

**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**

**VIABILIDADE, ESTABILIDADE GENÉTICA E LIMPEZA VIRAL DE
PLANTAS DE ABACAXIZEIRO MANTIDAS SOB CONSERVAÇÃO *IN*
VITRO POR DEZ ANOS**

RONILZE LEITE DA SILVA DA CONCEIÇÃO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO - 2014**

**VIABILIDADE, ESTABILIDADE GENÉTICA E LIMPEZA VIRAL DE PLANTAS
DE ABACAXIZEIRO MANTIDAS SOB CONSERVAÇÃO *IN VITRO* POR DEZ
ANOS**

RONILZE LEITE DA SILVA DA CONCEIÇÃO

Bacharel em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Alagoas, 2002

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: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Coorientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira Carvalho Costa

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Conceição, Ronilze Leite da Silva da.

Viabilidade, estabilidade genética e limpeza viral de plantas de abacaxizeiro mantidas sob conservação in vitro por dez anos.– Cruz das Almas, 2014.

87 f. il.; 30 cm.

Orientadora: Prof^a.Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Co-Orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

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

1. Abacaxi. 2. Banco de Germoplasma. 3. Melhoramento de planta. I. Souza, Fernanda Vidigal Duarte. II. Ferreira, Claudia Fortes. III. Costa, Angélica Pereira de Carvalho. IV. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Título.

CDD: 634.774 – 21. ed.

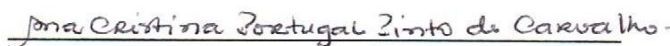
CDU: 634.6

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA
RONILZE LEITE DA SILVA DA CONCEIÇÃO



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



Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho
Embrapa Agroindústria Tropical



Dr. Hermínio Souza Rocha
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em, conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em.....

“Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.”

(Isaiás 40:31)

*A Deus, razão maior de minha
existência e aos meus amados filhos,
para os quais desejo ser um exemplo
de superação e fé.*

Dedico

Agradecimentos

Senhor, as muitas palavras não podem expressar a imensa gratidão pela realização de um sonho há muito guardado em meu íntimo e, por ti contemplado em lágrimas... só Tu sabias as dificuldades, os medos, as limitações, mas também o imenso desejo. Quando pensei não mais ser possível, me mostraste que de fato quando Deus age ninguém pode impedir. Obrigada pela certeza de que estiveste ao meu lado a cada passo do caminho, me ajudando a superar obstáculos e corrigir rotas. A ti toda honra e glória!

À minha amada mãe, pelo exemplo de garra, determinação, amor incondicional e por toda a base sólida oferecida para que pudesse não só alicerçar meus sonhos e conquistas, mas acima de tudo, o caráter.

À minha saudosa avó Eurídice, por ter desde muito cedo despertado em mim o gosto pela leitura, por ter me alfabetizado mesmo antes de ir à Escola, pelas histórias lidas e contadas com tanta paixão. Saudades!

Ao meu pai, que apesar da distância procurava suprir as necessidades, pela serenidade e amor. Por nunca deixar que faltassem os livros a cada ano letivo. Agradeço imensamente!

Ao meu esposo, pelo incentivo, pelo companheirismo, pela compreensão nos momentos de ausência, por ser um porto seguro em todos os momentos. Te amo.

Aos meus filhos, Pablo, Nayhara, Bruno e Raíssa por ser o meu motivo maior da minha vida, por compreenderem a importância dessa realização. Peço perdão pelas vezes que precisei me ausentar. Saibam que o meu amor por vocês é que me impulsiona a crescer não só intelectualmente, mas como pessoa. Agradeço por que em vocês descobri um amor que transcende tudo que é humano, a maternidade é a essência do amor divino. Obrigada por me permitirem compartilhar esse amor com vocês.

À minha segunda mãe Dal, saiba que nunca vou esquecer suas lições, incentivo, carinho. Você é muito especial para mim.

Aos meus irmãos, com os quais dividi muitos momentos bons da minha vida.

À toda a minha família, tias, tios, primos (as), sobrinhos (as), sogro, cunhados (as) em especial a minha avó Lila de quem herdei muita fé e paixão pelos livros.

À minha orientadora Dra. Fernanda, maior prova de que nada na vida é por acaso... Nunca saberei agradecer tanta dedicação, carinho, amizade. Saiba que, mais que orientadora a senhora é um grande exemplo pra mim, suas lições são muito valiosas e quero levar para minha vida. Obrigada pelo privilégio de ter sido sua orientada e que bom que continuaremos juntas no Doutorado! Obrigada!

Às coorientadoras deste trabalho Dra. Cláudia Fortes por sua valiosa orientação no capítulo de variação somaclonal e à Dra. Maria Angélica Costa, obrigada pelas instruções!

Ao pesquisador Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, pelas orientações e ensinamentos.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo suporte técnico para a realização deste trabalho.

À CAPES por conceder a bolsa.

Aos queridos professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFRB.

À minha amiga Livia Brandão, a quem não tenho jamais como agradecer por tudo o que fez por mim. Muitos entram em nossas vidas, cruzam os nossos caminhos, mas a poucos é dado o privilégio de chamarmos de amigos. Você é uma irmã que Deus me permitiu escolher. Muito obrigada!

À Vanúzia por ter colaborado em muitas práticas de laboratório e me acompanhado em parte dessa trajetória.

À Livia Vieira e Everton Hilo, pelas importantes contribuições para a qualidade do trabalho, por toda atenção e auxílio dispensados nos momentos de dúvidas, meus sinceros agradecimentos!

Ao colega Paulo Henrique por ter me acompanhado e ajudado muito no trabalho conduzido no laboratório de Biologia Molecular. Sem sua ajuda eu não teria conseguido. Muito obrigada!

Às amigas, Ádila e Marianinha por todo apoio e auxílio! Obrigada!

À Eliana, por sempre se fazer presente em minha vida, me aconselhando e ajudando quando necessário. Devo muito a você, pelas suas inesquecíveis lições enquanto professora e, muito mais pela sua amizade.

À Conceição por ter acreditado e me ajudado a realizar esse sonho mesmo quando ainda estava no ensino médio. Obrigada por tudo, sua ajuda mudou minha história!!

À Iara, grande professora e amiga, por todo apoio e incentivo. Obrigada!

Às amigas, Generosa, Karina Zanoti, Karina Cavalcante, Luciane Lordelo, Vanessa, Conce, Janaina, Núbia, Célia e todos os irmãos e irmãs de fé, os quais torceram e oraram por mim. Minha gratidão!

Aos colegas de turma com os quais muito aprendi! Sentirei saudades!

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, Tânia, Hélder, Honorato e Juraci por todos os ensinamentos e dedicação.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular, Andressa, Raimundo, Vandeson e Rogério pelas instruções.

Às amigas e colegas, Daniela, Meire, Mariane, Kátia, Gilmaria, Karine e Elaine. Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos de alegria e aprendizado.

À Banca examinadora pela disposição e importantes contribuições para o trabalho.

Em fim, meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma maneira contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 VIABILIDADE E MICROPROPAGAÇÃO DE ACESSOS DE ABACAXI ORIUNDOS DA CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i>	14
CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DE OCORRÊNCIA DE VARIAÇÃO SOMACLONAL EM GENÓTIPOS DE ABACAXI A PARTIR DO MARCADOR MOLECULAR ISSR.....	32
CAPÍTULO 3 CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES PARA LIMPEZA VIRAL DE PLANTAS DE ABACAXI CONSERVADAS EM CAMPO E <i>IN VITRO</i>	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72

VIABILIDADE, ESTABILIDADE GENÉTICA E LIMPEZA VIRAL DE PLANTAS DE ABACAXIZEIRO MANTIDAS SOB CONSERVAÇÃO *IN VITRO* POR DEZ ANOS

Orientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Coorientadoras: Dra. Claudia Fortes Ferreira

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO: A retomada do crescimento de plantas, após longos períodos de incubação em crescimento lento, é fundamental para o êxito da conservação *in vitro*. Adicionalmente, as plantas conservadas devem ser geneticamente estáveis e estar isentas de vírus e outros patógenos. Em vista disso, este trabalho teve como objetivos: avaliar a viabilidade de plantas de abacaxi conservadas *in vitro* por um período de 10 anos, a partir da retomada de crescimento e de seu potencial propagativo; validar uma metodologia para limpeza do complexo viral PMWaV por meio do cultivo de ápices caulinares de plantas *in vitro*, assim como avaliar a estabilidade genética das plantas conservadas com o uso de marcadores moleculares ISSR. Realizou-se o cálculo do número médio de brotos obtidos durante cinco subcultivos sucessivos de 66 acessos e do crescimento geométrico após conservação, para avaliar as taxas de multiplicação entre os diferentes acessos. Para a detecção do vírus em plantas do BAG de abacaxi utilizou-se a técnica de RT-PCR e para a remoção dos tecidos infectados e limpeza viral das plantas, meristemas com aproximadamente 0,5 mm oriundos de ápices caulinares de plantas *in vitro*. Realizou-se uma segunda indexação para confirmar a limpeza das plantas. Para estudo da estabilidade genética das plantas conservadas foram utilizados marcadores ISSR. Obteve-se viabilidade de todos os acessos conservados com uma grande variação na resposta morfogénica e no potencial propagativo. Subcultivos com intervalos de 24 meses podem ser recomendados para todos os acessos avaliados. Após o cultivo de meristemas 90 % dos acessos avaliados apresentaram-se livres do PMWaV. Os marcadores ISSR foram eficazes na detecção de 12,5 % de variantes somaclonais nos acessos conservados *in vitro*.

Palavras-chave: *Ananas comosus* (L.) Merrill, conservação de germoplasma, fitossanidade, *Pineapple Mealybug Associated Virus*.

VIABILITY, CLEANING VIRAL AND GENETIC STABILITY OF PINEAPPLE PLANTS *IN VITRO* CONSERVED FOR TEN YEARS

Advisor: Dra. Fernanda Duarte Vidigal Souza

Co-advisor: Dra. Claudia Fortes Ferreira

Prof. Dra. Maria Angélica Pereira Carvalho Costa

ABSTRACT: Plant growth after long periods of incubation under slow growth conditions is critical to the success of conservation. Additionally, the plants must be genetically stable and kept free of viruses and other pathogens. In this sense, the aim of this work was to evaluate the viability of plants from *in vitro* conservation for a period 10 years by the evaluation of growth and multiplication rates, to validate a methodology for cleaning the PMWaV virus complex from meristem culture from *in vitro* plants, as well as to evaluate the genetic stability of preserved plants using ISSR molecular markers. Geometric growth was calculated in order to evaluate multiplication rates among different accessions. For the virus detection, RT-PCR technique was used. For cleaning the infected accessions, meristems with approximately 0.5 mm derived from shoot tips of *in vitro* plants. A second indexation test was performed in order to confirm the virus elimination from the plants. To investigate the genetic stability of preserved accessions *in vitro* plants were compared to plants in the field using ISSR markers. Results showed viability for all accessions preserved with a large variation in morphogenetic response and in propagation potential. 24 month intervals may be recommended for all accessions. Among plants originated from meristems that were positive for the presence of virus, 90% was PMWaV-free, confirming the efficiency of the methodology used. The ISSR markers were effective in detecting 12.5% of somaclonal variants.

Key word: *Ananas comosus* (L.) Merrill, germplasm conservation, phytosanitary, *Pineapple Mealybug Associated Virus*.

INTRODUÇÃO

O abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merrill] é uma fruta tropical apreciada mundialmente pelo seu aroma e sabor acentuados, tem alto valor nutritivo, sendo particularmente rica em sais minerais e vitaminas, além de apresentar propriedades medicinais. O abacaxizeiro comum é uma bromeliácea, que pode ser propagada por filhotes, rebentões ou pela coroa. Geralmente é diplóide, com 50 cromossomos, mas existem formas triplóides espontâneas (CABRAL et al., 2004).

O gênero possui duas espécies, *Ananas macrodentes* E. Morren, que é mono específica e *Ananas comosus* (L.) Merrill, que se divide em cinco variedades botânicas a saber: *A. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal, *A. comosus* (L.) Merr. var. *paraguayensis* (Camargo & L.B.Sm.) Coppens & F. Leal, *A. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L.B.Sm.) Coppens & F. Leal, *A. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal e *A. comosus* var. *comosus* (COPPENS D'EECKEMBRUGGE; LEAL, 2003). Esta última, *A. comosus* var. *comosus*, se constitui na principal forma cultivada e abrange todas as cultivares plantadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo para a exploração do fruto.

O abacaxizeiro é um dos destaques da família Bromeliaceae, não apenas por sua importância econômica, mas também pela multiplicidade de usos que vêm sendo prospectados nos últimos anos. Seu uso ornamental vem sendo valorizado no segmento da floricultura demandando trabalhos de pesquisa voltados ao seu melhoramento genético (SANEWSKI, 2009; SOUZA et al., 2011a; 2012; 2014). Por outro lado, vem sendo usado como matéria-prima na indústria têxtil para a fabricação de tecidos (LEAL, 1996), assim como suas fibras vem sendo empregadas como reforço vegetal na indústria automotiva (LEÃO et al., 2007; SENNA NETO et al., 2013). Metabólitos secundários com atividades biológicas antioxidantes e de grande valor para a indústria farmacêutica,

cosmética e alimentícia se constituem em outros usos do abacaxizeiro (BENNETT, 2000; HARVEY, 2000; MANETTI et al., 2009).

O predomínio de poucas cultivares para a exploração comercial nos principais países produtores e a substituição de cultivares locais por outras de importância comercial mais ampla, vem causando erosão genética no gênero e indicam a necessidade de intensificação das atividades de preservação, caracterização e avaliação do germoplasma de abacaxi (CABRAL et al., 2004). Esse germoplasma constitui a base para qualquer programa de melhoramento e, portanto para a geração de novos materiais.

O Brasil é o centro de origem e dispersão do abacaxizeiro e espécies afins, com importante diversidade genética incluindo formas primitivas, cultivadas e intermediárias (COPPENS D'EECKENBRUGGE; LEAL, 2003).

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura reúne ampla variabilidade genética intra e interespecífica, estimando-se que parte da variabilidade genética natural está representada neste banco (SOUZA et al., 2012). Quase todo o território brasileiro já foi explorado em missões de coleta, além de algumas incursões em países vizinhos. Entretanto, restam ainda, algumas áreas nas regiões Nordeste e Centro-Oeste a serem exploradas. No Nordeste, há possibilidade de se coletar genótipos com tolerância à seca e, no Centro-Oeste, adaptados a solos de baixa fertilidade (CABRAL et al., 2009).

Aliada às diversas estratégias de conservação, como o BAG *ex situ*, e a conservação de sementes, a conservação *in vitro* de plantas micropropagadas é uma das alternativas de conservação de germoplasma e vem sendo largamente utilizada em muitas espécies de importância econômica, notadamente naquelas propagadas assexuadamente a exemplo da mandioca (FUKUDA, 2005); abacaxi (SOUZA et al., 2006); banana (SOUZA et al., 2010) e batata (RITSCHER et al., 2010). Dentre as vantagens de um BGA *in vitro*, pode-se ressaltar a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo, assim como facilidade e segurança para o intercâmbio de germoplasma (ENGELMANN, 2011).

Portanto, a manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerada como um método alternativo à conservação de germoplasma e mais precisamente, como uma duplicata de segurança do germoplasma em questão.

Entretanto, esse tipo de conservação, envolve a manutenção de plantas cultivadas em crescimento ativo por meio de subcultivos periódicos, cujos intervalos variam conforme a espécie e até mesmo, o genótipo, dentro da mesma espécie. A realização destes subcultivos envolve transferência das plantas para meio novo a fim de renovar os acessos em conservação e se constitui em atividade que pode tornar esse tipo de conservação laboriosa, além de elevar seus custos. Na tentativa de solucionar esse problema, a estratégia de manter as plantas em condições de crescimento lento, pela redução do metabolismo celular, vem sendo adotada para várias espécies como, por exemplo, em abacaxi (SOUZA et al., 2005), batata-doce (RISTCHEL et al., 2010); banana (SOUZA et al., 2010); mandioca (LIMA et al., 2011; VIEIRA et al., 2012); inhame (SOUZA et al., 2011). Os fatores considerados para se obter a redução do crescimento das plantas *in vitro* são variados e, vão desde controle de temperatura e intensidade luminosa, até alterações na formulação dos meios de cultura (SOUZA et al., 2004; 2006; FLORES et al., 2013).

O tempo prolongado de conservação nestas condições, assim como a mencionada realização de subcultivos sucessivos para a renovação dos acessos *in vitro* pode também gerar variação somaclonal ou acarretar perda de plantas por contaminações fúngicas ou bacterianas. Outro aspecto que precisa ser considerado na conservação *in vitro* é o efeito que esses tempos prolongados de cultivo podem ter sobre a retomada do crescimento e do potencial propagativo dos acessos conservados.

O Banco *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura de abacaxi foi estabelecido em 2003 e, até o momento nenhum trabalho que comprovasse a estabilidade genética dos acessos conservados tinha sido realizado, a fim de validar a metodologia adotada de conservação. Em abacaxi poucos são os variantes somaclonais que podem ser identificados *in vitro*, pelo fenótipo, como o surgimento de espinhos ou variegações na folha, os mais comuns de serem detectados visualmente (SONEJI et al., 2002). A variação somaclonal é um dos

tópicos mais revisados e estudados na cultura de tecidos, principalmente pelos efeitos negativos que pode causar na micropropagação ou na conservação *in vitro* de germoplasma (BAIRU et al., 2011).

Avanços na área da Biologia Molecular têm disponibilizado diversas tecnologias para análise genômica, possibilitando a verificação de polimorfismo de sequências de DNA em vários pontos do genoma e permitindo fazer estimativa de vínculo genético entre variedades ou acessos de uma espécie (SILVA et al., 2009). Uma estratégia para detectar variantes somaclonais é a utilização de marcadores moleculares, uma vez que acessam o genoma, evitando o efeito ambiental e, conseqüentemente erros de identificação (BORBA et al., 2005). Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis variam conforme a tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, habilidade para detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (FALEIRO, 2007).

O PCR (reação em cadeia da polimerase) se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores, que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, alvo de amplificação (KONIECZNY; AUSUBEL, 1993). Em 1990 foi desenvolvida a técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) o que vem possibilitando o desenvolvimento e a ampliação do uso dos marcadores moleculares, com a ideia de utilizar *primers* mais curtos e de sequências arbitrárias para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência (WILLIAMS et al., 1990).

O uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética e de estabilidade genética de plantas micropropagadas ou mesmo de plantas mantidas *ex situ*, tem possibilitado um melhor entendimento das metodologias de conservação usadas (MARTINS et al., 2004; ZOGHLAMI et al., 2012).

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (ZIETKLEWICZ et al., 1994) são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, uma vez que para sua utilização não se necessita de informação prévia da sequência de DNA. Além disso, tem baixo custo de desenvolvimento e os procedimentos laboratoriais podem ser transferidos para qualquer espécie de planta (BARTH et

al., 2002). Vários estudos realizados com marcador ISSR têm demonstrado sua eficiência para análise de fidelidade e variabilidade genética em plantas como em (ROSSI et al., 2009) bambu gigante (SINGH et al., 2013); banana (AREMU et al., 2013); gloriosa (YADAV et al., 2013); abacaxi; mandica (SILVA et al., 2011) e batata-doce (MAROUELLI, 2005).

Em abacaxi, Feuser et al. (2003) estudaram a fidelidade genética de mudas produzidas por dois sistemas de multiplicação *in vitro*, por imersão temporária ou estacionária usando marcadores do tipo RAPD e pelo método enzimático e, concluíram que existem diferenças significativas entre ambos os sistemas, sendo que com o uso de marcadores RAPD houve uma maior detecção de variação. Um dos poucos registros sobre a ocorrência de variação somaclonal em abacaxi foi feito por Perez et al. (2012) que relatam a detecção por AFLP de dois variantes somaclonais originados do cultivo *in vitro* da cv. Red Spanish Pinar. Não existem registros na literatura sobre o uso de marcadores ISSR em abacaxi para detecção de variação somaclonal, principalmente considerando os efeitos da conservação *in vitro*.

Outro fator fundamental na conservação de abacaxizeiro é a manutenção de plantas livres de patógenos e, portanto, com uma qualidade fitossanitária garantida. Dentre as enfermidades que acometem esta planta, merece destaque a murcha associada à cochonilha (*Pineapple Mealybug Associated Virus*, PMWaV), que se constitui em um dos maiores entraves para o aumento da produtividade da cultura e vem causando grandes perdas no Brasil e em muitos países produtores (HU et al., 1997; SETHER et al, 2001; 2005).

O controle dessa virose é dificultado pela fácil disseminação do vírus por meio de mudas infectadas, muitas vezes assintomáticas. No Brasil, o registro da ocorrência de plantas infectadas em várias regiões produtoras deixa claro que essa doença já é um problema para o cultivo comercial de abacaxizeiro no país (SANTOS, 2013).

Dessa forma, tanto procedimentos para a detecção do vírus nas plantas, quanto para a limpeza de genótipos e matrizes infectadas devem ser priorizados como estratégias auxiliares no controle da doença.

Atualmente, as técnicas mais utilizadas para detecção de vírus em abacaxi são as sorológicas e moleculares. As sorológicas utilizam anticorpos que têm a capacidade de detectar a partícula ou as proteínas virais no extrato vegetal, ao passo que as moleculares detectam a presença do genoma viral. Para indexação é necessário um método rápido, baixo custo, sensível e prático. Os métodos moleculares de detecção apresentam maior sensibilidade, porém possuem maior custo, principalmente quando se necessita detectar vírus com genoma de RNA, que é o caso do PMWaV (SANTOS, 2013).

A técnica molecular utilizada para a detecção do PMWaV é a RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa), que se baseia inicialmente na utilização do RNA viral como molde para a síntese de uma cópia DNA complementar (cDNA) utilizando a enzima transcriptase reversa, seguido de uma reação de PCR. Já existem oligonucleotídeos específicos capazes de detectar cada um dos três vírus (SETHER et al., 2005).

Entretanto, para cada amostra a ser analisada são necessárias a realização de três reações para a detecção de cada um dos três vírus. Visando reduzir o número de reações de RT-PCR e gerar economia de tempo e custo, Andrade et al. (2010), desenharam oligonucleotídeos degenerados que foram capazes de detectar indiscriminadamente os três tipos virais.

Assim, uma vez identificada a presença do vírus é necessário o desenvolvimento de uma estratégia de remoção e limpeza, considerando tanto a questão do estabelecimento de matrizeiros para a produção de mudas certificadas, quanto o aspecto da conservação de germoplasma (SOUZA et al., 2011).

O cultivo de ápices caulinares e a termoterapia são estratégias usadas para limpeza de vírus em diversas espécies. Em abacaxi, no entanto, ensaios realizados no Hawaii, a partir do cultivo *in vitro*, e da termoterapia de gemas axilares, constataram que o uso de temperaturas elevadas não foi eficiente e o cultivo de gemas axilares obteve um resultado discreto e diretamente ligado ao tamanho do explante utilizado (SETHER et al., 2001).

Em trabalho preliminar realizado por Souza et al. (2011) o cultivo de meristemas, oriundos de ápices caulinares excisados de plantas *in vitro*, com

tamanho em torno de 0,5 mm apresentou resultados promissores para a eliminação dos tecidos infectados e, conseqüentemente para a limpeza da planta.

Tanto a viabilidade, quanto a estabilidade genética e a condição fitossanitária das plantas conservadas *in vitro* são aspectos cruciais para se considerar um protocolo de conservação *in vitro* eficiente. Por outro lado, o intercâmbio de germoplasma, uma das funções de um banco dessa natureza, demanda todos esses atributos no acesso a ser intercambiado: plantas viáveis, saudáveis e estáveis geneticamente (SANTOS, 2008).

Para abacaxi, não existem estudos publicados abordando esses aspectos da conservação *in vitro* e mais precisamente, a partir de dados originados de uma coleção já estabelecida há dez anos.

Em vista disso, os objetivos deste trabalho foram: i) comprovar a viabilidade e resgate de plantas de abacaxi conservadas *in vitro* por meio de suas taxas de multiplicação; ii) validar um protocolo de limpeza de vírus usando o cultivo de meristemas de ápices caulinares de plantas *in vitro* e iii) avaliar a estabilidade genética das plantas conservadas a partir de marcadores do tipo ISSR.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. C.; SANTOS, K. C.; MEISSNER FILHO, P. E. Desenvolvimento de oligonucleotídeos degenerados objetivando a ampla detecção dos vírus associados a murcha do abacaxi. In: SIMPÓSIO SOBRE INOVAÇÃO E CRIATIVIDADE CIENTÍFICA NA EMBRAPA, 2, 2010, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2010.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; SZÜČOVÁ, L.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Genetic fidelity in tissue-cultured 'Williams' bananas – The effect of high concentration of topolins and benzyladenine. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 324-327, 2013.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p.147-173, 2011.

BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LUBBERSTEDT, T. L. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**. v.11, n. 3, p. 495–505, 2002.

BENNETT, B. C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING, D. H. (Ed.). **Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation**. Cambridge: University: Cambridge, 2000.

BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

CABRAL, J. R. S.; CASTELLEN, M. S.; SOUZA, F. V. D.; MATOS, A. P.; FERREIRA, F. R. **Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. (Documentos, n. 146).

CABRAL, J. R. S., LEDO, C. A. D. S., CALDAS, R. C., JUNGHANS, D. T. Variação de caracteres em híbridos de abacaxizeiro obtidos de diferentes cruzamentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p.1129-1134. 2009.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, 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, 2003. p. 13-32.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation on plant biodiversity. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 5 -16, 2011.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 3, p. 221-227, 2003.

FLORES, R.; ULIANA, S. C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T. M. B. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, 2013.

FUKUDA, W. M. G.; CAOSTA, I. R. S.; SILVA, S. O. **Manejo e Conservação de Recursos Genéticos de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas, BA, 2005.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n.7, p. 294-300, 2000.

HU, S. Y.; OHM, H. W.; DWEIKAT, I. Identification of RAPD markers linked to the gene PM1 for resistance to powdery mildew in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 6 - 7, p. 832- 840, 1997.

KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F. M. Procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **The Plant Journal**, v. 4, n. 2, p. 403-410, 1993.

LEAL, F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. Pineapple. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit Breeding**, New York, Wiley Publishing Co, 1996, p. 565-606.

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, 2007.

LIMA, M.H.M.; ALVES, K.A.; IZZO NETO, A.; SOUZA, S. A.; JESUS, C. M.; ANDRADE, L.F.; LONDE, L.N. Efeito de concentrações de sacarose e de meio de cultura (MS) sobre a taxa de crescimento de mandioca variedade BGM 0555

conservadas *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Búzios. **Anais...** Panorama atual e perspectivas do melhoramento de plantas no Brasil: Búzios: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2011. 1-CD ROM., 2011.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p.1885-1897, 2009.

MARQUELLI, L. P.; BUSO, G. S. C.; MAGALHÃES, J. S.; FERREIRA, C. F.; TORRES, A. C. Estudo da variabilidade genética de plantas oriundas da embriogênese somática de genótipos de batata-doce utilizando marcadores RAPD. **Embrapa Hortaliças, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 1, 2005.

MARTINS, M.; SARMENTO, D.; OLIVEIRA, M. M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 7, p. 492-496, 2004.

PEREZ, G.; YANEZ, E.; MBOGHOLI, A.; VALLE, B.; SAGARRA, F.; YABOR, L.; ARAGÓN, C.; GONZÁLEZ, J.; ISIDRÓN, M.; LORENZO, J. New Pineapple somaclonal variants: P3R5 and Dwarf. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2012.

RITSCHER, P. S.; LOPES, C. A.; HUAMÁN, Z.; FERREIRA, M. E.; FRANCA, F.; MENÊZES, J. E.; RAMOS, S. Organização do banco ativo de germoplasma de batata-doce: situação atual e perspectivas. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**: v.1, 2010.

ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O.; VENTURINI, B. A.; SILVA, R. S. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipe cacuanha* (Rubiaceae). **Genética**, v. 136, n. 1, p. 57–67, 2009.

SANEWSKI, G. M. Breeding *Ananas* for the cut-flower and garden markets. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 71-78, 2009.

SANTOS, K. C. **Incidência e prevalência das espécies do *Pineapple mealybug wilt-associated virus* no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura e em Nove Estados Brasileiros**. 2013. 72f. (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.

SANTOS, M. T. **Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro***. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

SENNA NETO, A. R.; ARAUJO, M. A.M.; SOUZA, F. V. D.; MATTOSO, L. H.C.; MARCONCINI, J. M. Characterization and comparative evaluation of thermal, structural, chemical, mechanical and morphological properties of six pineapple leaf fiber varieties for use in composites. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 529-537, 2013.

SETHER, D. M.; MELZER, M. J.; BUSTO, J.; ZEE, F.; HU, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampelo viruses in pineapple. **Plant Disease**, v. 89, p. 450-456. 2005.

SETHER, D. M.; KARASEV, A. V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA, C.; ZEE, F.; KISLAN, M. M.; BUSTO, J. L.; HI, J. S. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt associated viruses found in pineapple. **Plant Disease**, v. 85, n. 8, p. 856-864. 2001.

SILVA, S.A. DANTAS, A. C. V. L.; COSTA, M. A. P. C.; FERREIRA, C. F.; FONSECA, A. A. O. Caracterização de genótipos de fruteiras potenciais para o nordeste brasileiro. **Tópicos em Ciências Agrárias**, v. 2, n. 1, p. 2, 2009.

SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. da C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio

de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

SINGH, S. R.; DALAL, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K.; Ascertaining clonal fidelity of micropropagated plants of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro using molecular markers. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 5, p. 572-583, 2013.

SONEJI, J. R.; RAO, P. S.; MHATRE, M. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comusus* L., Merr.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. v. 77, n.1, p.28-32, 2002.

SOUZA, A. V. D., BERTONI, B. W., FRANÇA, S. D. C., PEREIRA, A. M. S. Micropropagation of *Dioscorea multiflora* Grised. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 92-98. 2011.

SOUZA, D. S. SIQUEIRA, D. L. D.; CECON, P. R.; SANTOS, D. Micropropagation of banana trees 'Prata Anã' and 'FHIA 01' explants from plants treated with paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 561-570, 2010.

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, n. 2, p. 409-416, 2014.

SOUZA, E. H.; MATOS, A. P.; TROCOLI, R. O.; COSTA JUNIOR, D. S. SOUZA, F. V. Evaluation of ornamental pineapple hybrids for resistance to *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*. **Acta Horticulturae**, v. 902, p. 381-386, 2011a.

SOUZA, E.H.; SOUZA, F. V. D.; JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIN.E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7 p. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; ALMEIDA, J. V. *In vitro* conservation of pineapple at Embrapa Cassava & Fruit. **Pineapple News**, v. 11, n. 11, p. 20-22, 2004.

SOUZA, F. V. D. SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; SILVA, J. L. C.; BENJAMIM, D. A. Slow-grow conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, n. 702, p. 41-47, 2005.

SOUZA, F. V. D., ANDRADE, E. C.; JUNGHANS, D.; CARVALHO, E. L.; SANTOS, K. C. Cultivo de meristemas apicais de plantas *in vitro* para limpeza viral em abacaxi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21, 2010, Natal. **Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: anais**. Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010. 1 CD-ROM., 2011.b.

VIEIRA, L. J.; SOARES, T. L.; ROSSI, M. L.; ALVES, A. A. C.; SANTOS, F. A. R.; SOUZA, F. V. D. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 350-356. 2012.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 22, p. 6531 - 6535, 1990.

YADAV, K.; AGGARWAL, A.; SINGH, N. Evaluation of genetic fidelity among micropropagated plants of *Gloriosa superba* L. using DNA-based markers - a potential medicinal plant. **Fitoterapia**, v. 89, p. 265-270, 2013.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplication. **Genomics**, v. 20, n. 2, p.176-183, 1994.

ZOGLAMI, N.; BOUAMAMA, B.; KHAMMASSI, M.; GHORBEL, A. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 59-64, 2012.

CAPÍTULO 1

VIABILIDADE E MICROPROPAGAÇÃO DE ACESSOS DE ABACAXIZEIRO MANTIDOS SOB CONSERVAÇÃO *IN VITRO* POR DEZ ANOS¹

¹Artigo submetido ao comitê editorial do periódico Acta Botânica Brasilica

VIABILIDADE E MICROPROPAGAÇÃO DE ACESSOS DE ABACAXIZEIRO MANTIDOS SOB CONSERVAÇÃO *IN VITRO* POR DEZ ANOS

RESUMO: O Banco Ativo de Germoplasma *in vitro* de Abacaxi vem sendo mantido na Embrapa Mandioca e Fruticultura desde 2003 sob regime de crescimento lento, por meio da redução do metabolismo celular das plantas. Não existem registros do efeito do tempo de permanência e da condição de conservação *in vitro* destas plantas sobre sua viabilidade. Este trabalho objetivou avaliar a viabilidade e o potencial propagativo de plantas oriundas de 66 acessos de diferentes variedades botânicas de abacaxi conservadas por um período de 10 anos. Plantas dos referidos acessos foram retiradas da câmara de conservação e subcultivadas em meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,8 g L⁻¹ de Phytigel, 0,1 mg L⁻¹ de ANA, 0,5 mg L⁻¹ de BAP com pH ajustado em 5,8 e incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 27 ± 1 °C, intensidade luminosa de 30 µmol m⁻²s⁻¹ e 16 horas de fotoperíodo. Foram realizados cinco subcultivos em intervalos de 45 dias, contabilizando-se o número de brotos por acesso em cada subcultivo. Os dados foram analisados com o uso do programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, 2000). Houve variação do número de brotos entre os acessos e variedades botânicas. Os resultados obtidos revelaram que houve recuperação da capacidade de multiplicação em todas as variedades estudadas, sendo que as maiores médias foram obtidas pela variedade botânica *Ananas comosus* var. *bracteatus* e as menores médias para os *A. comosus* var. *ananassoides*. A ocorrência de bactérias endofíticas foi observada nos dois últimos subcultivos para alguns acessos. Foi possível o resgate de 100 % dos acessos conservados.

Palavras-chave: *Ananas comosus* (L.) Merrill, conservação *ex situ*, cultura de tecidos, recursos genéticos.

VIABILITY AND MICROPROPAGATION OF ACCESSIONS FROM PINEAPPLE PLANTS *IN VITRO* CONSERVED FOR TEN YEARS

ABSTRACT: The *in vitro* pineapple genebank has been maintained at Embrapa Cassava & Fruits since 2003, under slow growth condition due to the reducing cellular metabolism of plants. No evaluation about the effect of time and *in vitro* storage conditions over the viability of these plants has been recorded. This study aimed to evaluate the micropropagation and rescue of the plants from 66 accessions of different pineapple botanical varieties preserved for a period of 10 years and their multiplication rates. The plants were removed from the storage chamber and subcultured on fresh MS medium supplemented with 30 gL⁻¹ sucrose, 1.8 gL⁻¹ Phytigel®, 0.1 mgL⁻¹ ANA, 0.5 mgL⁻¹ BAP with pH adjusted at 5.8 and incubated in a growth chamber at 27 ± 1 °C, light intensity of 30 µmol m⁻² s⁻¹ and 16 hours photoperiod. Five subcultures were performed with intervals of 45 days, registering the number of shoots/accession in each subculture. Data were analyzed using the statistical program SAS - Statistical Analysis System. The results showed that was feasible to recover and multiply all accessions, with the highest averages obtained with botanical variety *Ananas. comosus* var. *bracteatus* and the lowest averages with *A. comosus* var. *ananassoide*. The number of shoots ranged between botanical varieties and genotypes. The rescue of 100 % from conserved accessions was possible.

Key words: *Ananas comosus* (L.) Merrill, ex situ conservation, tissue culture, genetic resources.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos centros de origem e dispersão do gênero *Ananas* (COPPENS D'EECKENBRUGGE et al., 1997) e, também o segundo produtor mundial de abacaxi, com um total de 2.478.178 toneladas (FAO, 2014).

Nos últimos anos a erosão genética no gênero *Ananas* vem se tornando cada vez mais pronunciada, devido ao cultivo de poucas cultivares e à antropização de suas áreas de ocorrência, o que demanda a intensificação de ações na direção da conservação deste germoplasma.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura mantém um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) com aproximadamente 600 acessos do gênero *Ananas* e outras Bromeliaceae, sendo considerada a maior coleção de abacaxizeiro e espécies afins do mundo. Estima-se que grande parte da variabilidade genética natural dessa fruteira esteja aí representada a partir de coletas realizadas em diversas partes do território brasileiro (CABRAL; SOUZA, 2006).

A conservação do germoplasma de abacaxizeiro tem sido feita em condições de campo (SOUZA et al., 2012) e *in vitro* (SOUZA et al., 2004), por ser uma cultura prioritariamente de propagação vegetativa, ainda que forme sementes em condições naturais.

A conservação em campo, entretanto, pode ser vulnerável, já que nem sempre as plantas coletadas em diferentes regiões e sob diferentes condições se adaptam ao local de instalação do banco de germoplasma, causando perdas de acessos que muitas vezes não podem ser coletados novamente. Além disso, a conservação em campo torna-se frágil, à medida que pragas e doenças (fatores bióticos), bem como secas prolongadas e chuvas torrenciais (fatores abióticos) podem comprometer de forma significativa a integridade da coleção (SOUZA et al., 2005).

Dessa forma, o estabelecimento de uma duplicata de segurança *in vitro*, tornou-se uma alternativa importante e quase fundamental para muitas espécies, ainda que sejam necessários cuidados para seu pleno êxito. As vantagens de um BAG *in vitro* são muitas, dentre as quais vale ressaltar a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico, livre de intempéries e dos riscos que existem em campo, além de ser uma significativa alternativa de limpeza e conservação para o abacaxi (SOUZA et al., 2005).

No entanto, ao contrário do crescimento e rápido desenvolvimento que se busca na micropropagação ou regeneração de plantas *in vitro*, as plantas conservadas devem se desenvolver em regime de crescimento lento, a fim de se aumentar os intervalos entre subcultivos e facilitar o manejo da coleção. Assim, a redução do metabolismo e o estabelecimento de condições de crescimento lento, mantendo a planta viável e saudável, estão entre os principais objetivos para tornar eficiente a manutenção das coleções conservadas *in vitro* (SOUZA et al., 2006a).

O estabelecimento do Banco *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi iniciado em 2003 e conta atualmente com 240 acessos sob regime de crescimento lento. Cada acesso possui seis plantas conservadas em tubos de ensaio, em meio MS com $\frac{1}{4}$ da concentração de sais sob temperatura de 21°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de $30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (SOUZA et al., 2004; 2005).

Um estudo preliminar sobre o comportamento *in vitro* destes acessos constatou uma variação entre intervalos de subcultivos que foram de 50 a 350 dias nos três primeiros anos (SOUZA et al., 2005).

Vale destacar que não existem estudos sobre os efeitos dos longos períodos de conservação *in vitro* sob condições de crescimento lento na viabilidade e na capacidade de multiplicação destas plantas de abacaxi, assim como sobre a ocorrência de variação somaclonal.

A retomada do crescimento das plantas após o período de conservação sob crescimento lento deve ser restabelecida nas condições normais de cultivo (LEMOS et al., 2002), assim como se faz necessária a garantia sobre a estabilidade genética das mesmas. A possibilidade de ocorrência de variação somaclonal é uma das desvantagens deste tipo de estratégia e que pode advir do estresse imposto durante a conservação (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Poucos são os relatos publicados sobre conservação *in vitro* de abacaxi, e ainda que coleções sejam mantidas na França (CIRAD), Havaí (USDA) e Cuba (ÚNICA), os trabalhos mais focados na otimização de protocolos estão sendo desenvolvidos no Brasil pela importância que a cultura tem e, pela grande variabilidade genética existente do gênero no país (CANTO et al., 2004; SOUZA et al., 2005; 2009; 2010).

As funções de um banco *in vitro* vão desde resguardar o germoplasma para garantir a conservação de um pool de genes, até para atender demandas de intercâmbio de germoplasma ou para o atendimento de projetos variados (GEORGE,1993). Em vista disso, é importante conhecer o potencial propagativo dos acessos conservados e a recuperação da capacidade de multiplicação, principalmente após o período de conservação.

Esse potencial varia de acordo com o genótipo, mas um protocolo básico pode ser usado como ponto de partida para ensaios dessa natureza. Já existe um protocolo padrão para as principais cultivares comerciais de abacaxi (TEIXEIRA et al., 2001; SOUZA et al., 2009) e para abacaxi ornamental (CARVALHO et al., 2009).

Os acessos utilizados para a realização deste trabalho se encontravam sob conservação desde 2003 sendo cultivados com intervalos de subcultivo que variaram de 8 a 12 meses. No entanto, as plantas utilizadas neste trabalho vinham de um subcultivo de 24 meses.

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade das plantas conservadas de 66 acessos do gênero *Ananas* pela retomada do crescimento e o potencial propagativo após 10 anos na conservação *in vitro* sob regime de crescimento lento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 66 acessos das variedades botânicas *Ananas comosus* var. *bracteatus* (8 acessos), *A. comosus* var. *comosus* (44 acessos), *A. comosus* var. *erectifolius* (4 acessos) e *A. comosus* var. *ananassoides* (10), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma, BAG *in vitro* de abacaxi após dez anos de conservação em condições de crescimento lento de acordo com Souza et al. (2004). Na Tabela 1(página 23) estão relacionados os 66 acessos utilizados neste trabalho, bem como as respectivas variedades botânicas a que pertencem.

As plantas de cada acesso foram subcultivadas em frascos contendo 30 ml de meio MS (adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,8 g L⁻¹ de phytigel, 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP), pH ajustado em 5,8. As condições de incubação foram de 27 ± 1 °C, intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e 16 horas de fotoperíodo, num total de 12 plantas por frasco, a partir do 2º subcultivo, uma vez

que o número inicial de plantas variou de 2 a 10 plantas no 1º subcultivo. Foram realizados cinco subcultivos em intervalos de 45 dias e quantificados o número de brotos obtidos por planta (Figura 1 e 2).



Figura 1. Primeiro subcultivo de plantas de abacaxi pertencentes a variedade botânica *comosus* conservadas no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura por 10 anos. A) Plantas utilizadas para multiplicação do material vegetal. B-F) Multiplicação das plantas. G) Introdução em meio de multiplicação.

Calculou-se o número médio de brotos por subcultivo.

O potencial propagativo dos acessos foi medido por meio da taxa de crescimento geométrico (r), entre dois subcultivos subsequentes, dada pela expressão:

$$\text{Taxa de crescimento geométrico} \\ r = \left(\sqrt[t]{V_f/V_i} - 1 \right) \times 100$$

Onde:

V_f – Número de brotos no subcultivo posterior;

V_i – Número de brotos no subcultivo anterior;

t – Intervalo de 45 dias entre os 5 subcultivos.

Os dados foram também submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, 2000), para efeito de comparação com as taxas de crescimento geométrico e avaliação da eficiência deste tipo de análise para os dados em questão. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado tendo como base quatro variedades botânicas e cinco subcultivos. A variável em estudo foi o número de brotos formados em cada subcultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos que foram objeto deste estudo estavam conservados em condições de crescimento lento desde 2003 e, quando o trabalho foi iniciado não eram subcultivados há 24 meses. As plantas estavam em condição fisiológica de senescência avançada (Figura 1A) e, em alguns casos, com a reserva de meio de cultura praticamente esgotada. Observou-se que desde o primeiro subcultivo houve uma resposta diferenciada entre acessos. Algumas plantas demoraram até 45 dias para reagirem à nova condição de cultivo e incubação, em câmara de crescimento, muito provavelmente pelas condições fisiológicas em que se encontravam durante a fase de crescimento lento. No entanto, vale destacar que 100 % dos acessos apresentaram a retomada do crescimento.

Na Tabela 1 estão os valores referentes à taxa de crescimento geométrico e o número de brotos produzidos por acesso em cada subcultivo. Quando se avalia o número de brotos produzidos por subcultivo é possível observar que à medida que foram realizadas as transferências, um maior número de brotos foi contabilizado, sugerindo um aumento da multiplicação ao se avançar no tempo. Entretanto, quando observamos a taxa de crescimento geométrico é possível registrar resultado contrário, ou seja, à medida que as plantas vão sendo subcultivadas essa taxa vai diminuindo. De modo geral, esse comportamento foi registrado para a maioria dos acessos avaliados.

Tabela 1. Número de brotos nos cinco subcultivos e taxa de crescimento geométrico em 66 acessos do Banco de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi), conservados *in vitro* por 10 anos.

Acesso	Variedades	Número de brotos					Taxa de crescimento geométrico			
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	S1-S2	S2-S3	S3-S4	S4-S5
BGA 01	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	4	10	30	50	75	2,06	2,47	1,14	0,91
BGA 08	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	5	16	24	43	115	2,62	0,91	1,30	2,21
BGA 10	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	7	28	59	84	121	3,13	1,67	0,79	0,81
BGA 12	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	10	22	94	153	3,64	1,77	3,28	1,09
BGA 16	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	71	257	940	906	4,70	2,90	2,92	-0,08
BGA 18	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	3	16	39	52	100	3,79	2,00	0,64	1,46
BGA 32	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	16	23	-	-	4,73	0,81	-	-
BGA 43	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	6	16	34	24	38	2,20	1,69	-0,77	1,03
BGA 48	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	7	28	106	160	200	3,13	3,00	0,92	0,50
BGA 49	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	8	24	64	20	46	2,47	2,20	-2,55	1,87
BGA 51	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	25	165	230	592	2,30	4,28	0,74	2,12
BGA 53	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	34	101	80	140	3,00	2,45	-0,52	1,25
BGA 71	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	10	34	-	-	3,64	2,76	-	-
BGA 72	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	1	8	20	-	-	4,73	2,06	-	-
BGA 78	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	6	28	29	80	288	3,48	0,08	2,28	2,89
BGA 90	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	10	30	-	-	3,64	2,47	-	-
BGA 178	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	42	35	30	75	3,48	-0,40	-0,34	2,06
BGA 179	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	75	252	390	525	4,82	2,73	0,98	0,66
BGA 181	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	10	21	-	-	3,64	1,66	-	-
BGA 186	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	47	123	180	220	3,74	2,16	0,85	0,45
BGA 193	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	12	24	-	-	4,06	1,55	-	-
BGA 194	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	8	24	213	642	951	2,47	4,97	2,48	0,88
BGA 239	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	74	74	195	157	4,79	0,00	2,18	-0,48
BGA 216	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	8	21	82	73	142	2,17	3,07	-0,26	1,49
BGA 242	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	1	10	26	-	-	5,25	2,15	-	-
BGA 256	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	5	17	38	6	11	2,76	1,80	-4,02	1,36
BGA 334	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	7	30	88	112	190	3,29	2,42	0,54	1,18
BGA 344	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	3	9	37	143	336	2,47	3,19	3,05	1,92
BGA 345	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	6	22	36	75	121	2,93	1,10	1,64	1,07
BGA 350	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	5	19	35	40	68	3,01	1,37	0,30	1,19
BGA 622	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	6	28	56	62	131	3,48	1,55	0,23	1,68
BGA 717	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	15	34	-	-	4,58	1,84	-	-
BGA 720	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	7	17	51	120	160	1,99	2,47	1,92	0,64
BGA 737	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	6	19	42	30	-	2,59	1,78	-0,74	-
BGA 738	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	5	53	98	48	90	5,39	1,38	-1,57	1,41
BGA 650	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	8	50	103	65	70	4,16	1,62	-1,02	0,16
BGA 657	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	2	4	20	6	12	1,55	3,64	-2,64	1,55
BGA 431	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	4	7	20	-	-	1,25	2,36	-	-
BGA 800	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	6	16	33	60	110	2,20	1,62	1,34	1,36
BGA 801	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	4	7	28	17	31	1,25	3,13	-1,10	1,34
BGA 803	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	9	13	34	4	-	0,82	2,16	-4,64	-
BGA 698	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	7	21	46	31	69	2,47	1,76	-0,87	1,79
BGA 163	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	7	32	54	50	78	3,44	1,17	-0,17	0,99
BGA 48	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	4	15	41	89	23	2,98	2,26	1,74	-2,96
BGA 02	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	9	40	61	70	76	3,37	0,94	0,31	0,18
BGA 03	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	8	27	71	86	135	2,74	2,17	0,43	1,01
BGA 17	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	8	73	172	272	355	5,04	1,92	1,02	0,59
BGA 20	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	10	107	642	596	1100	5,41	4,06	-0,17	1,37
BGA 45	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	6	26	37	50	60	3,31	0,79	0,67	0,41
BGA 47	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	7	26	46	60	-	2,96	1,28	0,59	-
BGA 690	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	6	15	40	62	105	2,06	2,20	0,98	1,18
BGA 35	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	2	18	16	23	37	5,00	-0,26	0,81	1,06
BGA 25	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	2	8	30	63	11	3,13	2,98	1,66	-3,80
BGA 30	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	3	8	33	98	-	2,20	3,20	2,45	-
BGA 197	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	8	11	87	112	100	0,71	4,70	0,56	-0,25
BGA 198	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	7	27	23	41	75	3,05	-0,36	1,29	1,35
BGA 203	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	8	27	44	20	-	2,74	1,09	-1,74	-
BGA 206	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	6	22	42	16	18	2,93	1,45	-2,12	0,26
BGA 187	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	2	8	33	42	54	3,13	3,20	0,54	0,56
BGA 223	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	3	7	28	20	38	1,90	3,13	-0,74	1,44
BGA 232	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	4	24	71	73	120	4,06	2,44	0,06	1,11
BGA 234	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	2	9	28	-	-	3,40	2,55	-	-
BGA 739	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	1	10	23	-	-	5,25	1,87	-	-
BGA 804	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	8	32	56	137	61	3,13	1,25	2,01	-1,78
BGA 224	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	5	16	98	191	-	2,62	4,11	1,49	-
BGA 67	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	8	56	60	-	-	4,42	0,15	-	-

Para as quatro variedades botânicas estudadas constatou-se aumento no número de brotos à medida que houve avanço nos subcultivos, conforme observado de acordo com a análise de variância (Anexo A). Como a distribuição dos dados foi normal, não se realizou transformação de dados, tendo gerado uma DMS (Diferença Mínima Significativa) muito elevada e não permitindo a expressão de diferenças significativas entre as variedades.

Tais resultados deixam evidente a inadequação deste tipo de análise quando se busca estimar taxas de multiplicação de plantas *in vitro* e expressar o comportamento biológico entre elas ao longo do tempo. Mendes et al. (1999) mencionam a mesma inadequação deste procedimento para medir taxas de multiplicação em banana e propõem o uso de regressão de Poisson para determinar taxas de multiplicação mais próximas da realidade.

Por outro lado, o crescimento geométrico, usado normalmente para medir populações, traduz não os números absolutos do incremento populacional, mas a porcentagem de crescimento, que em caso de populações humanas tende a se manter estável.

A adaptação deste tipo de análise para a obtenção de taxas de multiplicação ou potencial propagativo em plantas *in vitro* parece interessante e, revela um dado mais consistente em relação ao número de brotos nos diferentes subcultivos e de acordo com a realidade, como ficou evidente com os resultados deste trabalho. Tais informações são de aplicação prática no que se refere ao potencial propagativo do que está sendo multiplicado e permite um planejamento com base no comportamento ao longo dos subcultivos.

A queda nas taxas de multiplicação para praticamente todos os acessos foi similar ao registrado por Mendes et al. (1999) com banana e por Hamad e Taha (2008) em abacaxi, confirmando um comportamento biológico *in vitro*, cujos mecanismos ainda são pouco conhecidos. Talvez, como sugerem esses autores, o intervalo entre subcultivos, normalmente estipulado pelos pesquisadores entre 30 e 45 dias pode responder parcialmente por essa queda, já que os cortes a que as plantas são submetidas ao serem transferidas podem afetar tecidos ou gemas, implicados na propagação, assim intervalos mais longos são mais viáveis, não apenas para a conservação, mas também para a propagação de plantas de abacaxi.

Na Tabela 2 estão os resultados por variedade botânica a partir da taxa de crescimento geométrico e mostram comportamento correspondente ao que foi visto com os acessos: redução das taxas de multiplicação e aumento do número de brotos ao longo dos cinco subcultivos. Os valores variaram de 15 brotos, como no BGA 256 e BGA 657, pertencentes à variedade botânica *A. comosus* var. *comosus*, e o BGA 25, um *A. comosus* var. *ananassoides* em contraste com valores bem mais elevados, como no BGA 20, um *A. comosus* var. *bracteatus* que registrou 1100 plantas ao final do trabalho.

Tabela 2. Número médio de brotos e crescimento geométrico de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi *in vitro* em quatro variedades botânicas do gênero *Ananas* conservadas por dez anos, durante cinco subcultivos.

Variedades	Número médio de brotos					Crescimento geométrico			
	Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	S1-S2	S2-S3	S3-S4	S4-S5
<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	6	24	63	124	192	3,33	2,17	1,50	0,99
<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	7	42	136	152	267	4,03	2,67	0,26	1,25
<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	5	15	42	54	59	2,73	2,29	0,56	0,22
<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	6	29	59	164	61	3,72	1,64	2,29	-2,17

A maior produção de plantas foi registrada para o *A. comosus* var. *bracteatus*, enquanto o *A. comosus* var. *ananassoides* e *A. comosus* var. *erectifolius* apresentaram os valores mais baixos (Tabela 2). Entretanto é preciso observar que esse resultado deve-se, principalmente a um único acesso (BGA 20) que elevou a média dessa variedade botânica (Tabela 1).

Os acessos de *A. comosus* var. *ananassoides* e *A. comosus* var. *erectifolius* apresentaram médias mais baixas, e principalmente, essa última variedade, com apenas quatro acessos avaliados. O BGA 739 apresentava suas plantas muito debilitadas no início do trabalho, devido ao subcultivo prolongado de 24 meses. Na Figura 2 pode ser visualizado o gráfico referente a Taxa de crescimento geométrico das quatro variedades botânicas avaliadas, o qual demonstra o comportamento das mesmas em relação ao número de brotos nos cinco subcultivos realizados.

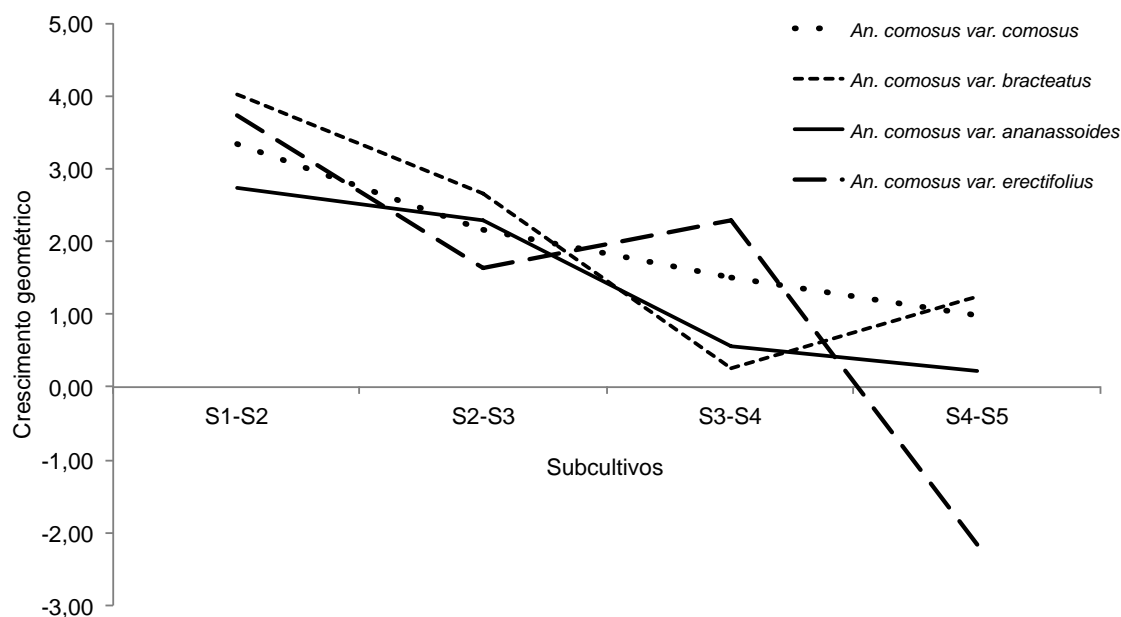


Figura 2. Taxa de crescimento geométrico de quatro variedades botânicas do gênero *Ananas* com base no número de brotos, durante cinco subcultivos sucessivos.

Algumas lacunas encontradas nos dois últimos subcultivos, principalmente, expressam a perda de plantas de alguns acessos devido a contaminações de origem endofítica. Do total de acessos resgatados da conservação 38 % (25 acessos) apresentaram contaminação bacteriana em algum subcultivo, com perda de plantas e 22 % tiveram perda total das plantas ao final do quinto subcultivo por conta de contaminações recorrentes.

A ocorrência de bactérias endofíticas em plantas de abacaxi cultivadas *in vitro* já foi relatada por Abreu-Tarazi et al. (2010) e deixa evidente a forma como esses endofíticos podem se manter nos tecidos por longos tempos de cultivo *in vitro* e tornar questionável a condição dita “axênica” das plantas *in vitro*.

O longo período de conservação dos acessos avaliados, seguido de procedimento de multiplicação pode ter acionado os mecanismos de expressão desses organismos.

As diferenças no potencial propagativo entre genótipos de uma mesma variedade e entre variedades estão relacionadas com as características próprias de cada genótipo, e, provavelmente, foram influenciadas pelo longo período de conservação em condição de crescimento lento e a forma como cada variedade respondeu a essa condição imposta por 10 anos. A genótipo dependência em

abacaxi, já foi relatada por vários pesquisadores em condições diversas (DEWALD et al., 1988; BARBOZA et al., 2004) principalmente tratando-se de variedades silvestres.

O último subcultivo a que essas plantas foram submetidas, de 24 meses, exerceu, certamente, uma influência sobre os resultados obtidos. O número de plantas inicial de cada acesso (Tabela 1) já foi considerado uma resposta à tolerância dos acessos avaliados ao intervalo prolongado desse último subcultivo, considerando que eram 10 plantas/acesso inicialmente.

Poucos são os registros que relatam o efeito do intervalo entre subcultivos, seja, sobre a multiplicação, ou sobre a conservação *in vitro*. Entretanto, em estudo realizado com abacaxi, Hamad e Taha (2008), avaliando o efeito de diferentes intervalos de cultivo (30, 45, 60 e 75 dias) em quatro subcultivos sobre a multiplicação de plantas da cultivar Smooth Cayenne, constataram que em relação ao número de brotos formados no 4º subcultivo, independente do período de incubação, os explantes perderam consideravelmente seu potencial propagativo (50 % da capacidade), resultado similar ao encontrado neste trabalho. Por outro lado, os mesmos autores, constataram que quanto maior o intervalo entre subcultivos, melhores resultados são obtidos para a produção de brotos em 75 dias.

Essa informação é relevante para o contexto da conservação *in vitro*, onde a ampliação do intervalo entre subcultivos está entre as demandas mais importantes no ajuste de protocolos eficientes.

Ainda em relação ao tempo de subcultivo, com outra monocotiledônea, a cana de açúcar, Lemos et al. (2002) obtiveram brotos viáveis após um ano, sem subcultivos com o uso de 1 mg L⁻¹ de ácido abscísico e de 20 g L⁻¹ de sacarose associadas às condições de temperatura reduzida (15°C).

A partir de dados obtidos a cada ano de conservação com diferentes acessos de abacaxi *in vitro*, Carvalho e Souza (2013) concluíram que o intervalo de subcultivo dos acessos conservados no BAG *in vitro* não deve ser em função das variedades botânicas, mas sim dos acessos que apresentam comportamento semelhante, recomendando o período entre 201 a 220 dias como adequadas para uniformizar o manejo.

Entretanto, considerando o número total de acessos e o que ainda necessita ser introduzido, esse intervalo deve ser ainda ampliado e, por isso a

realização deste trabalho com plantas oriundas de 24 meses. A recomendação de não se estabelecer subcultivos por variedades botânicas foi confirmada neste trabalho.

Santos (2008) em trabalho realizado com nove acessos de *A. comosus* var. *comosus* dessa mesma coleção, incluindo alguns que foram objeto deste trabalho, como o BGA 334, BGA 344, BGA 720 e BGA 800 encontrou taxas de crescimento geométrico com comportamento diferente do que foi visto neste trabalho. Entretanto, alguns dos acessos avaliados em ambos os trabalhos, apresentaram maior produção de brotos após os 10 anos de conservação do que no trabalho citado acima, que foi realizado com acessos conservados por três anos, mas que eram oriundos de intervalos diferentes de subcultivos entre eles. Isso pode estar associado ao período prolongado do último subcultivo (HAMAD; TAHA, 2008) como já abordado anteriormente.

O período de 24 meses, por sua vez, foi determinado com base em resultados obtidos por Souza et al. (2006b) com acessos que resistem por mais tempo às condições de cultivo impostas para a conservação *in vitro*.

O que se buscou, trabalhando com plantas na conservação por dois anos sem subcultivo foi avaliar a possibilidade de se manter acessos durante esse período sem a necessidade de transferência para meio novo e facilitar de forma significativa o manejo do BAG *in vitro*.

Dos 66 acessos estudados neste trabalho, 100 % (66 acessos) podem ser mantidos por 24 meses sem necessidade de transferência, considerando os resultados obtidos até o terceiro subcultivo.

Esses resultados são extremamente relevantes considerando a aplicação prática no manejo da coleção e, essa avaliação está em andamento para outros acessos de forma a obter essa informação para todos os materiais conservados *in vitro*, assim como os novos materiais a serem introduzidos nesta coleção.

CONCLUSÕES

A taxa de crescimento geométrico em plantas de abacaxizeiro conservadas *in vitro* diminuiu em todos os acessos ao longo dos cinco subcultivos;

Foi possível obter a retomada de crescimento em todos os acessos conservados, após dez anos, porém com diferenças entre as quatro variedades estudadas;

Pode ser recomendado o intervalo de subcultivo de 24 meses para todos os acessos avaliados no trabalho.

REFERÊNCIAS

ABREU-TARAZI, M.; NAVARRETE, A. A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplantas revealed by PCR-DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. C. A. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p. 725–733, 2004.

CABRAL, J. R. S.; SOUZA, F. V. D. **Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa, 2006 (Folder).

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. ; 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, n. 7, p. 717-721, 2004.

CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.

CARVALHO, H. L.; SOUZA, F. V. D. Manejo de subcultivos na conservação *in vitro* de abacaxi. In: V Simpósio de abaxicultura. 2013. 5 SIMPÓSIO BRASILEIRO

DA CULTURA DO ABACAXI, 2013, Palmas. **Produção e qualidade com tecnologia e sustentabilidade**. Palmas: Secretaria da Agricultura e Pecuária do Estado do Tocantins, 2013.

DEWALD, M. G.; MOORE, G. A.; SHERMAN, W. B.; EVANS, M. H. Production of pineapple plants *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.7, n. 7, p. 535-538, 1988.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT Database Gateway – FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>> Acesso em: 17 fev. 2014.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Exegetics, 1993. v. 1.

HAMAD, A. M.; TAHA, R. M. Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. over different incubation periods. **Scientia Horticulturae**, v 117, n. 4, p. 329-334, 2008.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

MENDES, B. M. J.; FILIPPI, S. B.; DEMÉTRIO, C. G. B.; RODRIGUEZ, A. P. M. A Statistical approach to study the dynamics of micropropagation rates, using banana (*Musa spp.*) as an exemple. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 12, p. 967-971, 1999.

SANTOS, M. T. **Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro***. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT**: user's guide, v.8.0. Cary, NC, 2000. 3v.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIN, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the

Ananas genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7, p. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; BENJAMIM, D. A. Behavior of wild pineapple at *in vitro* conservation. **Pineapple News**, v. 11. p. 10-12, 2006a.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; ALMEIDA, J. V. *In vitro* conservation of pineapple at Embrapa Cassava & Fruit. **Pineapple News**, v. 11, n. 11, p. 20-22, 2004.

SOUZA, F. V. D.; CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C. Residual effect of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 2, p. 33-41, 2010.

SOUZA, F. V. D.; SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; SILVA, J. L. C.; BENJAMIM, D. A. Slow-grow conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, n.702, p. 41-47, 2006b.

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. (Org.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009.177-205 p.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SILVA, J. L. C.; BENJAMIM, D. A. Minimum growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. In: 5TH INTERNATIONAL PINEAPPLE SIMPOSIUM, 2005, Port Alfred. 5th ISHS International Pineapple Symposium. Port Alfred: Pineapple Growers Association, 2005. p. 45.

TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 19, p. 42-47, 2001.

CAPÍTULO 2

USO DE MARCADORES ISSR NA AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE ABACAXI CONSERVADAS *IN VITRO* POR DEZ ANOS¹

¹Artigo submetido ao comitê editorial do periódico Euphytica

USO DE MARCADORES ISSR NA AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE ABACAXI CONSERVADAS *IN VITRO* POR DEZ ANOS

RESUMO: A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui um Banco de Germoplasma com aproximadamente 600 acessos do gênero *Ananas*, com duplicatas de segurança *in vitro* para aproximadamente 40 % da coleção, desde 2003. A estratégia utilizada é a do crescimento lento a partir da redução do metabolismo celular. Não existem estudos sobre a estabilidade genética de plantas de abacaxi após um longo período de conservação sob essa condição. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de variação somaclonal utilizando marcadores moleculares ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) em um total de 160 plantas oriundas da conservação *in vitro* e 6 do BAG em campo, pertencentes a seis acessos (BGA 03, BGA 20, BGA 49, BGA 72, BGA 206 e BGA 232) de três variedades botânicas de abacaxizeiro (*A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *comosus* e *A. comosus* var. *ananassoïdes*). Das 160 plantas *in vitro* avaliadas para as três variedades botânicas, não houve variação somaclonal em nenhum dos acessos de *A. comosus* var. *comosus* e *A. comosus* var. *ananassoïdes* quando comparadas com as plantas do campo, enquanto que na variedade *A. comosus* var. *bracteatus* 50 % dos clones apresentaram possível variação somaclonal por meio dos marcadores ISSR 11, ISSR 25 e ISSR 27 utilizados. Portanto, os resultados demonstram que os marcadores ISSR foram eficientes em avaliar a fidelidade genética dos acessos de abacaxizeiro conservados *in vitro*. A estratégia de conservação, por tempo prolongado de 10 anos, não causou instabilidade genética em plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* e *A. comosus* var. *ananassoïdes*. Para o *A. comosus* var. *bracteatus* faz-se necessário identificar as causas das variações encontradas, assim como ajustar a metodologia de conservação.

Palavras-chaves: *Ananas comosus*, marcador molecular, fidelidade clonal

THE USE OF ISSR MARKERS TO EVALUATE THE GENETIC STABILITY OF PINEAPPLE PLANTS *IN VITRO* CONSERVED FOR TEN YEARS

ABSTRACT: Embrapa Cassava & Fruits has a Genebank with approximately 600 accessions of the genus *Ananas*, with security duplicates *in vitro* for approximately 40 % of the collection since 2003. The strategy used is the reduction of cellular metabolism in minimum growth media. There are no studies regarding the genetic stability of pineapple plants after a long storage period under this condition. The aim of this study was to evaluate the occurrence of somaclonal variation in a total of 160 plants belonging to six accessions (BGA 03, BGA 20, BGA 49, BGA 72, BGA 206 and BGA 232) from three botanical varieties of pineapple (*A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *Comosus* e *A. comosus* var. *ananassoides*) kept in the *in vitro* bank at Embrapa Cassava & Fruits using ISSR molecular markers (Inter Simple Sequence Repeats). Of the 160 plants evaluated *in vitro* for the three botanical varieties, there was no somaclonal variation in any of the accessions of botanical varieties *A. comosus* var. *comosus* and *A. comosus* var. *ananassoides*, while in the variety *A. comosus* var. *bracteatus* 50 % of the clones showed somaclonal variation using the markers ISSR 11, ISSR 25 and 27 ISSR. The results demonstrate that ISSR markers were efficient in assessing the genetic fidelity of the accessions of pineapple cultured *in vitro*. The strategy of conservation used as well as the 10 years of cultivation did not cause genetic instability in plants of *A. comosus* var. *comosus* and *A. comosus* var. *ananassoides*. For *A. comosus* var. *bracteatus* it is necessary to identify the causes of the detected variations as well as refining the methodology of conservation.

Key words: *Ananas comosus*, molecular marker, clonal fidelity

INTRODUÇÃO

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura conta atualmente com aproximadamente 600 acessos em condições de campo e 40 % da coleção estabelecida *in vitro* como duplicata de segurança (SOUZA et al., 2004).

O BAG de abacaxi *in vitro* foi iniciado em 2003 com a finalidade de resguardar acessos cuja adaptação às condições de campo estabelecidas estava comprometendo a conservação em condições ideais.

A estratégia adotada foi a de crescimento lento, quando, por meio da redução do metabolismo celular das plantas se obtém uma diminuição em sua taxa de crescimento, sem, entretanto, comprometer o posterior resgate do acesso. A conservação *in vitro* de várias espécies a exemplo da batata, banana, mandioca e abacaxi já vem sendo feita a partir desta estratégia desde o início dos anos 90 (CONCEIÇÃO et al., 1999; SOUZA et al., 2006).

Isso se deve, basicamente, ao fato de que os procedimentos de renovação dos BAGs *in vitro* podem ser extremamente laboriosos e onerosos, tornando esse tipo de conservação pouco eficiente. A necessidade de subcultivos constantes pode também acarretar na perda de acessos por contaminações fúngicas e bacterianas, assim como aumentar a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal.

Vários fatores podem ser considerados para se obter a redução do crescimento da planta *in vitro* e no ajuste desta metodologia de conservação, tais como: redução da temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa da sala de crescimento; alterações na composição do meio de cultivo, como redução da concentração dos sais do meio MS, aumento da concentração osmótica, no uso de reguladores de crescimento, dentre outros artifícios que podem ser usados e se encontram bem documentados na literatura (LEMOS et al., 2002; CANTO et al., 2004). O objetivo é aumentar o espaço de tempo entre um subcultivos sucessivos, diminuindo o número de repicagens e, conseqüentemente os riscos citados acima.

As condições de crescimento lento, principalmente as que estão relacionadas ao ambiente e são impostas às plantas na conservação *in vitro*, podem resultar em alterações genéticas indesejáveis, tanto para a micropropagação clonal, quanto para a conservação de germoplasma (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Assim, a variação somaclonal, registrada pela primeira vez por Larkin e Scowcroft (1981) como uma nova fonte de variabilidade genética em células cultivadas *in vitro*, é um problema complexo, que necessita de diferentes abordagens para ser interpretado adequadamente.

As variações somaclonais se manifestam como anormalidades citológicas, principalmente mutações, as quais podem resultar em alteração na sequência, ativação ou silenciamento de genes. A observação de que os padrões de metilação do DNA são altamente variáveis entre plantas regeneradas e seus descendentes, fornecem evidências de que as modificações do DNA são menos estáveis em cultura de tecidos, do que em plantas cultivadas por propagação vegetativa. (PHILLIPS et al., 1994; KAEPLER et al., 2000).

A variação somaclonal pode ter causas variadas, ser herdável ou não, e estar relacionada com diferentes aspectos das células em cultivo, como os meios de cultivo, o tipo de explante, as transferências sucessivas para meio novo, temperatura, pH, dentre outros. O tema continua sob estudo constante visando o entendimento de suas causas e correlação com os vários fatores do cultivo *in vitro* (RANI; RAINA, 2000; MIGUEL; MARUM, 2011).

Registros de ocorrência de variação somaclonal *in vitro* vêm sendo publicados desde o início dos anos 80. Em abacaxi, o único relato foi feito por Perez et al. (2012) e se refere a identificação e seleção de dois variantes somaclonais, oriundos do cultivo *in vitro* da cv. Red Spanish, sendo um pela ausência de espinhos e outro pelo uso ornamental. Em se tratando de técnicas de micropropagação, as culturas são submetidas a condições completamente diferentes das que encontram quando cultivadas no campo ou mesmo em casa de vegetação (GASPAR et al., 2002). Assim, o ambiente *in vitro* é um fator de estresse e, por consequência pode levar à ocorrência de variações genéticas e fisiológicas do material. Essas variações devem ser monitoradas de forma prioritária, em qualquer sistema de cultivo, seja visando a micropropagação, a regeneração por embriogênese somática ou a conservação *in vitro*, dentre outros.

Várias estratégias são empregadas para avaliar a fidelidade genética de plantas cultivadas *in vitro*. A eletroforese isoezimática é utilizada para a avaliação da integridade genética de plantas *in vitro*, mas a sua propensão para a variação em função do ambiente é um dos principais inconvenientes da sua utilização generalizada (RANI et al., 1995). Nos últimos anos, uma potente ferramenta para fins de avaliação da homogeneidade genética foi descoberta nos marcadores moleculares baseados em DNA. Esses marcadores são altamente confiáveis quando se objetiva certificar e determinar a natureza de plantas micropropagadas (KUMAR et al., 2013).

Marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) são baseados em sequências de microssatélites ou repetições de sequências simples e tem sido muito utilizados em estudos de avaliação de fidelidade genética em plantas (MELO, 2011). Esses marcadores possuem características desejáveis, com elevado grau de reprodutibilidade, natureza dominante, alta abundância nos organismos e grande poder discriminatório por serem altamente polimórficos (BAIRU et al., 2011; NOOKARAJU; AGRAWAL, 2012).

Apesar de possuir um aspecto positivo por gerar variabilidade aos programas de melhoramento, a variação somaclonal não é desejável no âmbito da conservação, uma vez que esta prioriza que o material seja uniforme, com o mesmo padrão genético da planta matriz (D'AMATO, 1978).

Não existem registros de estudos para identificação de variantes somaclonais em plantas de abacaxi oriundas da conservação *in vitro*. Sendo assim, objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade genética de 160 plantas pertencentes a seis acessos e três variedades botânicas de abacaxizeiro do BAG *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo uso de marcadores do tipo ISSR. Trata-se de um estudo pioneiro para avaliar a fidelidade dos acessos submetidos a sucessivos subcultivos *in vitro*. No entanto, a partir dos resultados obtidos, avaliações posteriores poderão ser realizadas como forma de analisar um percentual maior de plantas e acessos do BAG.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Como material vegetal foram utilizados seis acessos de três variedades botânicas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *comosus* e *A. comosus* var. *ananassoides*) provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Tabela 1). Esses acessos foram selecionadas a partir de um estudo prévio de diversidade genética e perfazem um grupo representante de cada variedade botânica.

Tabela 1. Acessos do Banco de Germoplasma de Abacaxi, classificação botânica e número de plantas utilizadas do BAG em campo e *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, 2014.

Acessos	Variedades Botânicas	Número de plantas do campo	Número de plantas <i>in vitro</i>
BGA 03	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	1	30
BGA 20	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	1	30
BGA 49	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>	1	30
BGA 72	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>	1	30
BGA 232	<i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	1	30
BGA 206	<i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	1	10

1.2. Conservação *in vitro*

As plantas de cada acesso (Tabela 1) foram conservadas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura por 10 anos, sendo que há 2 anos não passavam por subcultivos.

As plantas foram mantidas em frascos de vidro contendo meio MS (adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,8 g L⁻¹ de phytigel, 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP) e pH ajustado em 5,8. As condições de incubação foram de 27 ± 1 °C, intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e 16 horas de fotoperíodo.

1.3. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura. De cada acesso foram utilizadas 31 plantas, sendo uma planta mantida em campo, e 30 plantas conservadas *in vitro*. As extrações de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo proposto por

Murray e Thompson (1980) com modificações (Anexo B). Inicialmente, folhas jovens dos acessos mantidos no campo e *in vitro* foram coletadas e acondicionadas em freezer a -20°C , para posterior extração do DNA.

Para verificar a quantidade e qualidade do DNA extraído, alíquotas de DNA obtidas de cada amostra foram quantificadas em gel de agarose 0,8 %, ao lado de um padrão de concentração de DNA, construído a partir de DNA de fago λ , nas concentrações de 100, 200 e $300\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$. Mediante comparação visual da intensidade das bandas do DNA das amostras e dos padrões, a concentração de cada amostra foi estimada e, posteriormente, diluída para a concentração de trabalho de $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$.

1.4. Amplificação de DNA e eletroforese

A amplificação do DNA foi realizada utilizando-se 17 *primers* ISSR (Tabela 2). Cada reação de PCR foi realizada em mistura de volume final de 25 μL , contendo os seguintes reagentes: 1 U de Taq Polimerase (LBM) em tampão 1 X, 25 mM MgCl_2 , 25 ng de DNA molde, 200 μM de cada dNTP (Fermentas) e 4 pmol de *primer*. As amplificações foram realizadas em placas de PCR em termociclador modelo Applied Biosystems (Veriti, 96 well Thermal Cycler), por meio do seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C durante 3 min., seguido por 39 ciclos, sendo cada um de 45 segundos para desnaturação a 94°C ; 45 segundos para anelamento do *primer* a 48°C e 1 minuto para extensão a 72°C e uma etapa final de 7 minutos, a 72°C , para extensão final e $10^{\circ}\text{C } \infty$.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2,5 %, corados com brometo de etídio ($0,5\text{ ug mL}^{-1}$), visualizados sob luz UV e fotografados usando um sistema de fotodocumentação. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o padrão de DNA molecular, usando um marcador ladder de 50pb (Invitrogen™).

Tabela 2. Identificação e sequência dos 17 *primers* ISSR testados no estudo da avaliação de estabilidade genética de 6 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi).

Nome do <i>primer</i> ISSR	Sequência (5'-3')
ISSR 02 ^(*)	CACACACACACACACAG
ISSR11 ^(*)	GAGAGAGAGAGAGAGAC
ISSR 12	GAGAGAGAGAGAGAGARC
ISSR 14	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
ISSR 24 ^(*)	AGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR 25 ^(*)	CGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR 27 ^(*)	CYGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR 31	CRCACCACCACCACCAC
ISSR 32	CYCACCACCACCACCAC
ISSR 36	CRCAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 37	CYCAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 76 ^(*)	TGGTGGTGGTGGTGGRC
ISSR 82	CTCCTCCTCCTCCTCRC
ISSR 90	GAAGAAGAAGAAGAARC
ISSR 92	GACGACGACGACGACRC
ISSR 97	GCAGCAGCAGCAGCARC
ISSR 99	GCCGCCGCCGCCGCCRC

**Primers* polimórficos utilizados nas análises moleculares.

1.5. Análise dos dados e variação somaclonal

Para identificação das variações somaclonais foram considerados apenas os fragmentos polimórficos e nítidos oriundos da amplificação de DNA. A contagem das bandas foi feita com base na sua presença, representada por '1' ou ausência, representada por '0', no gel. Variações no perfil eletroforético ocorridas dentro de acessos pertencentes à mesma variedade botânica, foram consideradas como possível variação somaclonal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação de fidelidade genética das plantas mantidas em condições de crescimento lento, BAG *in vitro*, foi realizada entre 30 clones de cada um dos seis acessos analisados, exceto para o acesso 206, pertencente à *A. comosus* var. *ananassoïdes*, na qual foram avaliados apenas 10 genótipos pelo fato de ser um material de difícil multiplicação. Tal análise, a partir dos clones, se justifica pelo fato de se ter conhecimento de que as condições de conservação e cultivo *in vitro* submetem as plantas a situações de estresse, sendo que podem resultar em

alterações genéticas indesejáveis, tanto para a micropropagação clonal, como para a conservação de germoplasma. Assim, a comparação entre os clones de um mesmo acesso pode revelar possíveis alterações ocorridas nos genótipos avaliados.

De acordo com a Tabela 3, dos 17 *primers* selecionados apenas seis geraram bandas nítidas e bem definidas, originando 143 bandas das quais 115 bandas (80,42 %) foram monomórficas e 28 bandas (19,58 %) polimórficas, dentre e entre os seis acessos utilizados. O número de bandas para cada iniciador variou de um (ISSR 76) a oito (ISSR 25) com uma média 3,97 bandas por *primer* (Tabela 3).

Para a maioria dos perfis eletroforéticos avaliados nesse estudo, entre os acessos do campo e os multiplicados *in vitro* durante cinco subcultivos, após resgate dos acessos, a fidelidade genética foi mantida (Tabela 3).

Tabela 3. Relação de *primers* ISSR, número de produtos amplificados, número de bandas monomórficas e polimórficas e porcentagem de polimorfismo em seis acessos de abacaxi provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de *in vitro*.

Acesso	Primer ISSR	Número de bandas	Bandas monomórficas (%)	Bandas polimórficas (%)
BGA 03		5	4	1
BGA 20		6	3	3
BGA 49	ISSR 11	4	2	2
BGA 72		5	2	3
BGA 206		3	3	0
BGA 232		7	2	5
BGA 03		2	2	0
BGA 20		2	2	0
BGA 49	ISSR 02	4	1	3
BGA 72		2	2	0
BGA 206		3	3	0
BGA 232		2	2	0
BGA 03		4	3	1
BGA 20		4	4	0
BGA 49	ISSR 24	2	2	0
BGA 72		3	2	1
BGA 206		5	5	0
BGA 232		4	3	1
BGA 03		4	3	1
BGA 20		7	6	1
BGA 49	ISSR 25	3	3	0
BGA 72		8	8	0
BGA 206		6	6	0
BGA 232		5	4	1
BGA 03		4	4	0
BGA 20		6	5	1
BGA 49	ISSR 27	4	4	0
BGA 72		6	4	2
BGA 206		6	6	0
BGA 232		3	3	0
BGA 03		1	1	0
BGA 20		4	3	1
BGA 49	ISSR 76	3	2	1
BGA 72		2	2	0
BGA 206		3	3	0
BGA 232		1	1	0
Média			3,97	3,19
Total		143	115 (80,42 %)	28 (19,58 %)

Foi observado polimorfismo entre bandas apenas nos acessos BGA 03 e BGA 20, sugerindo possível ocorrência de variação somaclonal nesses acessos (Figura 2 e 3). Vale ressaltar que ambos os acessos (BGA 03 e BGA 20) pertencem a variedade botânica *var. bracteatus*.

No BGA 03 ocorreu possível variação no perfil eletroforético de 5 clones (16,6 % de variantes somaclonais), detectados quando foram utilizados os *primers* ISSR 11 (no clone 5) e ISSR 25 (nos clones 12, 14, 17 e 24) (Figura 2).

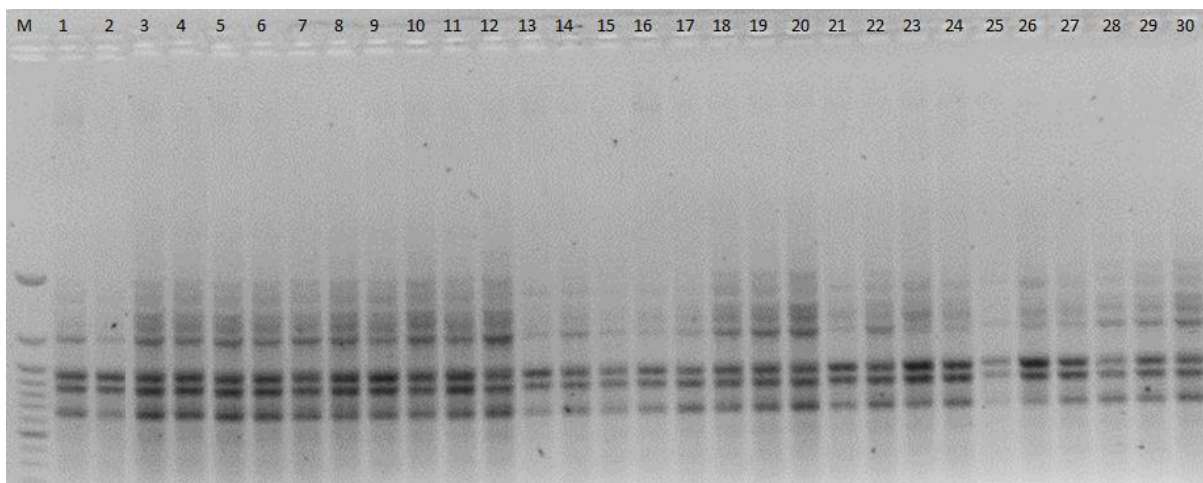


Figura 1. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5 % do *primer* ISSR-27 em 30 plantas de cultivo *in vitro* do acesso BGA 49, variedade botânica *comosus*. M = Marcador ladder 1 kb (Invitrogen™).

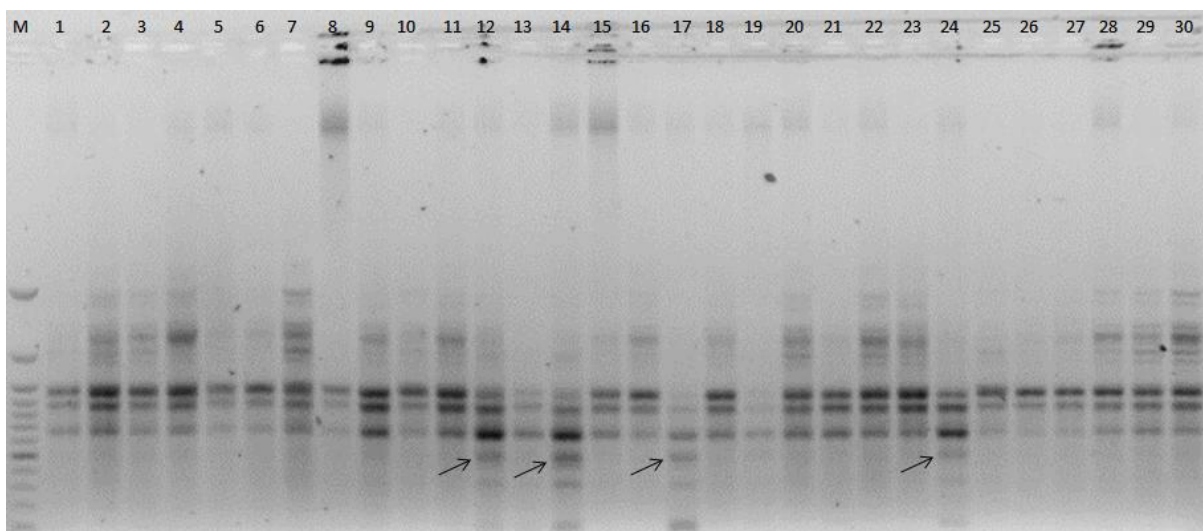


Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose 2 % do *primer* ISSR-25 em 30 plantas de cultivo *in vitro* do acesso BGA 03, pertencente à variedade *bracteatus*. M= Marcador ladder 1 kb (Invitrogen™). Setas apontando possível variação somaclonal.

Entretanto, no BGA 20, ocorreu variação no perfil eletroforético em 50 % dos clones, detectados quando foram utilizados os *primers* ISSR 25 nos clones 11 e 12 (Figura 3) e o ISSR 27 nos clones 1, 2, 8, 13, 14, 15, 16, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 (Figura 4).

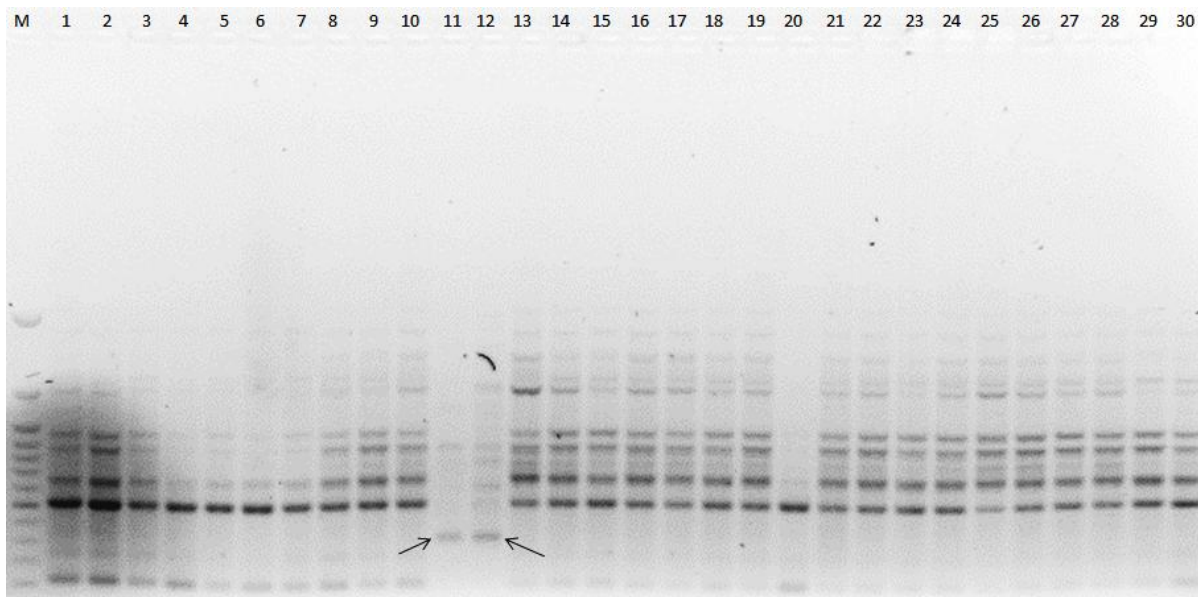


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5 % do *primer* ISSR-25 em 30 plantas de cultivo *in vitro* do acesso BGA 20, pertencente à variedade botânica *bracteatus*. M= Marcador ladder 1 kb (Invitrogen™). Setas apontando acessos com possível variação somaclonal.

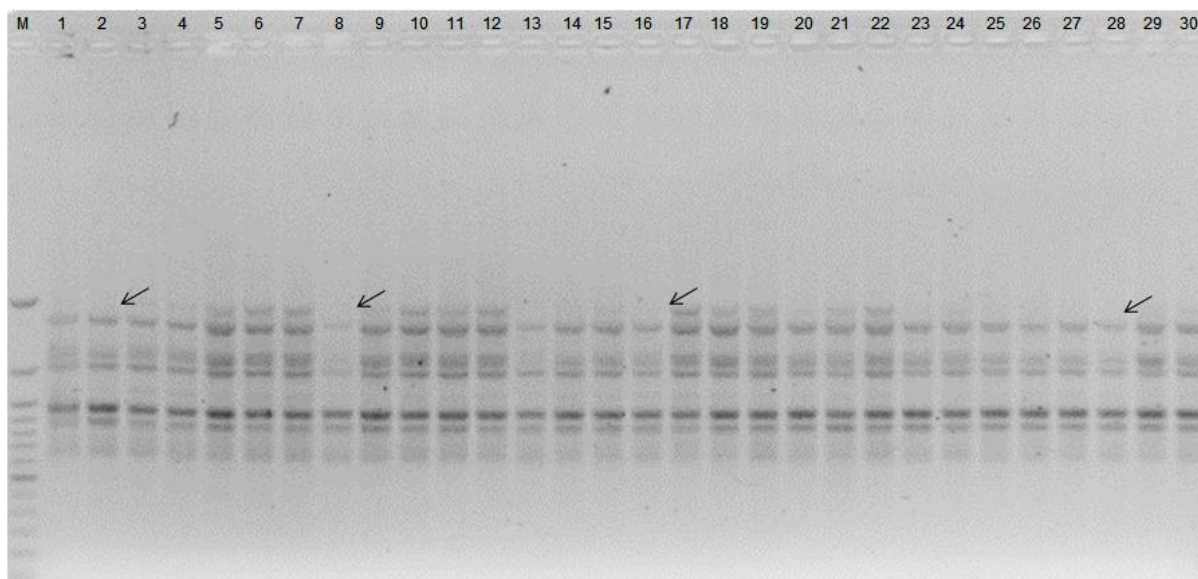


Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5 % do *primer* ISSR-27 em 30 plantas de cultivo *in vitro* do acesso BGA 20, pertencente à variedade botânica *bracteatus*. M= Marcador ladder 1 kb (Invitrogen™). Setas apontando possível variação somaclonal.

Diversos estudos têm buscado avaliar a fidelidade genética de plantas provenientes da cultura de tecidos a partir de marcadores moleculares nas mais diversas culturas, como marcadores RAPD em abacaxi (GOTTARDI et al., 2002); RAPD e SSR em kiwi (PALOMBI; DAMIANO, 2002); ISSR e IRAP em cevada

(CAMPBELL et al., 2011); ISSR e microssatélites em goiabeira (RAI et al., 2012), ISSR em macieira (PATHAK E DHAWAN, 2012) .

A variação somaclonal se constitui em uma resposta limitante na propagação clonal de plantas em cultura de tecidos, principalmente pelo fato de os meios de cultura serem suplementados por substâncias reguladoras de crescimento (COSTA; ZAFARI, 2005). No entanto, Segundo Pathak e Dhawan (2012), em estudo realizado sobre a fidelidade genética em macieira a partir de marcadores ISSR, o autor sugere que a variação é regulada mais pelo genótipo das espécies de plantas do que pelas condições da cultura de tecidos.

Uma taxa de variação de 50 % como foi detectada pelos *primers* ISSR 25 e 27 em 15 clones do acesso BGA 20 e de 16,6 % para 5 clones do BGA 03, ambos pertencentes a variedade *bracteatus* pode ter estreita relação com o tempo de permanência *in vitro* e a grande quantidade de subcultivos sofridos pelos acessos, principalmente quando se considera os 10 anos de conservação. Além disso, a variedade botânica *A. comosus* var. *bracteatus* demonstra ter relação direta com a susceptibilidade a variação somaclonal, já que em estudos de avaliação da fidelidade genética, desta variedade, por meio do marcador molecular RAPD, foi detectada 38 % de variação após 4 subcultivos (SANTOS, 2008).

Percentuais elevados de variantes somaclonais têm sido observados em outras culturas. Bairu et al. (2006) avaliando o efeito dos reguladores de crescimento e a ocorrência de variação somaclonal em bananeira (*Musa* AAA cv. 'Zelig'), detectou uma elevada taxa de variação, 72 % em cerca de seis subcultivos.

Altas taxas de variantes somaclonais podem ser interessantes para programas de melhoramento genético principalmente devido à ampliação da variabilidade genética disponível. Biswas et al. (2009) utilizaram a indução de variação somaclonal com altas concentrações de BAP no meio de cultivo para seleção de genótipos promissores de morango. Sahijram et al. (2003) concluíram que embora a variação somaclonal seja indesejável no contexto da micropropagação, esta pode ser utilizada com sucesso para o melhoramento genético de bananeira.

No presente estudo a variação somaclonal detectada parece ter maior relação com o genótipo da espécie do que com as condições do cultivo *in vitro*,

uma vez que as 160 plantas estavam sob as mesmas condições, apenas *A. comosus* var. *bracteatus* sofreu maiores alterações, em comparação aos acessos das outras duas variedades botânicas, *A. comosus* var. *ananassoïdes* e *A. comosus* var. *comosus*.

O fator tempo de permanência *in vitro* também tem sua influência sobre o aparecimento de variantes somaclonais. De acordo com Modgil et al. (2005), a longa duração sob condições de crescimento lento é um dos principais fatores que causam a variação em germoplasma de maçã. Os autores sugerem 4 anos como um tempo longo demais para manutenção dessa espécie sob cultivo *in vitro*.

No presente estudo, observa-se que o tempo de dez anos sob conservação *in vitro* aliados à resposta genotípica da variedade *bracteatus* e ao elevado número de subcultivos, tenham contribuído para as variações observadas.

Os intervalos entre subcultivos variam de um acesso para outro, o que acaba configurando números diferentes de subcultivos para cada acesso. O que determina o momento de se subcultivar uma planta *in vitro* é seu estado de senescência, que por sua vez está diretamente ligado à resposta metabólica que o mesmo tem em relação às condições impostas de cultivo.

Em ensaio preliminar realizado (dados não apresentados) onde foram avaliados os intervalos de subcultivos dos acessos conservados, os acessos de *A. comosus* var. *bracteatus* registraram os menores intervalos entre transferências, o que implica em um maior número de subcultivos. Por outro lado, o BGA 20, que apresentou o maior número de clones com variação, foi também o acesso que apresentou maior potencial propagativo após o resgate da condição *in vitro*, o que pode sugerir um metabolismo mais acelerado e conseqüentemente, a necessidade de mais subcultivos.

Por outro lado, considerando que as variações foram observadas em apenas uma variedade botânica e em dois clones dessa variedade, parece que a dependência genotípica é mais determinante do que o tempo de cultivo ou pode haver um efeito interativo entre ambos os fatores, o que demanda novos estudos com maior foco nas possíveis causas desta instabilidade observada.

Ainda assim, apesar dos diversos fatores que podem gerar variação somaclonal em plantas provenientes da conservação *in vitro* e, também das

possíveis variações somaclonais identificadas neste trabalho, à conservação *in vitro* é uma estratégia adotada e considerada eficaz para muitas culturas.

Da mesma forma, o uso de marcadores ISSR para avaliar estabilidade genética de plantas se mostrou adequado também para plantas *in vitro* de abacaxi a semelhança de outros trabalhos como os que foram relatados com *Opuntia ficus-indica* (ZOGHLAMI et al., 2012), *Pisum sativum* L. (SMYKAL et al., 2007) e porta-enxerto de macieira (PATHAK; DHAWAN, 2012). Do mesmo modo, Lu et al. (2011) a partir de *primers* ISSR, constataram a homogeneidade em plantas de bananeira micropropagadas após avaliação da identidade genética e monitoramento de variação somaclonal de 30 cultivares durante 11 subcultivos a intervalos de 45 dias.

Huang et al. (2009) utilizando *primers* ISSR objetivando avaliar a estabilidade genética de plantas micropropagadas de *Platanus acerifolia* advindas da conservação *in vitro* por um período de oito anos, observaram apenas 2,88 % de polimorfismo entre os clones, detectando que *P. acerifolia* manteve-se geneticamente estável.

Assim, no presente trabalho observou-se que o comportamento dos genótipos foi um fator determinante para as taxas de variação detectadas em acessos de *A. comosus* var. *bracteatus*, somando-se a esta o longo tempo de conservação, o grande número de subcultivos e a maior taxa de multiplicação.

Conclusão

As variedades *A. comosus* var. *comosus* e *A. comosus* var. *ananassoides* regeneradas a partir de plantas conservadas *in vitro* durante 10 anos, mantiveram-se geneticamente estáveis;

Dentre as variedades conservadas, o *A. comosus* var. *bracteatus* é o mais instável em longos períodos de conservação do que as outras variedades botânicas avaliadas;

Marcadores ISSR são eficazes na detecção de variantes somaclonais de plantas abacaxi conservadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

BAIRU, M. W.; FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 4, p. 347–351, 2006.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.

BISWAS, M. K., DUTT, M., ROY, U. K., ISLAM, R., HOSSAIN, M. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 3, p. 409-416. 2009.

CAMPBELL, B. C.; LE MARE, S.; PIPERIDES, G.; GODWIN, I. D. IRAP, a retrotransposon based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. **Molecular Breeding**, v. 27, n. 2, p. 193-206, 2011.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. ; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-721, 2004.

CONCEIÇÃO, A. M.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata. **Horticultura Brasileira**, v. 17, n. 3, 1999.

COSTA, T.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (shuttz) cv. *Streatus*. **Revista de Horticultura Ornamental**, v.11, p. 109- 113, 2005.

D'AMATO, F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. **Frontiers of Plant Tissue Culture**, p. 287-295, 1978.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, I.; HOUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, v. 37, p.263-285, 2002.

GOTTARDI, M. V. C.; LEMOS, E. G. M.; RUGGIERO, C. Avaliação por RAPD de plantas de abacaxizeiro cultivar Smooth Cayenne derivadas do seccionamento do talo e cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 1-5, 2002.

HUANG, W. J.; NING, G. G.; LIU, G. F.; BAO, M. Z. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 159-163, 2009.

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 179-188, 2000.

KUMAR, A.; PRAKASH, K.; SINHA, R. K.; KUMAR, N. *In vitro* plant propagation of *Catharanthus roseus* and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants by RAPD marker assay. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 109, n. 3, p. 894-900, 2013.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p.197-214, 1981.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; RAMALHO NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364. 2002.

LU, Y.; ZHANG, X.; PU, J.; QI, Y.; XIE, Y. Molecular assessment of genetic identity and genetic stability in banana cultivars (*Musa* spp.) from China using ISSR markers. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 1, p. 25-31, 2011.

MELO, R. A. **Caracterização morfo-agronômica e molecular, processamento mínimo e utilização de raios X em sementes de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. 2011. 102p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de São Paulo /Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2011.

MIGUEL; C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, 2011.

MODGIL, M.; MAHAJAN, K.; CHAKRABARTI, D. R.; SHARMA, D. R.; SOBTI, R. C. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 151-160, 2005.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, n. 19, p.4321-4325, 1980.

NOOKARAJU, A.; AGRAWAL, D. C. Genetic homogeneity of *in vitro* raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 302-306, 2012.

PALOMBI, M. A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 11, p. 1061-1066, 2002.

PATHAK, H.; DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 48, p. 137–143, 2012.

PEREZ, G.; YANEZ, E.; MBOGHOLI, A.; VALLE, B.; SAGARRA, F.; YABOR, L.; ARAGÓN, C.; GONZÁLEZ, J.; ISIDRÓN, M.; LORENZO, J. New pineapple somaclonal variants: P3R5 and dwarf. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1, p.1-11, 2012.

PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures – breakdown of normal controls. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v. 91, n. 12, p. 5222 - 5226, 1994.

RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; HARISH; GUPTA, A. K.; SHEKHAWAT, N. S.; JAISWAL, U. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 111, p. 259-264, 2012.

RANI, V; RAINA, S. N. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 36, n. 5, p. 319-330, 2000.

RANI, V.; PARIDA, A.; RAINA, S. N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoids* Marsh. **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 7, p. 459 - 462, 1995.

SAHIJRAM, L., SONEJI, J. R., BOLLAMMA, K. T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 6, p. 551-556, 2003.

SANTOS, C. C. C.; HERCÍLIO, P.; RODRIGUES, V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira cv. Pacovan. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SANTOS, M. D. M. **Micropropagação do abacaxizeiro ornamental (*Ananascomosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal) e a avaliação da fidelidade genotípica dos propágulos**. 2008. 126p. Dissertação (Pós-Graduação em Botânica) Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SMYKAL, P. L.; VALLEDOR, L.; RODRÍGUEZ, R.; GRIGA, M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 11, p. 1985–1998, 2007.

SOUZA, F. V. D. ; CABRAL, J. R. S.; ALMEIDA, J. V. *In vitro* Conservation of Pineapple at Embrapa Cassava & Fruits. **Pineapple News**, v. 11, p. 20-22, 2004.

SOUZA, F. V. D.; SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; SILVA, J. L. C. da; BENJAMIM, D. A. Slow-grow conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, n.702, p. 41-47, 2006.

ZOGLAMI, N.; BOUAMAMA, B.; KHAMMASSI, M.; GHORBEL, A. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 59-64, 2012.

CAPÍTULO 3

CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES PARA LIMPEZA VIRAL EM GERMOPLASMA DE ABACAXI CONSERVADO EM CAMPO E *IN VITRO*

¹Artigo submetido ao comitê editorial do periódico Plant Cell Tissue and Organ Culture

CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES PARA LIMPEZA VIRAL EM GERMOPLASMA DE ABACAXI CONSERVADO EM CAMPO E *IN VITRO*

RESUMO: A produção de mudas do abacaxizeiro é feita por propagação vegetativa, o que favorece a disseminação de doenças, como o complexo de vírus associado à murcha do abacaxizeiro (*Pineapple Mealybug Associated Virus*, PMWaV). O cultivo *in vitro* de ápices caulinares é uma estratégia usada para limpeza de vírus em diversas espécies. O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura conta com aproximadamente 600 acessos conservados no campo e 240 *in vitro*, sendo a qualidade fitossanitária das plantas desta coleção de suma importância para a conservação e também para programas de melhoramento genético. Em vista disso, este trabalho teve por objetivo o cultivo de ápices caulinares de plantas *in vitro*, previamente indexadas e contaminadas a fim de avaliar a eficiência deste procedimento para a limpeza viral. A identificação da presença do vírus em acessos e híbridos do BAG *in vitro* e, também em campo se deu através da indexação por RT-PCR, método prático e sensível, para que a partir disso, as plantas positivas entrassem na rota de cultivo de meristema. Os resultados demonstraram que apenas dois dos 19 acessos contaminados utilizados neste trabalho, o BGA 181 e o BGA190, permaneceram positivos para o vírus após o cultivo de meristema, demonstrando que a estratégia utilizada foi eficiente para 90% dos acessos tratados.

Palavras chave: *Ananas comosus*, diagnose, vírus-da-murcha, limpeza viral, PMWaV.

THE SHOOT TIP CULTURES TO VIRAL CLEANING IN PINEAPPLE GERMPLASM PLANTS UNDER FIELD AND *IN VITRO* CONSERVATION

ABSTRACT: The plant production of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) is by vegetative propagation, which allow the spread of diseases such as the (*Pineapple Mealybug Associated Virus*, PMWaV). The *in vitro* culture of shoot tips is one of the strategy used to clean virus in several species. The Gene Bank at Embrapa Cassava & Fruits has around 600 accessions conserved under the field and 240 *in vitro* conditions. The health of the plants of this collection is important for conservation and also to breeding programs. This study aimed to use the shoot tips cultures from *in vitro* plants previously indexed to evaluate the efficiency of this procedure to clean the associated mealybug virus. The confirmation of the presence of the virus in hybrids and accessions from the field genebank was made by RT-PCR, a practical and sensitive method. The infected plants were used to make the shoot tip culture with 0.5 mm in MS media. The results showed a high efficient with this approach with 90% the plants cleaned.

Keywords: *Ananas comosus*, *Pineapple Mealybug Associated Virus*.

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merr.] é a terceira fruteira tropical mais produzida no mundo, depois da banana e dos citros (FAO, 2014). O Brasil é o 2º maior produtor mundial com um total de 2.478.178 toneladas produzidas no ano de 2013 (FAO, 2014), o que destaca o valor econômico desta fruteira para o país.

O cultivo pode ser afetado por diversas pragas e doenças, que são responsáveis por perdas significativas na produção. No Brasil, destacam-se doenças de etiologia fúngica e viral, assim como anomalias de causa abiótica, que apresentam importância econômica significativa, levando a perdas na produção que variam de região para região, e dentro de uma mesma região a depender da época de produção (MATOS et al., 2011).

O *Pineapple Mealybug Associated Virus*, (PMWaV) é um vírus que infecta o abacaxizeiro causando a doença denominada popularmente de “Murcho do Abacaxizeiro”. O vírus é transmitido pelas cochonilhas, de duas espécies, *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*, e acredita-se que a doença seja causada por um complexo viral, tendo sido caracterizadas três formas, o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, que se diferenciam pela sequência e organização do genoma (SETHER et al., 2001; 2002; MELZER et al., 2008; SETHER et al., 2009).

A principal forma de disseminação dos vírus se dá pelo plantio de mudas infectadas e pelo vetor que são as cochonilhas em associação com as formigas. Estas desempenham um importante papel na disseminação de cochonilhas dentro e entre plantios, pois as protegem e carregam suas ninfas de uma planta à outra (SETHER et al., 1998; SANCHES et al., 2010). As plantas infectadas apresentam sintomas de avermelhamento foliar, sendo que, as bordas das folhas ficam voltadas para baixo, ocorrendo o ressecamento e a chamada morte descendente. O PMWaV está disseminado por todas as áreas produtoras de abacaxi (SANCHES et al., 2010; SANTOS, 2013), fato que demonstra a capacidade de todos os agentes envolvidos com a doença em se adaptar a diferentes condições ambientais.

Os prejuízos em nível de cultivo são significativos em plantios comerciais, pela dificuldade de detecção da presença do vírus e disseminação das mudas infectadas.

Para a conservação de germoplasma, além das perdas registradas no BAG em campo nos últimos anos, a presença do vírus na conservação *in vitro* compromete o intercâmbio de germoplasma de forma significativa.

Dessa forma, é de extrema importância a indexação do vírus e a garantia da fitossanidade das plantas mantidas sob conservação *in vitro*. A técnica de RT-PCR é uma das mais indicadas para a detecção do vírus, pois utiliza oligonucleotídeos específicos para os tipos de PMWaV. Entretanto, é interessante que se aprimore a metodologia, de forma a obter uma indexação simultânea dos três vírus, economizando tempo e recursos financeiros. Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos degenerados, baseados no alinhamento das sequências do PMWaV-1 e PMWaV-2, e utilizados para a detecção dos vírus em plantas de abacaxi. Os resultados demonstram que é possível a detecção dos vírus, tanto com os oligonucleotídeos específicos quanto com os degenerados. (SANTOS, 2013).

Contudo, tão importante quanto aprimorar técnicas para diagnosticar a presença do vírus nas plantas infectadas, é primordial que se busque adequar protocolos para efetivar a limpeza das plantas pela remoção dos tecidos infectados.

O cultivo *in vitro* de ápices caulinares é uma das estratégias usadas em algumas espécies de importância econômica, quando a termoterapia ou a quimioterapia não fazem efeito ou mesmo em associação com essas outras estratégias (BISWAS et al., 2007; BRAGA, et al., 2009; SILVA NETO et al., 2009; MENEZES JÚNIOR et al., 2011).

O procedimento compreende o isolamento e a inoculação do domo meristemático apical e alguns primórdios foliares, ou do meristema isoladamente (0,10 a 0,20 mm de comprimento) em meio de cultura e a obtenção de uma nova planta. Quanto menor for o explante, mais efetiva é a eliminação de patógenos. Morel e Martin (1952) foram os primeiros que demonstraram a eliminação de vírus a partir do cultivo de meristema em Dália (*Dahlia pinnata*). Atualmente, esta técnica é universalmente utilizada e apresenta grande impacto na produção agrícola vegetal.

Em uma planta infectada, a concentração de vírus não é uniforme e é maior em tecidos maduros e, menor em tecidos meristemáticos. Na primavera quando o crescimento é intenso, os meristemas alongam-se rapidamente e a

concentração de vírus torna-se ainda menor (GUERRA; NODARI, 2006). Uma das hipóteses que explica o fato dos meristemas serem livres de vírus, segundo Grattapaglia e Machado (1990), diz respeito ao fato de haver uma maior atividade de síntese protéica, o que evita a multiplicação do patógeno, além da incipiente ligação vascular dos meristemas com os demais tecidos, o que leva a uma menor distribuição das partículas do patógeno. Assim, considerando que os meristemas são geralmente livres de vírus e outros parasitas obrigatórios, tais como bactérias e phytoplasma, espera-se que, a excisão e a regeneração de ápices caulinares contendo meristemas possam resultar em plantas livres desses patógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Por outro lado, a capacidade de regeneração é proporcional ao tamanho do tecido excisado. Considerando que, quanto menor o tecido, mais garantida e eficiente será a erradicação do patógeno, a dificuldade na excisão de estruturas tão pequenas se constitui em uma das maiores limitações para o uso desta técnica (WANG et al., 2008). Dessa forma, o tamanho dos tecidos a serem cultivados quando o objetivo é a limpeza viral pode-se constituir em uma das dificuldades do protocolo, já que é um procedimento que requer habilidade e uma condição de cultivo e incubação ideal.

No caso do abacaxi, essa dificuldade é maior ainda, pois nas monocotiledôneas, a visão do domo meristemático é mais difícil e, portanto, a necessidade de se ajustar o tamanho adequado do meristema a ser cultivado para essa finalidade. Resultados preliminares com ápices caulinares oriundos de plantas *in vitro* e com aproximadamente 0,5 mm e um primórdio foliar em volta, apresentaram resultados promissores para essa finalidade (SOUZA et al., 2012). Esse procedimento, entretanto, necessita ser validado com maior número de plantas.

Dessa forma, dada a importância que a obtenção de plantas sadias apresenta, tanto para a produção de matrizes para cultivo, quanto para a conservação de germoplasma de abacaxi, torna-se estratégico o desenvolvimento de uma metodologia eficiente que permita a limpeza de plantas infectadas por esse complexo viral com a posterior produção de plantas livres de vírus.

Assim, o objetivo deste trabalho foi a validação de um protocolo eficiente de limpeza viral a partir do cultivo de ápices caulinares de plantas *in vitro* de abacaxi como forma de assegurar a qualidade do material estabelecido,

conservado e propagado no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de 158 acessos provenientes do BAG em campo, e *in vitro*, tendo sido indexada uma planta de cada acesso. As plantas que apresentaram resultados positivos para a presença do vírus (Figura 1) foram subcultivadas para a obtenção de um número mínimo de plantas que permitisse a realização do trabalho (Tabela 1).



Figura 1. Plantas contaminadas com o PMWaV (*Pineapple Mealybug Associated Virus*). A – Planta no campo. B – Coleta de material para indexação (folha). C – Folhas com sintomas de infestação da murcha (morte descendente). D – Raízes debilitadas pela cochonilha vetora.

Tabela 1. Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi positivos para o vírus e, posteriormente, submetidos ao cultivo *in vitro* de ápices caulinares.

Acessos do BAG	Variedades Botânicas	Origem dos Acessos	Nº de plantas usadas para o cultivo de meristema (*)	Número de plantas para 2ª indexação
BGA10	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	7	3
BGA16	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	7	3
BGA47	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	BAG <i>in vitro</i>	4	4
BGA45	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	BAG <i>in vitro</i>	15	10
BGA181	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	10	5
BGA257	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	6	3
BGA190	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	7	3
BGA445	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	10	5
BGA441	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	12	6
BGA297	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	3	1*
BGA718	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG <i>in vitro</i>	4	1*
BGA56**	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG campo	5	1*
BGA146**	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG campo	12	1*
BGA148**	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG campo	9	1*
BGA159**	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG campo	10	1*
BGA180**	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG campo	12	1*
BGA189**	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG campo	10	1*
BGA208**	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	BAG campo	11	1*
BGA244**	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	BAG campo	3	1*

*Plantas oriundas da etapa de multiplicação

1. Cultivo de ápices caulinares das plantas *in vitro*

O cultivo de ápices caulinares para o procedimento de limpeza foi realizado com as plantas mantidas em meio de multiplicação (Tabela 1).

Das plantas dos acessos do BAG *in vitro* foram excisados ápices caulinares com tamanho máximo de 0,5 mm e cultivados em tubos de ensaio (1 ápice por tubo), contendo 5 ml de meio de cultura MS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,8 g L⁻¹ de phytigel e 0,5 mg L⁻¹ de BAP, pH ajustado em 5,8. As

condições de incubação foram de 27 ± 1 °C, intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo.

As plantas de campo foram estabelecida sem condições de laboratório, de acordo com metodologia descrita por Souza et al.(2009) para posteriormente seguir o mesmo protocolo das plantas conservadas *in vitro*. Os ápices caulinares permaneceram em cultivo por aproximadamente 90 dias para a emergência da planta e até que a mesma atingisse um tamanho que permitisse a retirada das folhas para a nova indexação, a fim de confirmar a limpeza do vírus.

Na Figura 2, encontra-se a sequência das etapas realizadas desde a primeira indexação até a obtenção da planta sadia.

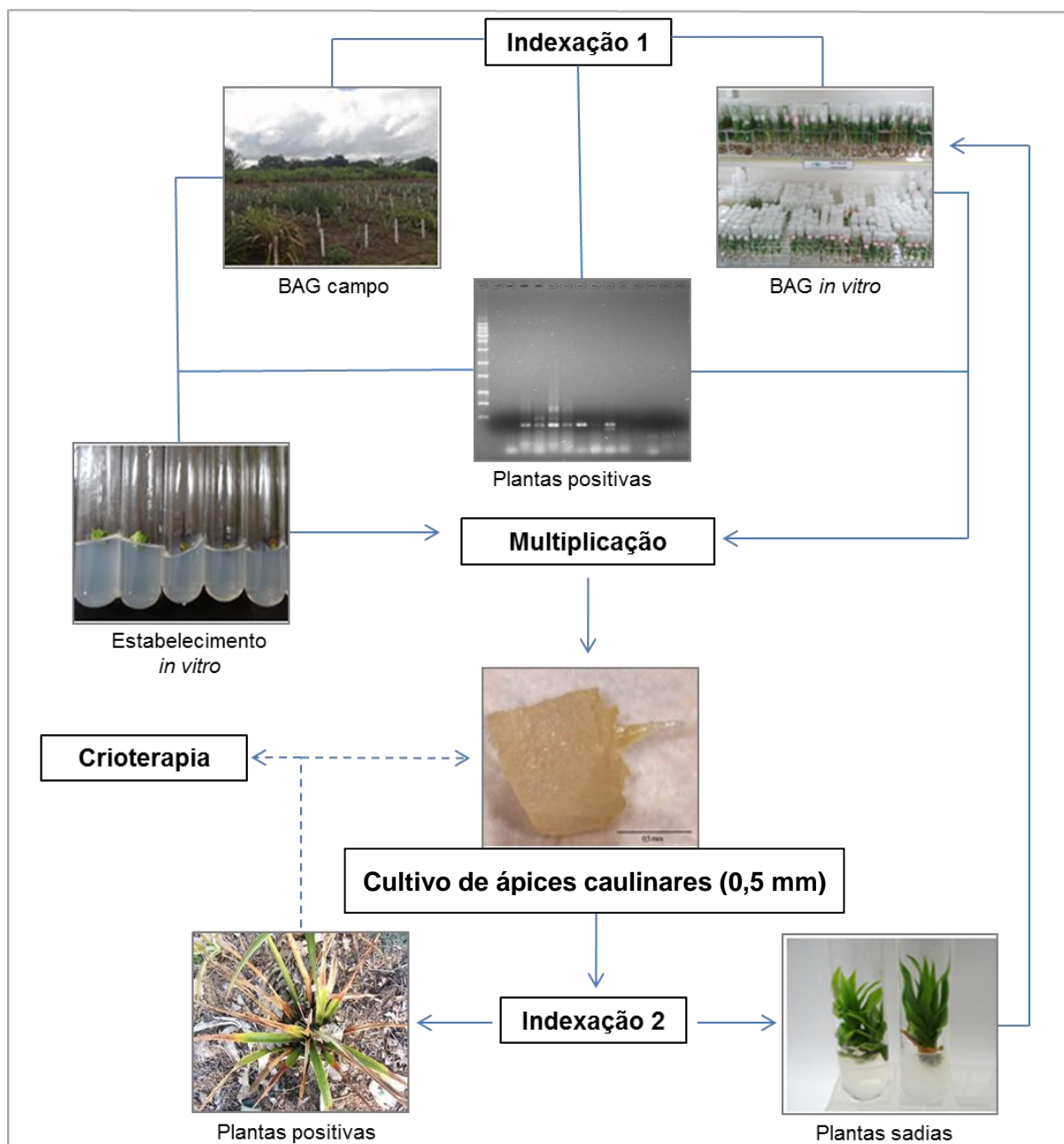


Figura 2. Sequência das etapas realizadas desde a primeira indexação até a obtenção da planta sadia.

2. Indexação

2.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo indicações do fabricante. Cerca de 100 mg de tecido da parte basal da folha foram coletados, homogeneizados em nitrogênio líquido e transferidos para microtubos de 1,5 mL. Foi adicionado 1mL de reagente Trizol® e

as amostras homogeneizadas. Em seguida, adicionou-se 250 μL de clorofórmio, as amostras foram agitadas por 15 segundos e incubadas em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se uma centrifugação a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionados 500 μL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas novamente por 2 minutos em banho de gelo e posteriormente centrifugados a 12.000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C. O pellet obtido foi lavado com etanol 75% e depois em 30 μL de água livre de nucleases. As amostras foram conservadas a -80°C.

2.2 Detecção do PMWaV por RT-PCR a partir de primers degenerados e específicos.

A transcrição reversa (RT) consistiu de duas etapas consecutivas. Durante a primeira etapa, foram adicionados em um microtubo: 5 μg de RNA total, 2pmol de hexâmeros de sequência aleatória e água livre de nucleases, completando o volume para 12 μL . As amostras foram incubadas por 3 min a 70°C e, transferidas imediatamente para o gelo. Na segunda etapa foram adicionados ao microtubo: 4 μL do tampão da reação, 2 μL de ditioneitol (DTT) 0,1M, 1 μL da mistura de dNTPs a 10mM; 1 μL (200U) da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen). A reação final foi incubada a 37°C por 1 h e em seguida a 70°C por 10 min. A região genômica de interesse foi amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), inicialmente visando detectar a presença do vírus, sem objetivar identificar quais os tipos virais, bem como reduzir o tempo do processamento e os custos com reagentes foi utilizado um par de oligonucleotídeos degenerados desenhados conforme Santos et al.(2008), (PW deg R: 5'- YGC CYA RAW AGT TAT CKC C -3' e PW deg F: 5'- TAY STS SWW AAA TTR AAA CC 3'), posteriormente as amostras positivas para o PMWaV passaram por uma segunda etapa de indexação a qual objetivou identificar qual (is) os tipos virais presentes em cada acesso. Para tanto, foram utilizados *primers* específicos para o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (SETHER et al., 2001; SETHER et al., 2005).

Vale ressaltar, que a indexação por *primers* degenerados foi realizada antes do cultivo de ápices caulinares, pois se tratava de 158 acessos e com um número

tão grande de amostras o custo seria elevado, assim, após o cultivo de meristema foi realizada a indexação por *primers* específicos apenas para as amostras que permaneceram positivas.

Tanto para oligonucleotídeos degenerados quanto para os específicos foi acrescentado 2,5µL do cDNA, 5µL do tampão da PCR (200mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mMKCl), 3µL de MgCl₂ 25mM, 1µL da mistura de dNTPs a 2,5 mM cada, 0,5µL (1U) da Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo. O volume da reação foi completado para 50µL adicionando-se água livre de nuclease. O processo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos que envolvem as etapas sequenciais de desnaturação (94 °C/ 45s) e (94 °C/3min), anelamento dos *primers* (48°C/45s) e extensão (72 °C/1 min). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde os primeiros resultados publicados com dália (MOREL; MARTIN, 1952), o cultivo de meristema tem sido frequentemente utilizado para a obtenção de plantas livres de vírus. O sucesso de erradicação, no entanto, depende de inúmeros fatores, que envolvem desde os ápices caulinares, até a origem da planta, gênero e natureza do vírus.

No presente trabalho, dos 158 acessos que foram indexados por *primers* degenerados, 11 oriundos do BAG *in vitro* e 8 do BAG em campo apresentaram resultados positivos para o vírus. As plantas provenientes da coleção *in vitro* foram subcultivadas em meio de multiplicação, enquanto que os acessos do campo tiveram que ser introduzidos por meio do cultivo de gemas axilares de coroas para a obtenção das plantas *in vitro*, para depois entrarem na rota de multiplicação e, posteriormente de limpeza viral.

O número de plantas obtidos da etapa de multiplicação encontra-se na Tabela 1 e variou entre os acessos. O objetivo nesta etapa foi a obtenção de um número mínimo de plantas para passarem pelo cultivo de ápices caulinares, garantindo pelo menos três repetições de cada acesso a fim de confirmar a limpeza viral do acesso.

O desenvolvimento dos ápices caulinares foi lento e o período até a emergência de uma planta inteira com folhas que pudessem ser retiradas para a segunda indexação variou de 90 a 150 dias, a depender do acesso. O comportamento variado entre acessos na conservação *in vitro* de abacaxi já foi relatado por Souza et al.(2006), principalmente no que se refere aos intervalos entre subcultivos e que pode se repetir na fase de estabelecimento.

Na Figura 3, ápices caulinares em início de desenvolvimento podem ser vistos com 30 dias após a inoculação em meio de cultura.

Dos 19 acessos que foram positivos para a presença do vírus e foram encaminhados para o cultivo de ápices caulinares, 17 tornaram-se livres do complexo viral da murcha do abacaxizeiro, ou seja, 90% de eficiência.

O tamanho do meristema já foi descrito em vários estudos, como um fator crucial para que se obtenha êxito. Em trabalho com mandioca, Souza et al.(2009), revelam que o meristema deve conter o domo meristemático acompanhado de dois primórdios foliares, o que determina um meristema em torno de 0,2 a 0,3 mm. Segundo Biswas et al.(2007), em morango para que a remoção do vírus seja obtida, o meristema deve estar entre 0,3 e 0,5 mm. Em orquídea o tamanho indicado é de 1mm contendo dois primórdios foliares (ALTAFIN et al.,2003).

Atualmente, diversos trabalhos aliam o cultivo de ápices caulinares a outras estratégias de limpeza como termoterapia e crioterapia. Em relação à termoterapia, em abacaxi, Sether et al. (2001) afirmam que as coroas que passaram pela termoterapia antes da excisão dos brotos não garantiram gemas livres do vírus.

Entretanto, o primeiro sucesso no uso de criopreservação de ápices com a finalidade de regenerar plantas livres de vírus foi relatado com enxerto de *Plumppoxpoty virus* e *Prunus* (BRISON et al.,1997). A eficácia da crioterapia para eliminação de vírus em diversas culturas tem sido detectada em alguns estudos. Esta técnica foi utilizada para erradicar sete grupos independentes de vírus e dois tipos de bactérias patogênicas em batata (*Solanum tuberosum* L.); batata-doce (*Ipomea batatas* [L.] Lam); videira (*Vitis vinifera* L.); *Citrus* spp., *Prunus* e de bananeira (*Musa* L. spp) (WANG, et. al., 2008).

Souza et al. (2012) comprovaram que a simples introdução das plantas *in vitro* por gemas axilares, no caso do abacaxi, não é suficiente para remover tecidos infectados, e portanto, livrar a planta do patógeno. Por outro lado, em

plantas de abacaxi, o ápice caulinar oriundo da planta *in vivo* é extremamente aquoso e difícil de ser excisado. O uso deste tecido extraído da planta *in vitro* se constituiu em uma estratégia alternativa e que trouxe resultados promissores e pode ser utilizado como metodologia de rotina. Os acessos do BAG de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram introduzidos sem indexação prévia para esse vírus com base em uma diagnose apenas visual, ou seja, plantas assintomáticas. Com a possibilidade do uso do RT-PCR para a indexação do complexo viral a partir de *primers* degenerados, a indexação das plantas conservadas tornou-se uma das metas da curadoria. Para tanto, o desenvolvimento de um protocolo que pudesse garantir a limpeza viral das plantas com resultados positivos, como estratégia de salvaguardar, inclusive os acessos de campo que ainda não tinham sido introduzidos *in vitro*, é extremamente importante.

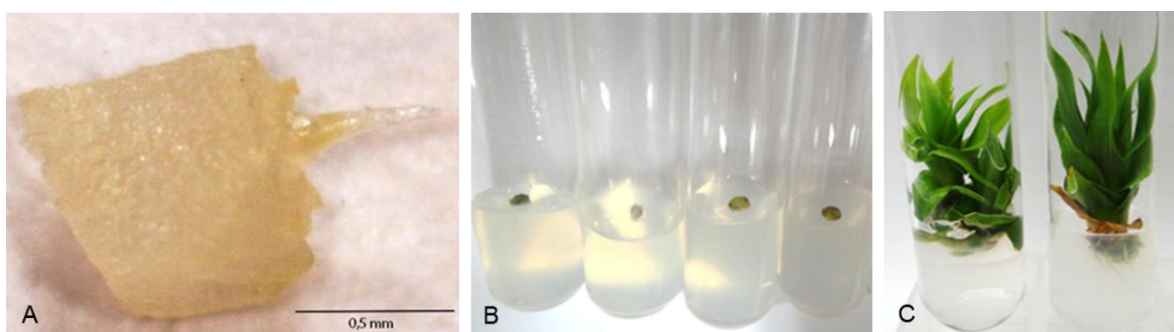


Figura 3. Sequência do cultivo de ápices caulinares desde a excisão com 0,5 mm (A), já em desenvolvimento após 30 dias de inoculação em meio de cultura (B) e plantas já desenvolvidas para a segunda indexação e comprovação de limpeza do vírus (C). Fotos: Helder Lima Carvalho.

Os resultados obtidos com o cultivo de ápices caulinares excisados com aproximadamente 0,5 mm mostraram que 90% dos acessos do BAG nos quais foi detectada a presença do PMWaV ficaram livres deste patógeno, sendo que apenas os acessos BGA 181 e BGA 190 permaneceram contaminados, conforme detectado pelo segundo teste de indexação. Na Figura 4 pode ser visualizado o gel do teste de indexação de 4 dos 17 acessos que ficaram livres de vírus (BGA10, BGA 16, BGA 45 e BGA 17). O resultado desta indexação demonstrou a ausência dos três tipos virais nas plantas avaliadas. Somente os controles

positivos das reações apresentaram fragmentos correspondentes ao seu tamanho esperado, ou seja, 592pb, usando como padrão o marcador 1Kb (Ludwig).

Os resultados indicam a eficiência e a viabilidade da técnica do cultivo de ápices caulinares de plantas *in vitro* para a limpeza clonal de abacaxi afetado por PMWaV, apesar de não se ter obtido 100% de eficiência no presente trabalho.

Por outro lado, Souza et al.(2009), em trabalho com abacaxi obtiveram uma taxa de 50% de limpeza e, a mesma foi considerada relevante já que não se utilizou nenhuma estratégia acessória. No presente estudo também não foi utilizada nenhuma estratégia complementar de limpeza viral, a exemplo da termoterapia e da crioterapia. Dessa forma, uma taxa de 90% é considerada extremamente positiva.

A indexação por *primers* específicos nos acessos que se mantiveram contaminados (BGA 181 e BGA 190) revelou a presença de dois tipos virais, o PMWaV-1 e PMWaV-2, (Figura 5 A-B). Sether et al. (2001) comprovaram que ambos os tipos virais estão bastante disseminados no mundo inteiro, tanto em plantas de abacaxi sintomáticas quanto assintomáticas, sendo que 80% e 100% das infecções sintomáticas em abacaxi são provocadas pelo PMWaV-1 e PMWaV-2, respectivamente. Demonstrou também, que a eliminação do PMWaV-1 foi conseguida por meio do cultivo de gema apical e lateral, resultados diferentes dos que foram obtidos por Souza et al.(2009), que só obtiveram êxito após o cultivo de ápices caulinares a partir de plantas *in vitro*.

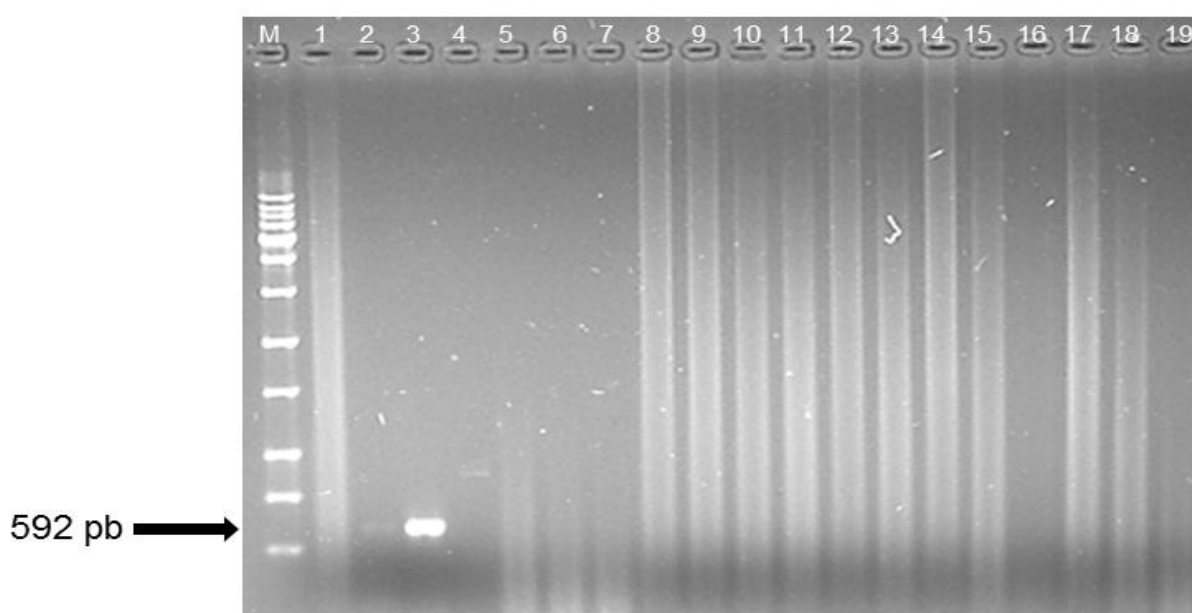


Figura 4. Perfil eletroforético da 2ª Indexação de plantas de abacaxi do BAG *in vitro* quanto ao PMWaV por RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados. Marcador 1Kb (Ludwig); 1: água (controle da reação); 2: sadia (controle negativo); 3: controle positivo (híbrido Ajubá 13A); 4 – 7: acesso BGA 10; 8 – 10 : acesso BGA 16; 11 - 15: acesso BGA 45; poços 16 – 19: acesso BGA 47.

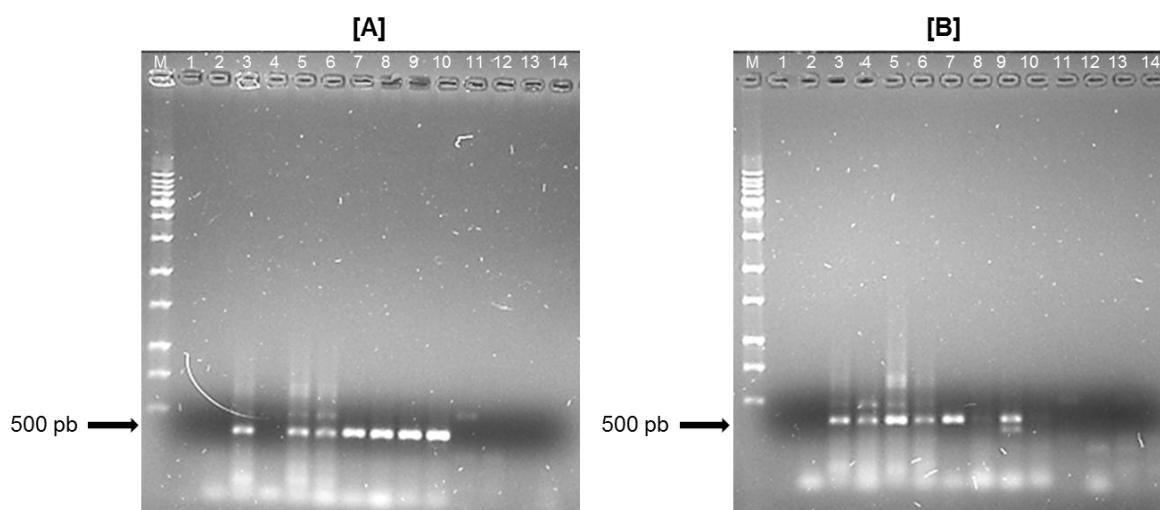


Figura 5. A - B) Perfil eletroforético da 2ª Indexação das plantas de abacaxi dos acessos BGA 181 e BGA 190 pertencentes ao BAG *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura quanto aos tipos virais 1, 2 e 3 do PMWaV por RT-PCR.

M - Marcador 1Kb (Ludwig); 1: água (controle da reação); 2: sadia (controle negativo); 3: controle positivo *primer* específico Tipo 1 (472 pb); 4 - 6: acesso BGA 181 (Figura A) e acesso BGA 190 (Figura B); 7: controle positivo *primer* específico Tipo 2 (436pb) (Figuras A e B); 8 – 10: acesso BGA 181 (Figura A) e acesso BGA 190 (Figura B); 11: controle positivo *primer* específico Tipo 3 (495pb) (Figuras A e B); 12 – 14: acesso BGA 181 (Figura A) e acesso BGA190 (Figura B).

CONCLUSÃO

A técnica de cultivo de ápices caulinares obtidos de plantas *in vitro* é considerada eficiente para limpeza de acessos contaminados pelo PMWaV em abacaxizeiro e pode ser usada como técnica de rotina em laboratórios de cultura de tecidos.

REFERÊNCIAS

- ALTAFIN, V. L.; MENEZES, M. O. PITOMBO, L. M. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para a propagação massal**. Espírito Santo do Pinhal, 2003. 14 p. (Boletim Técnico nº 7)
- BISWAS, M. K.; HOSSAIN, M.; ISLAM, H. Virus free plantlets production of strawberry through meristem culture. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.6, n. 6, p. 757-763, 2007.
- BRAGA, F. T.; NUNES, C. F. FAVERO, A. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. D.; CASTRO, E. D. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 2, p. 128-132, 2009.
- BRISON, M.; BOUCAUD, M. T.; PIERRONNET, A.; DOSBA, F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Poty virus, **Plant Science**, v. 123, n. 1, p. 189-196, 1997.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.FAOSTAT Database Gateway – FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>> Acesso em: 17 fev. 2014.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; Micropropagação. IN: TORRES, A.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 99 -169.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia – LFDGV /CCA/UFSC**. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 2006. 41p.
- MATOS, A. P.; JUNGHANS, D. T.; ANDRADE, E. C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre doenças do abacaxi no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. (Org.) **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. P. 107-117.

MELZER, M. J.; SETHER, D. M.; KARASEV, A. V.; BORTH, W.; HU, J. S. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Virology**, v. 153, n. 4, p. 707-714, 2008.

MENEZES JÚNIOR, F.O.G.M. Garlic *in vitro* culture for clonal recovering virus-free plants. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n. 2, p. 158-167, 2011.

MOREL, G. T; MARTIN, C. Guérison de dâlias atteints duna maladie um vírus. **Académie des Sciences**, v 235, n. 21, p. 1324-1325, 1952.

SANCHES, N. F.; SIMÃO, A.; GOMES, D.; TAVEIRA, M. O.; MAGALHÃES, M. **Monitoramento da murcha do abacaxizeiro associada à cochonilha *Dysmicoccus brevipes* em áreas de sistema de produção**. 2010. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documentos_193.pdf> Acesso em: 8 jan. 2014.

SANTOS, K. C. **Incidência e prevalência das espécies do *Pineapple mealybug wilt-associated virus* no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura e em Nove Estados Brasileiros**. 2013. 72f. (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.

SANTOS, M. T. **Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro***. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

SETH, D. M.; HU, J. S. Corollary analyses of the presence of pineapple mealybug wilt associated virus and the expression of mealybug wilt symptoms, growth reduction, and/or precocious flowering of pineapple. In: **Phytopathology**, v. 88, p.80, 1998.

SETH, D. M.; KARASEV, A. V.; OKUMURA, C. ARAKAWA, C.; ZEE, F.; KISLAN, M. M.; BUSTO, J. L.; HU, J.S. Differentiation, distribution, and elimination of two different Pineapple mealybug wilt associated viruses found in pineapple. **Plant Disease**, v. 85, n. 8, p. 856-864, 2001.

SETHER, D. M.; MELZER, M. J.; BORTH, W. B.; HU, J. S. Genome organization and phylogenetic relationships of pineapple mealybug wilt associated virus-3 with other family members Closteroviridae. **Virus Genes**, v. 38, n. 3, p. 414-420, 2009.

SETHER, D. M.; MELZER, M. J.; BUSTO, J.; ZEE, F.; HU, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampelo viruses in pineapple. **Plant Disease**, v. 89, p. 450-456. 2005.

SETHER, D.M.; HU, J.S. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 928-935, 2002.

SILVA NETO, S. P.; SILVA, M. S. **Cultura de Tecidos no Controle de Viroses da Bananeira no Brasil**, 2009.

SOUZA, F. V. D. SOARES, T. L.; CABRAL, J. R. S.; REINHARDT, D. H.; SILVA, J. L. C.; BENJAMIM, D. A. Slow-grow conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**, n.702, p. 41-47, 2006.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIN, E.P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7, 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: JUNGHAS, T. G.; SOUZA, A. S. (Org.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. P. 177-205.

WANG, Q.; CUELLAR, W.J.; RAJAMÄKI, M. J.; HIRATA, Y; VALKONEN, J. P. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. **Molecular Plant Pathology**, v.9, n.2, p. 237-250, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliar plantas de 66 acessos de abacaxi conservadas durante 10 anos em condições de crescimento lento, o presente trabalho constatou que as plantas de todos os acessos retomaram o crescimento em meio de multiplicação, viabilizando seu resgate. As diferenças observadas entre os acessos e entre as variedades botânicas corroboraram o que outros trabalhos já haviam relatado, mas a possibilidade de se manter os acessos avaliados sem subcultivar durante a conservação por 24 meses significa uma mudança de estratégia no manejo do Banco de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura e a possibilidade de fazer um planejamento mais adequado para a manutenção dos acessos *in vitro*.

No que se refere à ocorrência de variação somaclonal na variedade botânica *Ananas comosus var. bracteatus*, vale ressaltar que o comportamento dos genótipos parece ter sido um fator determinante para as taxas de variação. Essa variedade tem apresentado os maiores números de subcultivos ao longo do tempo de conservação, o que pode ter influenciado nesse resultado. Dessa forma, faz-se necessário um aprofundamento dos estudos que permitam identificar as verdadeiras causas dessas variações para ajustar o protocolo para esses materiais. No entanto, considerando que o percentual de variação total dentre os acessos avaliados foi de 12,5% é possível destacar a eficiência do protocolo de conservação utilizado.

Por outro lado, a possibilidade de tornar isentas do vírus plantas infectadas pelo complexo viral da murcha do abacaxizeiro a partir do cultivo de ápices caulinares provenientes de plantas *in vitro*, possibilita o estabelecimento de uma coleção sadia e passível de ser intercambiada. A associação da criogenia ao cultivo de meristema pode ser uma estratégia a ser testada para isentar do vírus os acessos que se mantiverem contaminados. Como não foram usados *primers* específicos para todos os acessos avaliados não é possível fazer nenhum tipo de

inferência sobre os tipos virais e a capacidade de limpeza sobre cada tipo viral pelo cultivo dos ápices caulinares.

Os resultados obtidos neste trabalho são de aplicação prática para o manejo da coleção *in vitro* de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

ANEXOS

Anexo A. Médias (M), desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos 66 acessos de *Ananas comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *comosus* e *A. comosus* var. *erectifolius* em função dos cinco subcultivos.

Variedades	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Subcultivo 3	
	$x \pm s$	CV (%)	$x \pm s$	CV (%)	$x \pm s$	CV (%)
<i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	4,5 ± 3	56	15,1 ± 9	57,2	41 ± 21	49,8
<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	7,0 ± 2	35	41,5 ± 32	77	135 ± 21	154,8
<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>	5,5 ± 3	48	24,0 ± 18	73,6	63 ± 58	92
<i>Ananas comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	5,5 ± 3	60	28,5 ± 21	72	59 ± 31	51,8

Variedades	Subcultivo 4		Subcultivo 5	
	$x \pm s$	CV (%)	$x \pm s$	CV (%)
<i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	53 ± 35	65	59,4 ± 41	69
<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	152 ± 195	128	266,8 ± 382	143
<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>	123 ± 186	151	192 ± 229	119.6
<i>Ananas comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	164 ± 38	23	61	-

Anexo B. Protocolo de Extração de DNA(MURRAY; THOMPSON, 1980)

Soluções reagentes (mL)	10	20	30	40	50	80	100
CTAB, 10 % (mL)	2	4	6	8	10	16	20
NaCl, 5 M (mL)	4	8	12	16	20	32	40
Tris HCl 1M pH 8,0 (mL)	1	2	3	4	5	8	10
EDTA 0,5 M (mL)	0,4	0,8	1,2	2	2	2	2
2-mercaptoetanol 4,0 % (mL)	0,4	0,8	1,2	1,6	2	3,2	4
PVP 2,0 % (g)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,6	2,0
H ₂ O milli-Qq. s. p. (mL)	2	2	50	50	50	50	50

* adicionar na hora da extração de DNA (40 µL 2-mercaptoetanol/1mL de tampão)

1. Coletar as folhas de plantas, de preferência jovens e saudáveis, evitando-se áreas atacadas por pragas e doenças.
Extração de DNA – PROCEDIMENTOS:
2. Pesar 300 mg do tecido vegetal, usar almofariz na presença de nitrogênio líquido, macerar o tecido usando micro-pistilo.
3. Adicionar 1,0 mL da solução tampão de extração previamente aquecida (65°C). Esperar a mistura adquirir a forma líquida e transferir para um microtubo de 2,0 mL.
4. Adicionar 100,0 µL de SDS 20%
5. Incubar os microtubos em banho-maria a 65°C/60 min., homogeneizar a cada 10 min.
6. Esfriar em temperatura ambiente.
7. Adicionar igual volume à solução [clorofórmio: álcool-Isoamílico (24:1)] vortexar rapidamente até formar uma emulsão.
8. Centrifugar 10.000 rpm/10min
9. Retirar o sobrenadante e transferir para novos tubos (eppendorf 1,5 mL)
10. Adicionar 20 µL de Acetato de sódio 3,0M
11. Adicionar $\frac{3}{4}$ volume de isopropanol. Misturar gentilmente até notar a formação de uma “nuvem DNA”
12. Centrifugar 10.000 rpm/10min.
13. Descartar o sobrenadante. Lavar o pellet com 500 µL de etanol 70% gelado.
14. Centrifugar 10.000 rpm/3min (Caso o pellet não fique aderido no microtubo)
15. Resuspender o pellet em 100 µL de tampão [TE+ RNase (10 mg/mL)]. Encubar a 37°C na estufa.
16. Precipitar o DNA com 10 µL de Acetato de sódio 3,0M + 200 µL de etanol gelado manter as amostras durante 10 min. -20°C.
17. Centrifugar 10.000 rpm/10min.
18. Secar o pellet em temperatura ambiente (para remoção do etanol)
19. Resuspender o pellet (50-100) µL de tampão TE
20. Conservar a solução estoque a -20°C

Os tubos e ponteiros contaminados com **fenolclorofórmio** devem ser descartados em recipiente apropriado.