tipo de ensaio para garantir a

obtenção de análises que correspondam melhor à realidade dos resultados (SILVA, 2013; SILVA, 2014).

Diversos tipos de explantes têm sido utilizados no estabelecimento *in vitro* das mais variadas espécies, como por exemplo: segmentos nodais em purga de lagarto (*Jatropha elliptica*) (CAMPOS et al., 2007), aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) (PAIVA; ALOUFA, 2009), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) (COSTA et al., 2007) e oliveira (*Olea europaea* L.) (DONINI et al., 2008); gemas provenientes de brotos com crescimento ativo em porta-enxertos de *Prunus* (SILVA et al., 2003); microestacas contendo gemas axilares ou gema apical em maracujazeiro (*Passiflora* sp.) (FARIA et al., 2007); meristemas em bananeira (*Musa* sp.) (PEREIRA et al., 2011); plântulas assépticas em angico-vermelho (*Parapiptadenia rígida*) (KIELSE et al., 2009); ápices meristemáticos e segmentos nodais em porta-enxertos de videira (*Vitis vinífera* L.) (BIASI et al., 1998); ápices caulinares em helicônia (*Heliconia rauliniana*) (RODRIGUES, 2005); e meristemas e gemas em pereira (*Pyrus* spp.) (ERIG; FORTES, 2002).

Os relatos disponíveis sobre estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro envolvem a utilização das gemas axilares como explantes iniciais, sendo o meio nutritivo utilizado o MS suplementado com sacarose e concentrações variáveis dos reguladores de crescimento BAP e ANA (ALMEIDA et al., 2002; BARBOZA et al., 2004; MORAES et al., 2010; PASQUAL et al., 2008; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2012). No entanto, há poucos relatos de estudos específicos visando avaliar a fase de estabelecimento, especialmente quando se trata de acessos silvestres de abacaxizeiro.

Fase de Multiplicação

A multiplicação *in vitro* foi possível com todas as variedades botânicas de *A. comosus*, porém não com *A. macrodontes*, uma vez que todas as gemas dessa espécie foram perdidas por contaminação, oxidação ou ausência de desenvolvimento (Tabela 6). As diferenças observadas confirmam o efeito do genótipo sobre a morfogênese *in vitro*. Poucos são os trabalhos de micropropagação de abacaxizeiros com variedades silvestres, ainda que os poucos que existem confirmam esse comportamento .

Considerando a região doadora do explante, o maior número de plantas foi obtido a partir de gemas da região mediana e superior para todas as variedades, alcançando-se mais de 2.000 plantas em cada uma dessas regiões em *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *erectifolius* ao final dos quatro subcultivos (Figura 4)..

Ocorreu contaminação por bactérias em acessos de *A. comosus* var. *ananassoides* e *A. comosus* var. *paraguayensis*, especialmente no primeiro subcultivo, levando a uma diminuição do número de explantes disponíveis. O aparecimento tardio de bactérias na fase de multiplicação depois dos 45 dias da fase de estabelecimento levanta a hipótese de que as bactérias que se manifestaram no meio nutritivo são microrganismos que podem estar vivendo em relação de simbiose com o abacaxi, na forma endofítica (ABREU-TARAZI, 2010).

Na Tabela 6 se encontram os valores da taxa de crescimento geométrico, expresso em porcentagem, assim como, o número de plantas obtido em cada subcultivo. Os valores negativos devem-se às contaminações citadas acima e que afetaram a produção final de plantas para esses materiais.

O crescimento geométrico é usado normalmente para medir populações, pois quanto mais organismos estiverem se reproduzindo, maior será a quantidade, mas a porcentagem de crescimento provavelmente se manterá estável. A adaptação deste princípio à micropropagação parece interessante, revela um dado mais consistente e gera uma informação de aplicação prática no que se refere ao potencial propagativo do que está sendo multiplicado.

Os *A. comosus* var. *ananassoides* e *A. comosus* var. *paraguayensis* apresentaram, de forma geral, as menores taxas de crescimento geométrico, em comparação com as demais variedades botânicas, sugerindo que as condições de cultivo utilizadas no trabalho não são as mais adequadas para esses materiais.

Os resultados obtidos com *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *erectifolius* evidenciam um melhor potencial propagativo, não apenas pelo número de plantas obtidas ao final, mas principalmente por taxas de crescimento geométrico menos variáveis ao longo dos subcultivos, considerando as plantas advindas das regiões mediana e superior. Ambas as variedades possuem potencial ornamental e são usadas nas hibridações voltadas para essa finalidade (SOUZA et al., 2014).

Santos (2008), trabalhando com brotações adventícias de um genótipo ornamental de *A. comosus* var. *bracteatus*, encontraram resultados satisfatórios aos 120 dias de cultivo em meio de cultura com uma concentração de 1,2 mg L⁻¹ de BAP. A concentração usada neste trabalho, 0,5 mg L⁻¹ de BAP, foi eficiente para a produção de um elevado número de plantas em período de tempo similar

Cunha et al. (2006), estudando a multiplicação *in vitro* de abaxizeiro ornamental, observaram que a variedade *A. comosus* var. *bracteatus* apresentou altas taxas de multiplicação em comparação às demais variedades botânicas, em consonância com os dados relatados neste trabalho

Na literatura disponível, a micropropagação de abacaxizeiro foi alcançada com meios nutritivos suplementados com concentrações de BAP bem mais altas que 0,5 mg L⁻¹. Pasqual et al. (2008) promoveram a multiplicação *in vitro* em um acesso de *A. comosus* var. *erectifolius* utilizando meio MS líquido suplementado com BAP 1,5 mg L⁻¹. Moraes et al. (2010) realizaram a multiplicação *in vitro* da cv. Emepa 1 (*A. comosus* var. *comosus*), tendo concluído que o meio nutritivo mais adequado foi MS suplementado com BAP 2,0 mg L⁻¹ e ANA 0,5 mg L⁻¹. Almeida et al. (2002) concluíram que o meio MS suplementado com BAP 1,5 mg L⁻¹ promoveu a melhor resposta para o número de brotações durante a multiplicação *in vitro* da cv. Pérola (*A. comosus* var. *comosus*). Dentre estes trabalhos, chamam a atenção os resultados registrados por Moraes et al. (2010), que conseguiram uma taxa média de 10,4 brotos por explante durante o subcultivo, utilizando BAP como regulador de crescimento, na concentração de 1,5 mg L⁻¹..

Embora uma elevada concentração de reguladores de crescimento possa proporcionar maior número de brotações, ela também está associada à maior ocorrência de variação somaclonal, levando à obtenção de material heterogêneo indesejável para comercialização (BAIRU et al., 2011). Por esse motivo, é recomendada cautela na escolha da concentração de reguladores de crescimento a ser utilizada.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que é factível o estabelecimento *in vitro* de variedades silvestres de abacaxizeiro.

Tabela 6. Taxas de crescimento geométrico (%) e número de brotos em cada subcultivo (entre parênteses) durante a multiplicação *in vitro* de plantas (explantes) oriundas da fase de estabelecimento *in vitro*, considerando a região do caule de onde foi extraída a gema que deu origem ao explante.

Variedades	Região do Caule	Nº Inicial de Explantes	1º Subcultivo	2º Subcultivo	3º Subcultivo	4º Subcultivo
<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	Inferior	Nenhum	-	-	-	-
	Mediana	(5)	-1,13 (3)	0 (3)	1,14 (5)	1,05 (8)
	Superior	(7)	-0,74 (5)	1,77 (11)	1,75 (24)	1,64 (50)
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	Inferior	(11)	0,97 (17)	1,80 (38)	2,59 (120)	2,74 (405)
	Mediana	(28)	2,91 (102)	1,71 (219)	2,51 (668)	3,00 (2530)
	Superior	(23)	2,78 (79)	2,13 (204)	2,48 (615)	3,38 (2739)
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Inferior	(8)	3,40 (36)	1,52 (71)	2,85 (251)	2,74 (846)
	Mediana	(17)	1,92 (40)	1,25 (70)	2,30 (195)	1,69 (415)
	Superior	(24)	1,69 (51)	2,12 (131)	2,58 (412)	3,23 (1721)
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	Inferior	(2)	2,82 (7)	2,78 (24)	2,06 (60)	1,82 (135)
	Mediana	(30)	2,67 (98)	2,41 (286)	2,10 (728)	2,80 (2524)
	Superior	(35)	2,47 (105)	2,36 (300)	2,00 (730)	2,89 (2630)
<i>A. comosus</i> var. <i>parguazensis</i>	Inferior	Nenhum	-	-	-	-
	Mediana	(12)	-0,90 (8)	1,41 (15)	1,63 (31)	2,42 (91)
	Superior	(7)	1,01 (11)	1,45 (21)	1,50 (41)	2,11 (105)

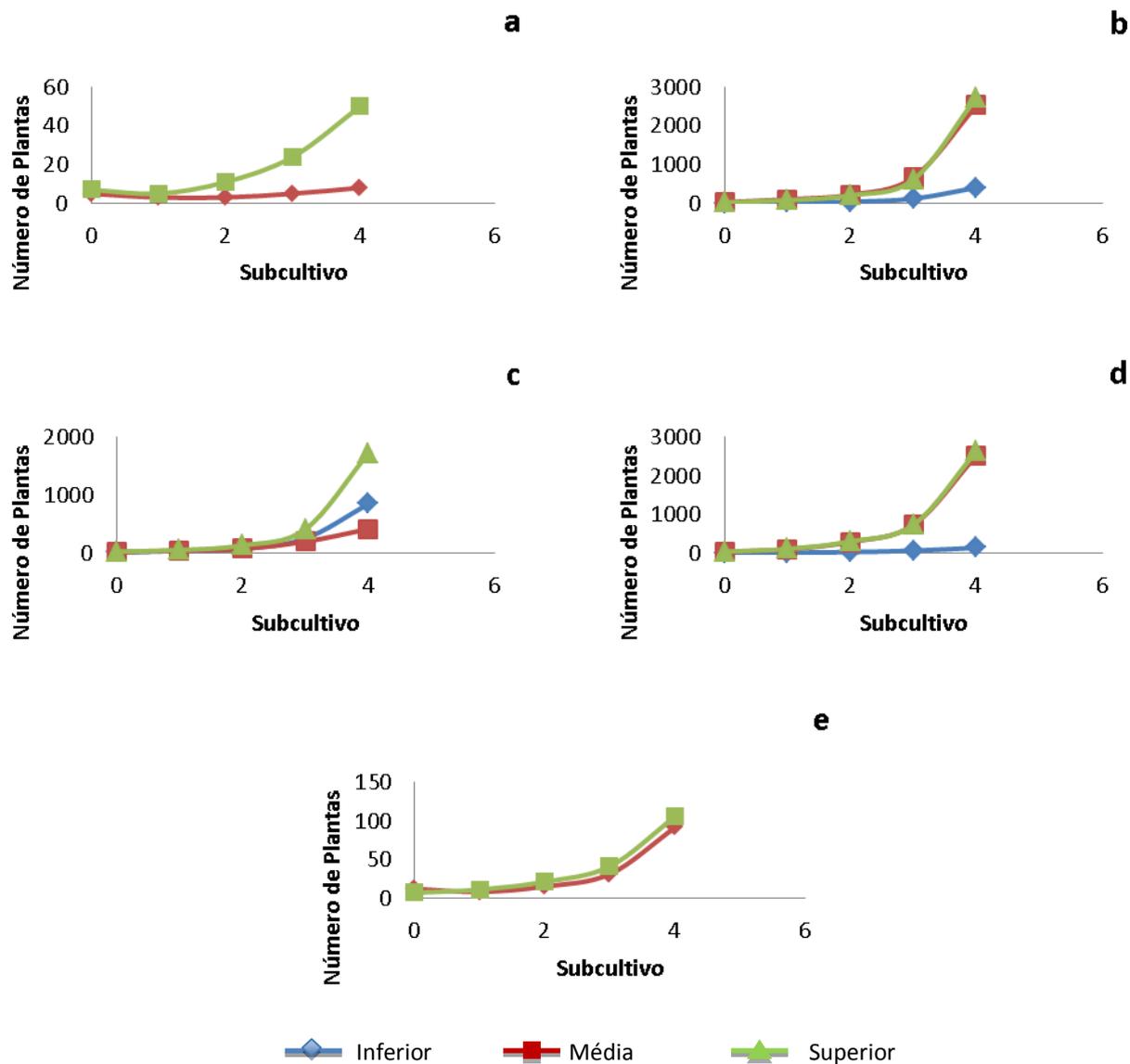


Figura 4. Número de plantas nos diferentes subcultivos, região das gemas e variedades botânicas de *Ananas comosus*. a) *A. comosus* var. *ananassoides*; b) *A. comosus* var. *bracteatus*; c) *A. comosus* var. *comosus*; d) *A. comosus* var. *erectifolius*; e) *A. comosus* var. *parguazensis*.

CONCLUSÕES

- O método proposto neste trabalho foi eficiente para promover o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* de todas as variedades botânicas de *A. comosus*, mas não de *A. macrodontes*;
- Plantas de *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *comosus* e *A. comosus* var. *erectifolius* apresentam as melhores respostas morfogênicas durante o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* nas condições desse estudo, utilizando gemas provenientes do caule;
- Gemas da região mediana e superior possuem melhor potencial propagativo;
- Gemas advindas de coroa apresentaram menor contaminação do que as do caule, e promoveram bons resultados para *A. comosus* var. *bracteatus* na fase de estabelecimento e são uma opção para a introdução de novos acessos do BAG em campo na conservação *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M. F. Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia. Tese de Doutorado (Universidade de São Paulo), 2010.
- AGRAWAL, A.; SANAYAIMA, R.; TANDON, R.; TYAGI, R. K. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 703-711, 2010.
- ALMEIDA, W. A. B.; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 296-300, 2002.
- ARAÚJO, R. F.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro 'SmoothCayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Revista Ceres**, v. 55, p. 455-460, 2008.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, v. 63, p. 147-173, 2011.
- BAKER, K.; COLLINS, J. L. Notes on the distribution and ecology of *Ananas* and *Pseudananas* in South America. **American Journal of Botany**, St. Louis, n. 26, pp. 697-702, 1939.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, pp. 725-733, 2004.
- BE, L. V.; DEBERGH, P. C. Potential low cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). **South African Journal of Botany**, v. 72, pp. 191-194, 2006.
- BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agricola**, v. 55, p. XX, 1998.
- CABRAL, J. R. S.; FERREIRA, F. R.; SOUZA, F. V. D.; MACHADO, C. F. Banco ativo de germoplasma de abacaxi. In: II Simpósio brasileiro de recursos genéticos, v. 1, p. 299, 2008.
- CAMPOS, R. A. S.; AÑEZ, L. M. M.; DOMBROSKI, J. L. D.; DIGNART, S. L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 9, p. 30-36, 2007.
- CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, pp. 717-720, 2004.
- CARVALHO, A. C. P. P. de ; PINHEIRO, M. V. M. ; DIAS, G.M.G. ; MORAIS, João Paulo Saraiva . Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira (Impresso) JCR**, v. 27, p. 103-108, 2009.

- COPPENS D'EECKEMBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Eds.): **The pineapple: botany, production and uses**. New York, CABI Publishing, pp. 13-32, 2003.
- COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. *Horticultura Brasileira*, v. 25, p. 68-72, 2007.
- CUNHA, E. C.; SOUZA, F. V. D.; SILVEIRA, D. G.; SOUZA, A. S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio – RJ.
- DANSO, K. E.; AYEYEH, K. O.; ODURO, V.; AMITEYE, S.; AMOATEY, H. M. Effect of 6-Benzylaminopurine and Naphthalene Acetic Acid on In Vitro Production of MD2 Pineapple Planting Materials. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, p. 614-619, 2008.
- DIAS, G.M.G.; CARVALHO, A. C. P. P. de; PINHEIRO, M. V. M.; MORAIS, João Paulo Saraiva . Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 04, p. 01-07, 2008.
- DINIZ, J. D. N.; ALVES, A. N. G. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34 , p. 1201-1209, 1999.
- DONINI, L. P.; WCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; SOARES, G. C. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1769-1772, 2008.
- ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. **Current Research Progress and Application**. JIRCAS, Tsukuba, Japan/IPGRI, Rome, Italy, pp. 8-20, 2000.
- ERIG, A. C.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, v. 32, p. 577-582, 2002.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; LEDO, C. A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; CUNHA, M. A. P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, v. 66, pp. 535-543, 2007.
- FÉHER, A.; PASTERNAK, T. A.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Pineapple Germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, Honolulu, v. 334, pp. 23-26, 1993.
- FIROOZABADY, E.; MOY, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 67–74, 2004.

- HOSSAIN, A. B. M. S.; SALEH, A. A.; AISHAH, S.; BOYCE, A. N.; CHOWDHURY, P. P.; NAQUIDDIN, M. Bioethanol Production from Agricultural Waste Biomass as a Renewable Bioenergy Resource in Biomaterials. **IFMBE Proceedings**, v. 21, parte 3, p. 300-305, 2008.
- KIELSE, P.; FRANCO, E. T.H.; PARANHOS, J. T.; LIMA, A. P. S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. *Ciência Rural*, v. 39, p. 1088-1094, 2009.
- LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 227-238, 2009
- LUTHER. H. E. An alphabetical list of Bromeliad binomials. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society International, 2012.
- MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; BRUNO, R. L. A.; FILHO, J. C.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 1. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 932-936, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised médium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology*, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NIINO, T.; SAKAI, A.; YAKUWA, H.; NOJIRI, K. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, pp. 261-266, 1992.
- PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, pp. 300-304, 2009.
- PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 26, pp. 45-49, 2008.
- PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande Naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. Especial, pp. 222-226, 2011.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, pp. 417-420, 2001.
- PEREIRA, J. E. S.; FRANÇA, R. B.; DANTAS, A. C. M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 23, pp. 86-89, 2005.
- PEREIRA, E. O.; NOGUEIRA, E. U.; SOUZA, M. F.; CAETANO, S. P.; LIMA, A. B. P. Desenvolvimento de protocolos para micropropagação de espécies de *Bromeliaceae*. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Revista Univasp S. J. dos Campos, SP, v. 13, n. 24, Anais, 2006.

PIERIK, R. L. M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madri: Mundi Prensa, 326 p. 1990.

RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia raulinianai*. **Scientia Agricola**, v. 62, pp. 69-71, 2005.

SAN-JOSÉ, M. C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Factors affecting "in vitro" propagation of *Quercus robys* L. **Tree Physiology**, v. 4, pp. 281-290, 1988.

SANTOS, A. S. A.; MACHADO, I. S.; LEÃO, A. L.; RAMOS, A. A. Concentrações de BAP e TDZ na Propagação *In Vitro* de Curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 35, pp. 62-65, 2000.

SANTOS, M. T. **Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro***. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Dissertação de Mestrado. 51 p. 2008.

SAS Institute. SAS Statistical Software: Release 9.2, Cary, NC: **SAS Institute**, 2008.

SILVA, A. L.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, pp. 297-300, 2003.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, pp. 1257-1260, 2007.

SILVA, R. L. Viabilidade, limpeza viral e estabilidade genética de plantas de abacaxizeiro oriundas da conservação *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2014.

SILVA, M. J. Adequação da condição de crescimento mínimo para a conservação *in vitro* de germoplasma de citros. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2013.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; CUNHA, E. C.; SOUZA, A. S. Produção *in vitro* de mudas de abacaxi silvestre de valor ornamental. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, Cabo Frio – RJ. XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, p. 367, 2006.

SOUZA, F. V. D.; SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; CARDOSO, J. L.; BENJAMIN, D. A. Slow-growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **ISHS Acta Horticulturae**, n.º 702, pp. 41-47, 2005.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; BENJAMIN, D. A. Behavior of wild pineapple genotypes under *in vitro* conservation. Pineapple News. Newsletter of the pineapple working group, International **Society for Horticultural Science**, n.º 13, pp. 10-12, 2006.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; SANTOS, O. N.; SEREJO, J. S.; FERREIRA, F. R. Caracterização morfológica de abacaxizeiros ornamentais. **Magistra**, v. 19, p. 319-325, 2007.

SOUZA, E. H. **Pré-Melhoramento e Avaliação de Híbridos de Abacaxi e Banana para Fins Ornamentais**. Dissertação de Mestrado. Cruz das Almas, UFRB. 2010.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; COSTA JÚNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, pp. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J.. Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. In: Tatiana Góes Junghans; Antônio da Silva Souza. (Org.). Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. 2ed. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2013, v. 1, p. 189-218.

SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. Selection and use recommendation in hybrids of ornamental pineapple. *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, p. 409-416, 2014.

StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com. 2005.

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; CAETANO, L. C. S. 'Vitória' Pineapple: Fusariose Resistent Cultivar. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, p. 931-1233, 2009.

VIDAL, A. M.; SANTOS, K. C. F.; CARVALHO, M. J. S.; CONCEIÇÃO, J. P. S.; SOUZA, A. S.; MENEZES, M. C. Influência da posição de cultivo da microestaca na micropropagação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: **XV Congresso Brasileiro de Mandioca**. Salvador, Bahia, 2013.

CAPÍTULO 2

CRIOPRESERVAÇÃO DE ACESSOS SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO

CRIOPRESERVAÇÃO DE VARIEDADES SILVESTRES DE ABACAXIZEIRO

Resumo

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merr] é propagado vegetativamente e a criopreservação é uma alternativa segura e econômica para a conservação do germoplasma de espécies de propagação vegetativa a longo prazo. Os objetivos desse trabalho foram adequar um protocolo de criopreservação pela técnica de “*droplet vitrification*” a fim de consolidar a conservação de germoplasma de variedades silvestres de abacaxi e estabelecer uma duplicata de segurança. Foram utilizadas plantas *in vitro* do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura pertencentes aos seguintes acessos: BGA 471 (*A. comosus* var. *ananassoides*), BGA 128 (*A. comosus* var. *bracteatus*) e BGA 739 (*A. comosus* var. *erectifolius*). Ápices caulinares com dimensões de 1 mm foram extraídos de plantas *in vitro* de cada um dos acessos e cultivados em placas de Petri contendo meio de pré-cultivo (MS + 0,3 mol L⁻¹ de sacarose) por 48 horas. Após o período de pré-cultivo, os ápices caulinares foram transferidos para lâminas de alumínio contendo gotas de solução de vitrificação (PVS2) e tratados por 30, 45 e 60 minutos de exposição. Para o congelamento, as lâminas contendo os ápices foram colocadas em criotubos que foram imersos em nitrogênio líquido por 24 horas. Para o descongelamento, os ápices foram colocados em solução de lavagem (MS + sacarose 1 mol L⁻¹) por 20 minutos antes de serem inoculados no meio de regeneração (MS + sacarose 30 g L⁻¹ + BAP 0,5 mg L⁻¹ + ANA 0,2 mg L⁻¹). As maiores taxas de sobrevivência após o nitrogênio líquido foram de 53,33 % para o BGA 128, 63,33 % para o BGA 739 e 43,33 % para o BGA 471. Os tempos de exposição que proporcionaram as maiores taxas de sobrevivência foram 60 minutos para os acessos BGA 471 e BGA 128 e 45 minutos para o acesso BGA 739. A eficiência do método foi comprovada pela manutenção das taxas máximas de regeneração em torno de 50 % para todos os acessos.

Palavras-chave: Banco Ativo de Germoplasma; conservação *in vitro*; cultura de tecidos; PVS2.

CRYOPRESERVATION OF WILD VARIETIES OF PINEAPPLE

ABSTRACT

Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr] is propagated vegetatively and cryopreservation is a safe and economical alternative available for long-term conservation of vegetatively propagated species. The aim of this work was to evaluate a protocol for cryopreservation by droplet vitrification technique to consolidate the germplasm conservation of pineapple wild varieties and to establish a security copy. *In vitro* plants from the Pineapple Active Genebank at Embrapa Cassava and Fruits belonging to the following accessions were used: BGA 471 (*A. comosus* var. *ananassoides*); BGA 128 (*A. comosus* var. *bracteatus*), and BGA 739 (*A. comosus* var. *erectifolius*). Shoot tips with 1 mm were extracted from *in vitro* plants of each accession and cultivated in Petri dishes containing pre-culture medium (MS + 0,3 mol L⁻¹ of sucrose). After this step the shoot tips were transferred into aluminum foils containing drops of vitrification solution (PVS2) and treated for 30, 45 and 60 minutes of exposure to that solution. For freezing, the tips were immersed in liquid nitrogen for 24 hours and for thawing, they were placed in rinsing solution (MS + 1 mol L⁻¹ sucrose) for 20 min before the cultivation into the regeneration medium (MS + sucrose 30 g L⁻¹ + BAP 0,5 mg L⁻¹ + ANA 0,2 mg L⁻¹). Maximum rates of regeneration after liquid nitrogen were 53.33 % for BGA 128, 63,33 % for BGA 739 and 43.33 % for BGA 471. The best results were obtained with 60 minutes of exposure time for BGA 471 and BGA 128 and 45 minutes for BGA 739. The consistency of the method was demonstrated by the maintenance of maximum regeneration rates around 50 % for all accessions.

Keywords: Active Genebank; *in vitro* conservation; PVS2; tissue culture.

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] é uma fruteira tropical muito apreciada e cultivada em vários países tropicais e subtropicais. Seu centro de origem está na Amazônia, que abriga a maior variabilidade genética do gênero (BAKER; COLLINS, 1939; FERREIRA; CABRAL, 1993; SOUZA et al., 2012). A intervenção humana e a tendência ao monocultivo têm provocado grande erosão genética no gênero *Ananas*, deixando evidente a necessidade de ações urgentes voltadas para a conservação de germoplasma (REED et al., 2011; SOUZA et al., 2005).

No entanto, o abacaxizeiro produz sementes altamente heterozigotas, de interesse limitado para a conservação de combinações genéticas específicas. Possui propagação prioritariamente vegetativa e seu germoplasma é normalmente armazenado em coleções de campo. Essa alternativa de conservação *ex situ*, na qual o material biológico encontra-se suscetível a dano físico, desastres naturais e pragas, além de necessitar de árduo trabalho para manutenção, tem um custo elevado para a conservação (D'EECKENBRUGGE et al., 2010).

Técnicas a partir do cultivo *in vitro* de tecidos vegetais voltadas para a conservação de germoplasma têm sido desenvolvidas e aplicadas em diferentes espécies de plantas, incluindo o abacaxizeiro (GASPAR et al., 1996; JAIN, 2001; LAMBARDI; CARLO, 2003; SOUZA et al., 2005; RAI et al., 2011). Diferentes métodos de conservação *in vitro* são empregados, de acordo com as peculiaridades de cada espécie, assim como da estratégia a ser adotada, de curto, médio ou de longo prazo.

O estabelecimento de bancos *in vitro* está voltado para a conservação a curto e médio prazo e a estratégia mais utilizada nesta abordagem é o cultivo das plantas sob crescimento lento pela desaceleração de seu metabolismo (TYAGI; PRAKASH, 2004; SHARMA et al., 2007). A conservação em condições de crescimento lento envolve procedimentos que permitem a manutenção de plantas *in vitro* em condições assépticas com baixa frequência de subcultivos periódicos, sem que sua viabilidade e capacidade de crescimento sejam afetadas, proporcionando diminuição nos custos da conservação, no trabalho manual e no risco de contaminação (OZUDOGRU et al., 2010). A vantagem em relação aos bancos em condições de campo é a redução na demanda de espaço e maior segurança dos

acessos em relação a ocorrência de pragas e doenças, assim como outras intempéries.

Para preservação a longo prazo, a criopreservação, isto é, a conservação a temperaturas extremamente baixas, é um método eficaz que, apesar de ter sido registrado para diversas fruteiras, ainda necessita ajustes para aumentar sua eficiência (CHAUDHURY; MALIK, 2003; BENSON et al., 2007; WANG et al., 2009; MARTÍNEZ-MONTERO et al., 2012).

A criopreservação baseia-se na paralisação do metabolismo em nível celular à temperatura do nitrogênio (N₂) líquido (-196 °C), mantendo a integridade do material congelado, tornando essa forma de conservação muito atrativa (BENSON, 2008). Quando comparada com a conservação *in vitro* é menos laboriosa, de mais fácil gestão e possui menos riscos de variação somaclonal por não necessitar de subcultivos periódicos. Sob essa perspectiva, a criopreservação corresponde à alternativa mais segura e econômica para a conservação a longo prazo de recursos genéticos das espécies de propagação vegetativa e dentre elas, do germoplasma de abacaxi (ENGELMANN, 2000; LYNCH et al., 2007).

Os sistemas de criopreservação disponíveis atualmente podem ser resumidos nas seguintes técnicas: congelamento lento, encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação e a vitrificação em gotas (*droplet vitrification*) (SANTOS, 2000; PANIS et al., 2005; WANG et al., 2009).

A vitrificação compreende a indução química da transição da água para o estado vítreo, um estado semissólido e amorfo no qual ela apresenta alta viscosidade, porém sem que ocorra formação de cristais. Algumas vantagens desse método são a limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, a proteção contra mudanças no pH e a prevenção de colapso celular durante a perda da água, resultando na diminuição de reações químicas indesejáveis que poderiam levar à deterioração de seu conteúdo (BENSON et al., 2007).

A vitrificação em gotas (*droplet vitrification*) surgiu como alternativa à vitrificação simples, tendo como principal avanço a redução do tempo necessário para descongelamento, evitando o banho-maria e afetando positivamente a regeneração após a imersão em nitrogênio líquido (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Protocolos de vitrificação em gotas e encapsulamento-desidratação têm sido aplicados amplamente para criopreservar ápices caulinares e meristemas de um grande número de espécies que não requerem equipamento sofisticado para

congelamento, com altas taxas de regeneração para diversos materiais (ENGELMANN, 2011).

Entretanto em todas essas técnicas o descongelamento pode se tornar a etapa limitante, devido a desuniformidade e assincronia na liquefação cristais. Dessa forma, a rapidez e a eficiência nesta fase são determinantes para o sucesso final e garantia de sobrevivência após o congelamento.

Assim, o uso da técnica de vitrificação em gotas pode ser mais eficiente, visto que usa volumes muito pequenos da solução de PVS2, possibilitando um descongelamento ultrarrápido pela imersão dos ápices congelados em meio líquido rico em sacarose.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui a maior coleção de germoplasma de abacaxizeiro em campo do mundo, contando com mais de 600 acessos do gênero *Ananas* e espécies afins (SOUZA et al., 2012), incluindo genótipos de todas as variedades botânicas existentes na espécie *Ananas comosus* (*A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *erectifolius* e *A. comosus* var. *paraguayensis*) e da espécie *Ananas macrodentes* (CABRAL et al., 2008).

A partir de 2003, a fim de minimizar perdas decorrentes da conservação em campo e estabelecer uma duplicata de segurança, acessos conservados no campo foram estabelecidos *in vitro* (SOUZA et al., 2005). Entretanto, esse tipo de conservação torna-se laboriosa pela necessidade de subcultivos periódicos para a renovação das plantas. Na Embrapa esse BAG *in vitro* já conta com plantas conservadas em condições de crescimento lento há mais de 10 anos. Trabalho recente mostrou que as plantas se mantêm viáveis e com boas taxas de multiplicação (SILVA, 2014). Entretanto, apesar destes bons resultados, a gestão e a manutenção deste banco demanda atenção constante.

Em vista disso e pelo tamanho da coleção, a busca por outra alternativa de conservação que possa funcionar também como uma duplicata de segurança tem se tornado uma demanda nos últimos anos. Tentativas de criopreservação de abacaxi vêm sendo realizadas por cientistas de outros países (BENSON, 2008; GÁMEZ-PASTRANA et al., 2004; GONZÁLEZ-ARNAO et al., 1998).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de um método de vitrificação (*droplet vitrification*) para identificar as melhores condições de criopreservação para variedades silvestres de abacaxi.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Três acessos do BAG *in vitro* de abacaxizeiro foram utilizados para esse estudo: o BAG 471 (*A. comosus* var. *ananassoides*), o BAG 128 (*A. comosus* var. *bracteatus*), e o BAG 739 (*A. comosus* var. *erectifolius*). Os acessos foram introduzidos e multiplicados, de acordo com Souza et al. (2013) para se obter o número de plantas necessário para a realização do estudo.

Ápices caulinares das plantas *in vitro* foram excisados com aproximadamente 1 mm e usados como material biológico a ser criopreservado (Figura 1a-c).

Pré-cultivo dos ápices caulinares

Os ápices caulinares foram cultivados em placas de Petri contendo meio de pré-cultivo (Figura 1d) composto por sais e vitaminas do MS suplementados com sacarose $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e Phytigel® $2,4 \text{ g L}^{-1}$ e incubados por 48 horas em câmara de crescimento a $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Vitrificação em diferentes tempos de exposição ao PVS2

Após o período de pré-cultivo, os ápices caulinares foram transferidos em condições assépticas para lâminas de alumínio contendo cinco gotas de $6 \mu\text{L}$ de solução de vitrificação PVS2, sendo um ápice por gota, de tal forma que a gota cobrisse praticamente toda sua superfície (Figura 1e-f). Foram testados três tempos de exposição ao PVS2, a saber, 30, 45 e 60 minutos. Todas as etapas da vitrificação foram realizadas sobre o gelo, garantindo a temperatura próxima a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 1g).

Após os respectivos tempos de exposição, as lâminas contendo os ápices caulinares foram colocadas diretamente dentro do nitrogênio antes de serem introduzidas em criotubos de 2 mL, (Figura 1h) que foram então imersos no nitrogênio dentro do botijão criogênico e mantidos por 24 horas (Figura 1i).



Figura 1. Metodologia de vitrificação utilizada para criopreservação de ápices caulinares de abacaxizeiro. a-b) extração de ápices caulinares em plantas cultivadas *in vitro*; c) ápice caulinar com 1 mm de comprimento; d) incubação dos ápices caulinares em meio de pré-cultivo; e-f) aplicação de gotas do PVS2 em lâminas de alumínio; g) imersão dos ápices caulinares em gotas de solução de PVS2; h) introdução das lâminas de alumínio com os ápices caulinares em criotubos com nitrogênio líquido; i) armazenamento das amostras em tanque criogênico.

Descongelamento e regeneração

O descongelamento dos ápices foi realizado retirando-se as tiras dos criotubos e emergindo-as rapidamente em solução de lavagem, que se constitui de sais e vitaminas do MS suplementado com $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, por 20 minutos. Após esse procedimento os ápices foram cultivados em meio de regeneração composto por sais e vitaminas MS suplementado com sacarose 3,0 %, Phytigel @ $2,4 \text{ g L}^{-1}$, BAP $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e ANA $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e incubados em condições de sala de crescimento, como já descrito no item de pré-cultivo.

Foram realizadas avaliações aos 30 e 60 dias após o cultivo, tendo-se considerado como ápice sobrevivente ao nitrogênio líquido aquele que originou pelo menos uma planta. A taxa de sobrevivência foi calculada em porcentagem.

Delineamento experimental

Foram utilizados 70 ápices caulinares de cada acesso para a realização do experimento, considerando 10 ápices para cada etapa, incluindo os controles relativos a cada tempo de exposição e ao pré-cultivo. Foram considerados controles as placas contendo ápices que foram expostos a PVS-2 sem incubação em N₂ líquido. Os experimentos para cada acesso das respectivas variedades foram repetidos três vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram registradas taxas médias de regeneração após o congelamento que variaram de 23,33 % com 30 min de exposição ao PVS2 no BGA 128 até 63,33 % com 45 min de exposição ao PVS2 para o BGA 739. Na Tabela 1 encontram-se os resultados alcançados para os três acessos, antes e depois do congelamento em nitrogênio líquido.

Tabela 1. Taxas de regeneração (%) de acessos do BAG *in vitro* após o tratamento com PVS2 (Controle) e após a criopreservação (N₂ líq) pela técnica de vitrificação.

Acesso	Rep	30 min		45 min		60 min	
		Controle	N ₂ líq.	Controle	N ₂ líq.	Controle	N ₂ líq.
BGA 128	1	100	50	100	50	100	80
	2	100	10	100	40	100	50
	3	100	10	100	40	80	30
	Média	100	23,33	100	43,33	93,33	53,33
BGA 739	1	100	40	80	60	80	40
	2	100	30	60	60	60	40
	3	80	30	60	70	80	50
	Média	93,33	33,33	66,66	63,33	73,33	43,33
BGA 471	1	80	60	40	40	75	30
	2	60	30	80	40	100	50
	3	75	30	50	20	80	50
	Média	71,67	40,00	56,67	33,33	85	43,33

O procedimento de pré-cultivo tem a finalidade de favorecer a desidratação do tecido meristemático, diminuindo o volume vacuolar em nível celular (Figura 2a). Todos os ápices caulinares incubados em meio de pré-cultivo, sem tratamento com PVS2 ou incubação em nitrogênio líquido, foram regenerados no meio nutritivo, sem que houvesse qualquer perda, deixando evidente que esse procedimento não causa nenhum efeito indesejável aos ápices cultivados.

O efeito tóxico do PVS2 sobre os tecidos, independente do congelamento, pode ser avaliado pelos controles. Neste trabalho, o efeito dessa solução sobre os acessos mostrou-se bastante variável. O BGA 128 parece ser mais tolerante à solução, com resultados que variaram de 80 a 100 % de regeneração nos controles (Figura 2b) e uma média de aproximadamente 53 % de regeneração após o congelamento em nitrogênio líquido quando os ápices caulinares foram tratados por 60 min com a solução de PVS2 (Figura 2c-d). Para o BGA 128, os resultados mostraram que a medida que se aumentou o tempo de exposição houve um aumento na porcentagem de sobrevivência, indicando uma possibilidade de se aumentar o tempo de tratamento, já que, apesar da taxa de regeneração ter chegado a 80 % em uma das repetições experimentais, apresentou resultados menos expressivos nas outras repetições. Vale destacar, entretanto, que resultados em torno dos 50 % de regeneração sejam bem interessantes sob o ponto de vista prático.

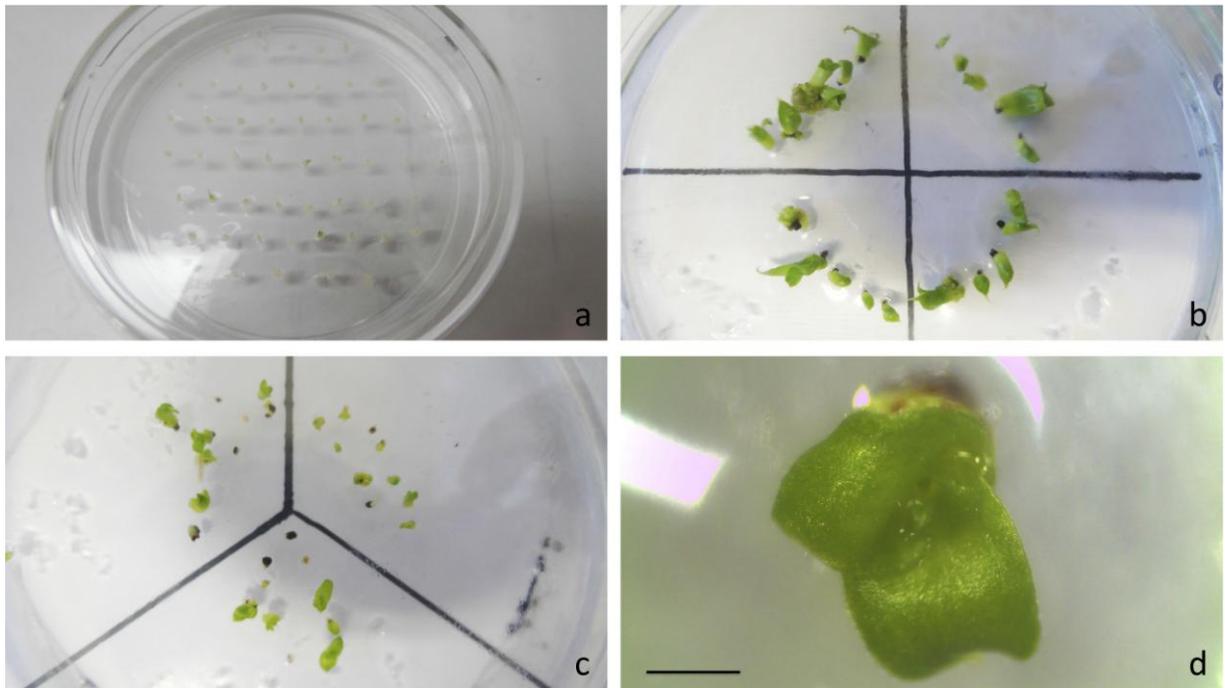


Figura 2. Ápices caulinares de *Ananas comosus* var. *bracteatus* cultivados em placas de Petri nas diferentes etapas de criopreservação. a) meio de pré-cultivo com 50 ápices caulinares; b) regeneração dos ápices caulinares após tratamento com PVS2; c) regeneração dos ápices caulinares após tratamento com PVS2 e nitrogênio líquido; d) detalhe de ápice caulinar regenerado aos 45 dias após tratamento com PVS2 e nitrogênio líquido em meio de cultivo *in vitro*. Barra: 1 mm

Outro aspecto que deve ser observado para esse acesso, considerando os três experimentos, é uma provável influência dos explantes de partida nos resultados obtidos. A padronização dos ápices caulinares para seu uso nestes trabalhos é obtida a partir da retirada destes ápices em plantas com 45 dias após o último subcultivo. Esse procedimento visa homogeneizar os explantes de partida e diminuir as fontes de variação dos resultados. Ainda assim, as condições de incubação podem alterar de forma significativa as condições celulares, o que acaba por afetar tanto a retirada de água da célula quanto os mecanismos de proteção da membrana (ENGELMANN, 2011).

O acesso BGA 739 parece ser ligeiramente mais sensível ao tratamento com PVS2, apresentando taxas de regeneração que variaram de 60 a 100 % nos controles e uma média de 63,33 % de regeneração após o congelamento quando os ápices foram tratados com PVS2 por 45 minutos, resultado acima das expectativas baseadas na literatura disponível. Souza et al. (2013) tiveram resultados com outras variedades de abacaxi, com resultados semelhantes de regeneração após o

congelamento em nitrogênio líquido precedido por 45 minutos de exposição ao PVS2.

Por fim, o acesso BGA 471 apresentou taxas de regeneração de 40 a 100 % nos controles e uma média de 43,33 % de regeneração após o congelamento quando os ápices caulinares foram protegidos por meio do tratamento com PVS2 por 60 minutos, de modo similar ao observado no BGA 128.

Os resultados demonstram que a técnica de criogenia é muito eficiente para preservar ápices caulinares destes acessos, ainda que ajustes possam ser feitos para melhorar ainda mais as taxas de sobrevivência e regeneração. Comparando-se as taxas obtidas com resultados registrados na literatura é possível constatar a maior eficiência obtida pela técnica de vitrificação em gotas. Martínez-Montero et al. (2005) alcançaram 45 %, 33 % e 25 % de regeneração após tratamento das cultivares Smooth Cayenne, Cabezona e Red Spanish, respectivamente, com solução PVS3 por 7 horas e incubação em N₂ líquido, valores inferiores aos que foram obtidos neste trabalho. Gámez-Pastrana et al. (2004), por sua vez, relataram regeneração de até 45 % após tratamento da cultivar MD-2 com solução PVS2 e incubação em N₂ líquido. Os estudos sobre criopreservação de abacaxizeiro são realizados tendo como material biológico acessos ou cultivares de *A. comosus* var. *comosus*, não havendo nenhum registro de uso desta técnica com variedades as outras variedades botânicas.

Os dados mostrados na Tabela 1 sugerem que o método de vitrificação proposto proporciona a criopreservação de acessos de outras variedades botânicas com boas taxas de sobrevivência e regeneração abrindo dessa forma a possibilidade de se estabelecer outra duplicata de segurança do BAG abacaxi em criogenia.

O tempo de exposição à solução de vitrificação deve considerar não apenas a sobrevivência dos explantes, mas também a estabilidade genética dos mesmos, visto que a solução de PVS2 pode causar estresse aos tecidos expostos, o que pode favorecer a variação somaclonal.

Os tempos de exposição ao PVS2 são bastante variáveis a depender da espécie, ainda que os ensaios realizados na maioria das vezes considerem os três tempos de exposição utilizados neste trabalho. Leunufna e Keller (2003) utilizaram um tempo de exposição de até 60 minutos na criopreservação de inhame (*Dioscorea*

sp.), ao passo que Panis et al. (2005) utilizaram tempos de exposição semelhantes na criopreservação de banana (*Musa* sp.).

A criopreservação por meio da vitrificação foi conduzida com êxito em batata-doce (*Ipomoea batatas*), com regeneração após o congelamento variando de 0 a 62 %, de acordo com a posição do meristema utilizado (PENNYCOOKE; TOWILL, 2000); maçã (*Malus* sp.) e pera (*Pyrus* sp.), com regeneração entre 40 e 77,5 %, variando em relação à cultivar (NIINO et al., 1992); menta (*Mentha spicata* L.), com regeneração de 0 a 87 %, variando em relação aos agentes de osmoproteção (HIRAI; SAKAI, 1999); mamão (*Carica papaya* L.), com regeneração de 0 a 96,6 %, variando em relação ao tratamento e à variedade (TSAI et al., 2009); dentre outros (CHAUDHURY; MALIK, 2003; ENGELMANN, 2004; HARDING, 2004; WANG et al., 2009).

Em todos os exemplos citados, foi utilizada a solução PVS2 na fase de vitrificação, com variados tempos de exposição, precedendo a incubação em nitrogênio líquido. Essa solução, descrita inicialmente em um trabalho de criopreservação de *Citrus* por Sakai et al. (1990), encontra ampla aplicação graças à eficiência comprovada na proteção de tecidos vegetais frente à criopreservação (VOLK; WALTERS, 2006).

Por outro lado, o efeito tóxico desta solução PVS2 deve-se ao fato de que ela é composta por altas concentrações de sacarose, levando a perda de água por osmose, etilenoglicol, agente indutor de estresse a nível celular, e DMSO, um agente caotrópico capaz de promover a desnaturação de proteínas e conseqüentemente a desagregação de estruturas celulares complexas e importantes (VOLK; WALTERS, 2006). Por esse motivo, pode-se dizer que o efeito crioprotetor da solução PVS2 é acompanhado de um efeito citotóxico que pode se expressar na inviabilização de parte dos ápices caulinares de abacaxizeiro, mesmo antes da incubação a -196 °C. Essa observação é corroborada por González-Arno et al. (1998), que verificaram a diminuição na taxa de sobrevivência de ápices caulinares de abacaxizeiro tratados com diferentes tempos de exposição ao PVS2.

Como conseqüência do tratamento com PVS2, parte da capacidade de regeneração dos ápices caulinares foi perdida já antes da incubação em N₂ líquido. Por outro lado, a perda após imersão em nitrogênio deve-se, principalmente, à cristalização de água remanescente no estado líquido, em vez do estado vítreo semissólido induzido pela vitrificação (BENSON et al., 2007). Estudos demonstraram

a sensibilidade de ápices caulinares de fruteiras tropicais a altas concentrações de sacarose e dimetilssulfóxido (GÁMEZ-PASTRANA et al., 2004; ENGELMANN, 2011), explicando a permanência de água em estado líquido no ápice e sua dificuldade de regeneração após incubação em N₂ líquido.

Ainda assim, os resultados registrados foram considerados satisfatórios e permitem aplicação prática, devendo ser considerados para o estabelecimento destes materiais em criogenia.

CONCLUSÃO

- O método de vitrificação nos moldes propostos nesse trabalho foi bastante eficaz para a criopreservação de acessos das variedades botânicas *Ananas comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *bracteatus* e *A. comosus* var. *erectifolius* do Banco Ativo de Germoplasma de abacaxizeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura;

REFERÊNCIAS

- BAKER, K.; COLLINS, J. L. Notes on the distribution and ecology of *Ananas* and *Pseudananas* in South America. **American Journal of Botany**, St. Louis, n. 26, pp. 697-702, 1939.
- BENSON, E. E.; HARDING, K.; JOHNSTON, J. W. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, pp. 163-184, 2007.
- BENSON, E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. (Ed.) *Plant Cryopreservation: a practical guide*, c. 2, pp. 15-32. 2008.
- CABRAL, J. R. S.; FERREIRA, F. R.; SOUZA, F. V. D.; MACHADO, C. F. Banco ativo de germoplasma de abacaxi. In: II Simpósio brasileiro de recursos genéticos, v. 1, p. 299, 2008.
- CHAUDHURY, R.; MALIK, S. K. Strategies for achieving short-, medium- and long-term conservation of desiccation-sensitive seeds. In: CHAUDHURY, R.; PANDEY, R.; MALIK, S. K.; BHAG, M. (Eds.) *In vitro* conservation and cryopreservation of tropical fruit species, IPGRI Office for South Asia and NBPGR, Nova Delhi, pp. 191-200, 2003.
- D'EECKENBRUGGE, G. C.; LEAL, F.; DUVAL, M. F. Germplasm Resources of Pineapple. In: JANICK, J. (Ed.) *Horticultural Reviews*, 2010.
- ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application*. JIRCAS, Tsukuba, Japan/IPGRI, Rome, Italy, pp. 8-20, 2000.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.
- ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos: an overview. In: TREVOR, A. T.; YEUNG, E. C. (Eds.) **Plant Embryo Culture: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology, v. 710, Springer Science+Business Media, LLC. 2011.
- FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Pineapple Germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, Honolulu, v. 334, pp. 23-26, 1993.
- GÁMEZ-PASTRANA, R.; MARTÍNEZ-OCAMPO, Y.; BERISTAIN, C. I.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T. An Improved Cryopreservation Protocol for Pineapple Apices Using Encapsulation-Vitrification. **CryoLetters**, v. 25, pp. 405-414, 2004.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 32, pp. 272-289, 1996.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRÁ-VILLAVIVENCIO, C.; MONTERO, M. M.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. **Cryoletters**, v. 19, pp. 375-382, 1998.

HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **CryoLetters**, v. 25, p. 3-22, 2004.

HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 19, pp. 150-155, 1999.

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, v. 118, p. 153-166, 2001.

LAMBARDI, M.; DE CARLO, A. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: JAIN, S. M., ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Kluwer, Holanda, pp. 815-840, 2003.

LEUNUFNA, S.; KELLER, E. R. J. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) **Plant Cell Reports**, 21: 1159-1166. 2003.

LYNCH, P. T.; BENSON, E. E.; HARDING, K. Climate change: the role of ex situ and cryoconservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 82, pp. 157-160, 2007.

MARTÍNEZ-MONTERO, M. E.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm with Vegetative Propagation – Review of Sugarcane (*Saccharum* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) Cases. In: KATKOV, I. I. (Ed.) **Current Frontiers in Cryopreservation**, InTech, c. 18, pp. 359-396. 2012.

MARTÍNEZ-MONTERO, M. E.; MARTÍNEZ, J.; ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. Cryopreservation of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) Apices and Calluses. **Proceedings of the IVth International Symposium on Pineapple**, pp. 127-131, 2005.

NIINO, T.; SAKAI, A.; YAKUWA, H.; NOJIRI, K. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 28, pp. 261-266, 1992.

OZUDOGRU, E. A.; PREVIATI, A.; LAMBARDI, M. In Vitro Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. **Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants**, Methods in Molecular Biology, v. 589, pp. 303-324, 2010.

PANIS B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, v. 168, pp. 45-55. 2005.

PENNYCOOKE, J. C.; TOWILL, L. E. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 19, pp. 733-737, 2000.

RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N. S.; GUPTA, H. A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, pp. 179-190, 2011.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, pp. 1-4, 2011.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, p. 151-172, 2007.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, pp. 70-84, 2000.

SHARMA, N.; SATSANGI, R.; PANDEY, R.; DEVI, S. V. *In Vitro* Clonal Propagation and Medium Term Conservation of *Brahmi* [*Bacopa monnieri* (L) Wettst]. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, v. 16, pp. 139-143, 2007.

SILVA, R. L. **Viabilidade, limpeza viral e estabilidade genética de plantas de abacaxizeiro oriundas da conservação *in vitro***. Dissertação de Mestrado. Cruz das Almas, UFRB, 2014.

SOUZA, F. V. D.; SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; CARDOSO, J. L.; BENJAMIN, D. A. Slow-growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **ISHS Acta Horticulturae**, n.º 702, pp. 41-47, 2005.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; COSTA JÚNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, pp. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. In: Tatiana Góes Junghans; Antônio da Silva Souza. (Org.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2ed. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2013, v. 1, p. 189-218.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; OLIVEIRA, V.; SKOGERBOE, D.; VIEIRA, L. J.; ALVES, A. C.; BROWER, T. M.; JENDEREK, M. Droplet vitrification technique for cryopreservation of different pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) accessions. In: II International Symposium on Plant Cryopreservation, Fort Collins, 2013.

TSAI, S. F.; YEH, S. D.; CHAN, C. F.; LIAW, S. I. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, pp. 157-164, 2009.

TYAGI, R. K.; PRAKASH, S. Genotype- and sex-specific protocols for *in vitro* micropropagation and medium-term conservation of jojoba. **Biologia Plantarum**, v. 48, pp. 19-23, 2004.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, pp. 48-61, 2006.

WANG, Q. C.; PANIS, B.; ENGELMANN, F.; LAMBARDI, M.; VALKONEN, J. P. T. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. **Annals of Applied Biology**, v. 154, pp. 351-363, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou avaliar a morfogênese e o potencial propagativo de diversas variedades botânicas de abacaxizeiro durante o estabelecimento *in vitro* e a possibilidade de se utilizar a criopreservação como estratégia de conservação de valioso germoplasma de abacaxi.

Com os resultados obtidos, foi possível confirmar que as respostas morfogenéticas são diferentes entre os acessos trabalhados, assim como entre as diferentes seções do caule do abacaxizeiro, estabelecendo, portanto, a recomendação de utilização preferencial de suas seções média e superior durante o estabelecimento *in vitro*, independente da variedade botânica. Ficou clara a necessidade de procedimentos diferenciados na fase de estabelecimento para os acessos de *A. macrodontes* cujas taxas de contaminação nesta etapa inviabilizam sua introdução *in vitro*.

Para as demais variedades, o protocolo avaliado foi satisfatório e pode ser utilizado com êxito, incluindo as gemas de coroas, estrategicamente interessantes para a formação da duplicata de segurança.

A criopreservação foi realizada com êxito em acessos de diferentes variedades botânicas, com regenerações tão ou mais satisfatórias que as registradas até o momento na literatura disponível. Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho destacam o potencial do método utilizado e indicam que ele pode ser aplicado aos demais acessos do banco, criando a perspectiva da construção de um criobanco como duplicata de segurança extra para os demais acessos existentes, para conservação a longo prazo.

Finalmente, este trabalho fornece informações importantes sobre material biológico de abacaxizeiro pouco estudado, do ponto de vista da aplicação de métodos biotecnológicos *in vitro*, contribuindo para o estado da arte da micropropagação e da criopreservação do abacaxizeiro.

ANEXOS

ANEXO A. Análise de variância para total de gemas de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Material	5	3,53	0,71	5,44**
Região	2	10,57	5,28	40,76**
Material x Região	10	2,99	0,30	2,30*
Erro	174	22,56	0,13	
Total corrigido	191	39,64		
CV (%)				15,58

ANEXO B. Análise de variância para a variável número de gemas contaminadas durante o estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Material	5	7,42	1,48	9,12**
Região	2	2,93	1,46	9,00**
Material x Região	10	3,34	0,33	2,05*
Erro	174	28,31	0,16	
Total corrigido	191	42,00		
CV (%)				29,92

ANEXO C. Análise de variância para a variável número de gemas intumescidas durante o estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Material	5	11,67	2,33	17,10**
Região	2	4,55	2,27	16,65**
Material x Região	10	2,27	0,23	1,66 ^{ns}
Erro	174	23,76	0,14	
Total corrigido	191	42,25		
CV (%)				27,70

ANEXO D. Análise de variância para a variável plantas formadas durante o estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Material	5	3,23	0,65	6,98**
Região	2	0,76	0,38	4,11*
Material x Região	10	0,57	0,06	0,62 ^{ns}
Erro	174	16,07	0,09	
Total corrigido	191	20,63		
CV (%)				25,90

ANEXO E. Análise de variância para a variável número de gemas total de coroas de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Variedade Botânica	2	3,94	1,97	3,07 ^{ns}
Erro	8	5,13	0,640932	
Total corrigido	10	9,07		
CV (%)				22,69

ANEXO F. Análise de variância para a variável número de gemas contaminadas de coroas de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Variedade Botânica	2	0,19	0,10	0,51 ^{ns}
Erro	8	1,53	0,19	
Total corrigido	10	1,72		
CV (%)				35,89

ANEXO G. Análise de variância para a variável número de gemas intumescidas de coroas de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Variedade Botânica	2	15,61	7,81	13,74**
Erro	8	4,55	0,57	
Total corrigido	10	20,16		
CV (%)				31,04

ANEXO H. Análise de variância para a variável número de gemas contaminadas de coroas de abacaxizeiros silvestres.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F_{cal}
Variedade Botânica	2	8,12	4,06	15,74**
Erro	8	2,06	0,26	
Total corrigido	10	10,18		
CV (%)				26,04