



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



RONILZE LEITE DA SILVA DA CONCEIÇÃO

ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE
GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIROS

Feira de Santana – BA

2018

RONILZE LEITE DA SILVA DA CONCEIÇÃO

**ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO DE
GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Claudineia Regina Pelacani

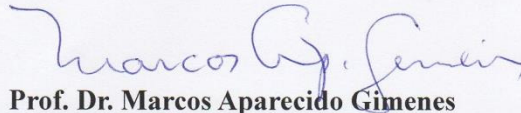
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Coorientador: Prof. Dr. Everton Hilo de Souza

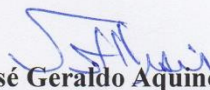
Feira de Santana – BA

2018

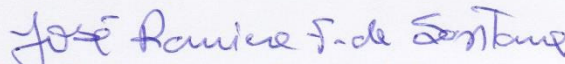
BANCA EXAMINADORA



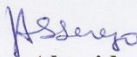
Prof. Dr. Marcos Aparecido Gimenes
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen)



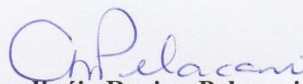
Prof. Dr. José Geraldo Aquino Assis
(Universidade Federal da Bahia - UFBA)



Prof. Dr. José Raniera Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Profa. Dra. Janay Almeida dos Santos Serejo
(EMBRAPA Mandioca e Fruticultura)



Profa. Dra. Claudinéia Regina Pelacani Cruz
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

C745 Conceição, Ronilze Leite da Silva da
Estratégias para conservação de germoplasma de abacaxizeiros / Ronilze
Leite da Silva da Conceição. – 2018.
86 f.: il.

Orientadora: Claudineia Regina Pelacani.

Coorientadores: Fernanda Vidigal Duarte Souza, Everton Hilo de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa
de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.

1. Ananas comosus (L.) Merr. 2. Conservação. 3. Germoplasma de
abacaxi. 4. Criopreservação – grãos de pólen. I. Pelacani, Claudineia Regina,
orient. II. Souza, Fernanda Vidigal Duarte, coorient. III. Souza, Everton Hilo
de, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU: 582.564

À Deus, razão maior de minha existência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém se faz sozinho: sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor. A todos vocês, que compartilharam dos meus ideais, dedico essa vitória com a mais profunda gratidão e respeito” (Autor desconhecido).

A Deus, pela dádiva da vida, por ter sonhado junto comigo e permitido que concretizasse esse objetivo. Sei que estiveste comigo a cada passo dessa caminhada, na qual em muitos momentos pude experimentar e sentir o teu poder sobrenatural! Minha eterna gratidão!

À minha amada mãe, por ter oportunizado o maior de todos os aprendizados, o de como amar intensamente as pessoas, a vida e cada coisa que se faz! Você sempre foi o meu exemplo de fibra e fé! Te amo eternamente! Obrigada por tudo!

À minha família, em especial aos meus filhos, pelos quais mantive o desejo de galgar novas metas e nunca desistir dos meus sonhos. Saibam que vocês são a razão de minha vida, presentes divinos que mudaram o rumo de minha existência! A vida acadêmica é para muitos, inconciliável com filhos, mas apesar de todos os desafios e dificuldades que existiram... faria tudo de novo, com vocês e por vocês! Os amo infinitamente!!! Não posso deixar de mencionar o pai dos meus filhos, Marinho, pois reconheço que a despeito das dificuldades enfrentadas, você foi alguém que esteve ao meu lado, me ajudou e incentivou a ir além nos estudos! Muito obrigada!

Aos meus irmãos, por serem parte de mim! Pela torcida e por me apoiarem sempre! Em especial, a Vivi, que desde a infância lia para mim e ensinava os deveres de casa! Obrigada!

Ao meu pai, pelo apoio e por todo incentivo! Muito obrigada!

À minha saudosa avó Eurídice, por ter sido a minha primeira professora, me ensinando a gostar de livros muito antes de ir à escola! Você foi meu exemplo e é a saudade que carrego no peito! Te amo para sempre!

À minha avó Edgardilinda, por seu carinho, exemplo de fé, por todo incentivo e torcida! Te amo!

À Conce, por abrir as portas para a realização deste sonho ainda no Ensino Médio, saiba que sua atitude mudou o rumo de minha história! Muito obrigada por ter feito tanto por mim!

À Dra. Fernanda Vidigal, por desde o mestrado ter sido o meu exemplo de profissionalismo e humanidade! Nunca saberei como agradecê-la pelo modo como me acolheu, me orientou e me fez enxergar outras possibilidades, contribuindo sempre e muito para o meu crescimento pessoal e profissional! Sei que Deus a colocou em meu caminho e que tinha que ser você... mãe de quatro filhos como eu, com uma imensa capacidade de compreender e amar, alguém com quem me identifiquei desde o primeiro momento e que estará para sempre em meu coração! MUITÍSSIMO Obrigada! Saiba que tentarei seguir sempre o seu exemplo!

À Dra. Claudineia, por ter aceitado me orientar e por firmar essa parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura! Agradeço imensamente pela oportunidade, pelo apoio e, principalmente por possibilitar que a minha formação pudesse ser concluída na mesma instituição onde também comecei minha graduação! Saiba que tenho um imenso carinho e muita admiração por você! Muito obrigada por tudo!

Ao amigo Everton Hilo, por ter me ajudado a vencer os grandes desafios dessa trajetória! Você me acompanhou, me orientou e me ensinou muito... não apenas saberes acadêmicos, mas aprendi muito com seu jeito de ser abnegado, generoso, amigo e com sua capacidade singular de se doar pelo outro! Sem a sua ajuda teria sido mais difícil! Nenhuma palavra poderá expressar o quanto você foi importante nessa caminhada! Você é um profissional excelente em tudo que faz e é um modelo que tentarei seguir! MUITÍSSIMO Obrigada!

À minha amiga e irmã de coração Taliane, alguém em quem encontrei apoio, atenção, carinho e com quem também muito aprendi! Tenho certeza, que como afirmou Voltaire, todas as grandezas da vida não valem a sua amizade! Obrigada por tudo! Sei que posso contar com você e que seu coração é enorme!

À querida amiga e irmã de fé Cíntia Paula, nunca saberei agradecer por seu apoio, carinho e ajuda nessa caminhada! Você alegrou meus dias, suavizou meus fardos e chorou comigo! Obrigada de coração!

À minha amiga Eliana Passos, o meu muito obrigada! Sei que sem a sua ajuda seria muito difícil... você que esteve comigo e buscou me ajudar em situações delicadas pelas quais passei nesse momento tão especial da minha vida! Obrigada pela amizade e carinho! Sou eternamente grata!

Às amigas de infância Vanessa, Janaina e Núbia, por terem crescido comigo e, principalmente por nunca terem se distanciado! Vocês estão sempre em meu coração e fazem a minha trajetória mais feliz pelo simples fato de existirem! Obrigada!

À minha querida Dal, a quem posso também chamar de mãe, saiba que as lições que aprendi com você estão sempre comigo! Você é muito especial para mim! Obrigada sempre!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, com os quais compartilhei momentos maravilhosos...Fabiana Aud, Tânia, Gabriela, Rafa, Bruna, Patrícia, Taíse, Vagner, Manassés, Pedro, Jamile, Adinael, em especial a Amanda, Hélder e Jossivanio por terem me auxiliado! Muito obrigada!

As colegas de curso, em especial Daiane e Verônica, pelo companheirismo durante essa árdua jornada!

Aos funcionários da equipe de campo abacaxi, em especial aBenedito (Cata), com quem trabalhei mais de perto e se mostrou sempre disposto a ajudar, realizando o seu trabalho com muito profissionalismo e amor, muito obrigada por tudo!

Aos professores que muito contribuíram para a minha formação desde a educação infantil, Gracinha, Eliana, Derle, Vera, Joanice, Jaime, Ide, Iara, Honorato, Paulo César, Rita Fadigas, Romilson, Carlos Vidal, Wellington, Isabel

Câmara e tantos outros que foram grandes mestres, em especial a minha professora da alfabetização, Isabel Cristina, que marcou minha vida, ainda lembro das aulas suas como se fosse agora! Muito obrigada!

Aos professores do curso de doutorado, em especial a Dra. Claudineia e Dr. Ranieri, com os quais muito aprendi! Muito obrigada!

Aos irmãos de fé, pela torcida, apoio e pelas muitas orações que sei que fizeram por mim! Vocês moram em meu coração! Obrigada!

Aos colegas de trabalho que viabilizaram o meu afastamento para estudar: Alzira, Eron, Eliana e Rogério! Muito obrigada!

À amiga Iara, por desde o mestrado tanto ter se doado e apoiado a realização desse sonho! Nunca saberei agradecer! Obrigada!

Às tias Lindaura, Gracy e Conce, pelo incentivo! Obrigada!

Às primas, sobrinhas, sobrinhos e cunhadas que torceram e apoiaram essa conquista! Muito obrigada!

Aos proprietários dos Quintais urbanos, por terem contribuído muito para a realização deste trabalho que culminou com a publicação de um dos artigos desta Tese! Muito obrigada!

À Prefeitura Municipal de Cabaceiras do Paraguaçu, em nome da Ex-secretária de Agricultura Adaídes e do Ex-prefeito Paulo André, pelo apoio em ações importantes deste trabalho. Muito obrigada!

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, por ter oportunizado mais essa conquista! Agradeço pela estrutura física e pelos grandes profissionais que contribuíram para a minha formação!

À Universidade Estadual de Feira de Santana, onde iniciei a minha graduação e estou finalizando essa etapa de minha formação acadêmica!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo PNPB (Edital nº 15/2014) e auxílio financeiro (001);

A todos que de algum modo contribuíram para a realização desse sonho, o meu muito obrigada!

Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.

(Isaac Newton)

Resumo

O abacaxizeiro é uma fruteira tropical de grande importância econômica e sua conservação é primordial para a manutenção de sua variabilidade genética. Em vista disso, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver ou validar estratégias de conservação visando resguardar esse germoplasma. Para tal, foram conduzidos três experimentos. O trabalho de caracterização foi desenvolvido em condições de campo com 46 acessos de diferentes variedades botânicas oriundos do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, caracterizados a partir de 21 descritores morfológicos. Os acessos foram resgatados da conservação *in vitro* após 10 anos de cultivo, objetivando avaliar o efeito do longo tempo na condição *in vitro* sobre as características morfológicas e o ciclo de produção das variedades conservadas. Foi realizado também um experimento com grãos de pólen de abacaxi, visando o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação dessas estruturas. O trabalho foi conduzido com 13 acessos de abacaxizeiros, de quatro variedades botânicas, onde também se avaliou a formação de sementes. Por fim, para a conservação em quintais urbanos, foram selecionados 30 quintais para plantio das mudas de abacaxizeiros, a partir de critérios previamente definidos, usando delineamento inteiramente casualizado e um total de nove mudas por quintal com diferentes potencialidades, seja para ornamentação e/ou consumo. Em relação à caracterização dos acessos provenientes da conservação *in vitro* por dez anos, apenas os acessos BGA-003 e BGA-020, ambos pertencentes a variedade *Ananas comosus* var. *bracteatus*, demonstraram instabilidade genética após caracterização morfológica. A criopreservação de grãos de pólen se mostrou possível após um tratamento de desidratação por 6 h em sílica gel com percentuais significativos de germinação *in vitro* e produção de sementes viáveis. Já o modelo de conservação em quintais urbanos, demonstrou que essa estratégia é viável, eficiente e requer um planejamento adequado para que se alcance êxito. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram o avanço na conservação de germoplasma de abacaxi.

Palavras-chave: *Ananas comosus* (L.) Merr. Criopreservação de grãos de pólen. Quintais urbanos. Variação somaclonal.

Abstract

The pineapple plant is a tropical fruiting species of great economic importance, so it is crucial to maintain its genetic variability through conservation programs. Therefore, the general objective of this work was to develop and validate conservation strategies to protect this germplasm. For that purpose, three experiments were conducted. The characterization work was carried out in field conditions with 46 accessions of different botanical varieties, obtained from the Germplasm Bank of the Embrapa Cassava and Fruits research unit, based on 21 morphological descriptors. The accessions were recovered from *in vitro* conservation after culture for 10 years, to evaluate the effect of long culture periods on the morphological traits and production cycle of the conserved varieties. An experiment was also carried out with pineapple pollen grains, aiming to develop a cryopreservation protocol for these structures. This experiment was conducted with 13 accessions of four botanical varieties, where the seed formation was also assessed. Finally, conservation in urban gardens was analyzed, involving selection of 30 yards for planting pineapple seedlings, according to previously defined criteria of the homeowners. The experimental design was completely randomized with a total of nine seedlings per yard with different potential uses (ornamentation and/or food). With respect to the accessions kept under *in vitro* conservation for 10 years, only accessions BGA-003 and BGA-020, both belonging to the variety *Ananas comosus* var. *bracteatus*, demonstrated genetic instability based on the morphological characterization. The cryopreservation of the pollen grains was possible after dehydration treatment for 6 hours on silica gel, with good *in vitro* germination rates and production of viable seeds. Finally, the model of conservation in urban gardens was viable, although requiring careful planning for efficiency. The results obtained support improved preservation of pineapple germplasm.

Keywords: *Ananas comosus* (L.) Merr. Cryopreservation de pollen grains. Urban gardens. Somaclonal variation.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA EM CONDIÇÕES DE CAMPO PARA VALIDAÇÃO DA CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> POR DEZ ANOS DE GERMOPLASMA DE ABACAXI	17
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2 - CRYOPRESERVATION OF POLLEN OF WILD PINEAPPLE ACCESSIONS	44
INTRODUCTION	45
MATERIALS AND METHODS	46
RESULTS	50
DISCUSSION	53
REFERENCES	63
CAPÍTULO 3 - URBAN BACKYARDS AS A NEW MODEL OF PINEAPPLE GERMOPLASM CONSERVATION	68
INTRODUCTION	70
MATERIALS AND METHODS	71
RESULTS	74
DISCUSSION	78
REFERENCES	82

Introdução Geral

A cultura do abacaxizeiro

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) está entre as frutas tropicais mais apreciadas no Brasil e no mundo. Pertencente à família *Bromeliaceae* e ao gênero *Ananas*, se constitui no mais importante membro desta família, no que se refere aos aspectos socioeconômicos (SANEWSKI, 2009). É a sexta fruta mais consumida, além de ser um símbolo das regiões tropicais e subtropicais (CRESTANI et al., 2010).

O gênero *Ananas* é formado por duas espécies, *Ananas macrodontes* E. Morren, a qual é considerada uma espécie específica e *Ananas comosus* (L.) Merril, a qual está dividida em cinco variedades botânicas: *A. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal, *A. comosus* (L.) Merr. var. *parguazensis* (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). Sendo que *A. comosus* var. *comosus*, é a principal forma cultivada e inclui todas as cultivares plantadas no mundo.

A produção global da fruta atingiu 25,81 milhões de toneladas métricas em uma área plantada de 1,04 milhão de hectares em 2014 (FAOSTAT, 2018). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, com uma produção de 2,69 milhões de toneladas e que pode ser encontrada na forma de cultivo na maioria dos estados do país (FAOSTAT, 2018).

Na indústria, o fruto é explorado por possuir propriedades medicinais, alimentícias e cosméticas, além de ser utilizado na produção de fibras usadas na indústria de automóveis e na fabricação do papel e outros produtos (BENETT, 2000; ZAH et al., 2007; SENA NETO et al., 2013). Suas características ornamentais veem se destacando nos últimos anos e podem ser usados como flores de corte, plantas de vaso, para paisagismo ou como minifrutos (SOUZA et al., 2007; 2012, 2014a). Vale ressaltar, que atualmente o fruto vem sendo destaque como tendência, tanto na moda das passarelas, como pode ser visto estampado em roupas, calçados, objetos de papelaria e decoração.

O centro de origem e diversidade genética está na América do Sul, mais precisamente, na sua região central, que engloba países como Brasil, Paraguai e Andes (GIACOMETTI; FERREIRA,1987). O Brasil é considerado o mais importante centro de origem e diversidade, uma vez que, todas as espécies do gênero *Ananas* se encontram vegetando em território nacional, nas formas silvestres ou cultivadas (FERREIRA; CABRAL, 1993). Isso traz uma enorme responsabilidade da nação, no que se refere à conservação genética de um gênero tão importante.

Dentre as doenças que afetam a cultura, a fusariose e a murcha do abacaxizeiro são as mais preocupantes. A fusariose é causada pelo fungo *Fusarium gutiforme* Nirenberg & O'Donnelle em nível nacional leva a perdas que são superiores a 30 % da produção (OLIVEIRA et al., 2011). A podridão dos tecidos infectados pelo fungo comprometem tanto o desenvolvimento vegetativo das plantas, quanto o material propagativo (MATOS et al., 2009; VERZIGNASSI et al., 2009). Embora a doença possa ocorrer em qualquer órgão e estágio fenológico da planta, o fruto é o local que apresenta maior incidência, onde se manifesta a exsudação gomosa (CARVALHO et al., 2006). Vale destacar, que uma vez que introduzido em uma determinada região, o fungo se dissemina facilmente, seja pela chuva, vento ou mesmo através de agentes polinizadores (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). As medidas de controle do fitopatógeno comumente utilizadas são a redução do inóculo inicial, seguida do controle químico (MATOS, 2003), no entanto, algumas formas alternativas têm sido empregadas e investigadas visando a eficácia e a sustentabilidade (DELIOPOULUS et al., 2010).

Por sua vez, a infecção pelo vírus da murcha (PMWaV- Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus) associado à colchonilha (*Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*), também causa perdas consideráveis em vários países produtores e no Brasil (HU et al., 1997; MEISSNER FILHO et al., 1998; BORROTO et al., 1998) e vem sendo amplamente estudado (HU et al., 1995; SETHER et al., 2001).

No Brasil, o vírus tem se disseminado muito, de modo que a doença vem causando perdas consideráveis nos estados produtores, de 30 % em média, podendo atingir em casos mais drásticos até 90 % (SANCHES; DIAMANTINO, 1997; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). Os números são alarmantes também em

outros países produtores, sendo que, no Havaí estima-se uma diminuição de 30 a 55% na produção dos frutos, enquanto na Austrália e China estima-se uma redução de 10% a 20%, respectivamente, no valor anual total da produção (YU et al., 2015).

Os sintomas comumente apresentados por uma planta infectada são percebidos na diminuição do porte, nas folhas com pontas secas e avermelhadas, na fragilidade e na pequena quantidade de raízes, o que pode culminar na morte da mesma (VELAME et al., 2004). São três raças virais, caracterizadas pela diferença na sequência e organização do genoma, de modo que se pode falar em 3 tipos de vírus, o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (MELZER et al., 2008; SETHER et al., 2009), todos pertencentes a família *Closteroviridae* e ao gênero *Ampelovirus* (SETHER et al., 2005). Além destes, já existem relatos na literatura de mais duas raças, o PMWaV-4 e PMWaV-5, os quais ainda não tiveram seus genomas completamente sequenciados (SETHER et al., 2005; GAMBLEY et al., 2008).

Dentre as técnicas comumente usadas para promoção da limpeza viral, estão o cultivo de ápices caulinares, a termoterapia e a crioterapia. Na crioterapia, as células infectadas são eliminadas por um efeito letal da temperatura ultra baixa, seguida do descongelamento, sem a necessidade de remoção mecânica (WANG; VALKONEN, 2009). A termoterapia não tem sido empregada atualmente, pois não é considerada eficiente para a remoção do vírus em abacaxizeiro (HU et al., 1995; HU et al., 1997). Já o cultivo de ápices caulinares, em tamanhos extremamente reduzidos ($\leq 0,5$ mm) tem sido utilizado como estratégia de limpeza dos genótipos infectados, pois a não vascularização dos tecidos na região do domo meristemático, garante que o vírus não esteja presente. Em trabalho objetivando a limpeza viral em abacaxi a partir desta técnica, SILVA et al. (2014) utilizando o cultivo de ápices caulinares de abacaxizeiro excisados com 0,5 mm obteve 80 % dos acessos em estudo livres deste patógeno. Estudos mais recentes têm comprovado esses resultados (GUERRA, 2017).

Conservação do Germoplasma de Abacaxizeiro

A) Conservação em campo e *in vitro*

As ações antrópicas, principalmente, por meio de desmatamento de grandes áreas e a tendência para a monocultura, com substituição de cultivares locais por melhoradas, além de pragas e doenças, tem causado erosão genética no gênero *Ananas* (CABRAL et al., 1999; CABRAL et al., 2004).

Enquanto a diversidade genética permite que as culturas respondam aos desafios do futuro (DAWSON et al., 2011), que podem ir desde novas pragas e doenças até câmbios climáticos. A erosão genética, por outro lado, ocasiona o estreitamento da base genética das espécies e, conseqüentemente, as tornam geneticamente vulneráveis, pois reduz a capacidade de adaptação às mudanças ambientais (HAMMER; TEKLU, 2008), o que demonstra a importância da conservação, caracterização, avaliação e todas as estratégias que permitam resguardar o germoplasma de abacaxi.

Nesta perspectiva, os trabalhos de caracterização são fundamentais, pois permitem identificar e registrar características morfológicas, bioquímicas, moleculares e citogenéticas com pouca influência ambiental. Além disso, possibilitam a obtenção de informações mais precisas e detalhadas acerca do germoplasma conservado, as quais são fundamentais para condução de programas de melhoramento genético (CABRAL et al., 2004; Souza et al., 2014b).

Além disso, a conservação do germoplasma é o modo mais adequado para minimizar os efeitos da erosão genética, sendo que, no caso do abacaxizeiro é feita em condição de campo e *in vitro*, envolvendo um trabalho contínuo e de longo prazo, demandando investimentos em mão-de-obra, tempo, instalações, sem contar a operacionalidade que se justifica em função da necessidade de conservação deste importante recurso vegetal (JARAMILLO; BAENA, 2000).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui o maior Banco de Germoplasma de Abacaxi do mundo, com mais de 700 acessos em condições de campo (SOUZA et al., 2012) dos quais, mais de 50 % também possuem duplicata de segurança *in vitro* (SILVA et al., 2016).

Este banco começou a ser estabelecido há quarenta anos, sendo que as coletas foram realizadas em todo o Brasil e em países vizinhos, além disso, muitos acessos são fruto de doações e intercâmbio (SOUZA et al., 2012).

Os mais de 700 acessos pertencem à espécie *Ananas comosus*, composta por cinco variedades botânicas (*A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var.

parguazensis, *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *microstachys* e *A. comosus* var. *Erectifolius*) e à outra espécie, *A. macrodontes*.

A conservação *ex situ* viabiliza a manutenção de plantas fora do seu ambiente natural e engloba um conjunto de medidas e ações que devem ser empregadas para o êxito dessa modalidade de preservação, com destaque para a caracterização e documentação do material conservado (VALOIS, 1996).

Deste modo, vale destacar que o gerenciamento de um Banco Ativo de Germoplasma – BAG, deve também buscar trabalhar e explorar de forma exaustiva os usos e direcionamentos que se dá ao que está sendo conservado, sem perder de vista que cada coleção deve ter como foco principal a minimização da erosão genética e da perda da biodiversidade. Para Draper et al. (2004), trata-se não apenas de uma questão de estudo, mas de uma prioridade em escala mundial.

Assim, o BAG de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, dada sua grande importância no cenário mundial, tem atuado de forma ativa e dinâmica na conservação do germoplasma de abacaxi, empregando para tanto, estratégias diferenciadas e que possam ser duplicatas de segurança eficientes. Tem se buscado, não apenas a melhoria das estratégias em andamento, mas formas alternativas de conservação (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018a; 2018b).

Dentre elas, uma importante estratégia que permite diminuir a perda de diversidade genética do gênero é a conservação *in vitro*, a qual de acordo com Engelmann (2011), apresenta vantagens como: manutenção de um grande número acessos em pequeno espaço; isenção dos riscos e das intempéries que existem em condições de campo e, possibilidade de intercambiar material vegetal de modo seguro e com mais facilidade. Esta estratégia de conservação vem sendo utilizada em muitas espécies de importância econômica, principalmente nas propagadas de forma assexuada, como: mandioca (FUKUDA, 2005); abacaxi (SOUZA et al., 2006); banana (SOUZA et al., 2010) e batata (RITSCHER et al., 2010)

No âmbito do BAG de Abacaxi, a conservação *in vitro* vem sendo realizada a partir da abordagem de crescimento lento, quando se estabelecem condições de cultivo que reduzem a atividade metabólica da plantas impactando diretamente no seu crescimento. Entretanto, ainda assim, existe a necessidade de se proceder

aos subcultivos periódicos, aumentando o labor e os custos dessa forma de conservação. Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal que não é interessante para a conservação.

Esta modalidade de conservação tem se constituído em uma alternativa complementar à conservação em condições de campo com mais de 50 % da coleção em campo do BAG-Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, encontra-se também estabelecida *in vitro*, como duplicatas de segurança. O protocolo utilizado foi validado por Silva et al., (2016) que avaliou plantas de abacaxi conservadas *in vitro* por 10 anos e constatou que, apesar de um intervalo entre subcultivos de 24 meses, todos os acessos puderam ser resgatados, permitindo a consolidação de um protocolo que vem sendo usado de forma rotineira no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, a fim de se ampliar o número de acessos conservados *in vitro*.

B) Criopreservação

Outra estratégia de conservação que vem sendo aplicada ao abacaxi é a criopreservação em nitrogênio líquido a ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), permitindo a conservação por longo prazo, onde todas as divisões celulares são interrompidas, permitindo a manutenção do material vegetal sem alterações por longos períodos de tempo e processos metabólicos. Esta técnica tem sido empregada para ápices caulinares (SOUZA et al., 2015; 2018), polén (SILVA et al., 2017) e apresenta testes em andamento para semente no BAG-Abacaxi.

Para Benson et al. (2008) os fatores cruciais para o sucesso da técnica, ou seja, para a sobrevivência do material, são o estado da água e também os crioprotetores utilizados, isso porque, as propriedades físico-químicas da água são vitais para as funções celulares.

A criopreservação requer pequeno espaço para o armazenamento (estruturas pequenas), sem constantes intervenções e necessidade de manutenção, além de proteção contra contaminação, no entanto, o preparo do material para o congelamento é uma etapa crucial para o êxito nos resultados (BENSON, 2008).

Para criopreservação de ápices caulinares de abacaxi, os protocolos empregados utilizam técnicas como: vitrificação (MARTINEZ-MONTERO et al.,

2012) eencapsulamento-vitrificação (GAMEZ-PASTRANA et al., 2004). Sendo que, um dos mais recentes, desenvolvido por Souza et al.,2016, promove o congelamento de ápices caulinares provenientes de plantas *in vitro*.

Em grãos de pólen, a criopreservação vem sendo empregada com êxito para a conservação da diversidade genética de muitas espécies como: bromélias (SOUZA et al., 2015), azeitona (ALBA et al., 2011), orquídeas (VENDRAME et al., 2008), abacaxi (SILVA et al., 2017), dentre outras.

Armazenar grãos de pólen é fundamental quando se objetiva realizar hibridações de espécies que apresentam distinção de períodos de floração, preservação da variabilidade genética e transporte de material biológico (DANNER et al., 2011; SILVA et al., 2017). Segundo Silva et al. (2017), para grãos de pólen, a criopreservação poderá ser empregada como uma alternativa na conservação da variabilidade genética do gênero *Ananas* e para resolver problemas de assincronia de florescimento em acessos de abacaxi silvestre, sendo vital para a condução de programas de melhoramento genético.

Vale ressaltar, que a criopreservação dá suporte também para utilização da crioterapia, permitindo a erradicação de patógenos, seja vírus, fito plasmas, bactérias, entre outros, sendo um método biotecnológico eficaz para a limpeza de plantas infectadas (WANG; VALKONEN, 2009). A possibilidade de a partir de uma mesma técnica, se chegar a dois objetivos distintos, neste caso, à conservação de germoplasma em longo prazo e à eliminação do vírus causador da murcha do abacaxizeiro, é uma estratégia extremamente interessante e que pode resultar em aplicações práticas de grande impacto, não apenas para a conservação, mas também para o melhoramento genético e na produção de mudas do abacaxizeiro em larga escala.

A criopreservação de sementes também é uma estratégia que vem sendo empregada com êxito para várias culturas, inclusive em outras bromeliáceas e embora comercialmente, o abacaxizeiro não seja propagado via sementes, já que existe autoincompatibilidade, ou baixa fertilidade entre as variedades (CABRAL et al., 2003), do ponto de vista do melhoramento genético e da manutenção da variabilidade genética da cultura, a criopreservação de sementes se justifica e pode ser uma ferramenta complementar muito interessante.

C) Conservação Participativa

Além dos modos de conservação comumente utilizados e apresentados anteriormente, estratégias inovadoras de conservação participativa têm sido aplicadas com êxito em países europeus e nos EUA, buscando aliar a conservação dos recursos genéticos com a rentabilidade econômica de pequenos produtores (USDA, 1998; Veteläinen et al., 2009; RCS, 2009; Negri et al., 2012a; Negri 2012b; ECPGR, 2017).

Este modelo de conservação participativa, se constitui em uma interessante possibilidade de conservação de germoplasma, principalmente porque, deve ser uma meta para bancos de germoplasma, ampliar o envolvimento de pessoas em trabalhos dessa natureza, o que normalmente está restrito ao curador e a poucos auxiliares. Considerando que, um aspecto relevante, quando se trata da conservação de recursos genéticos, é a necessidade de fazê-lo de modo sustentável e com o envolvimento da sociedade.

Vale destacar que, quanto maior o número de pessoas envolvidas na conservação do patrimônio genético, maior a probabilidade de êxito, bem como, maiores as chances de que esse patrimônio se torne uma posse também das gerações futuras.

Carvalho et al. (2002), afirmam que o envolvimento dos interessados no processo de conservação, principalmente agricultores, é uma ação relevante, pois seu envolvimento na execução de tal tarefa fará com que todos os membros da comunidade se interessem, inclusive os jovens, que desde cedo passarão a se sentir responsáveis pela preservação dos recursos naturais.

Silva et al. (2018), em uma nova abordagem para a conservação de abacaxizeiros, os quintais urbanos de conservação, atestaram a efetividade deste modelo de conservação, desde que se observem aspectos como: planejamento, acompanhamento e perfil adequado dos guardiões.

Em vista disso, os objetivos desse trabalho foram: I) Avaliar os efeitos da conservação *in vitro* de acessos do BAG-Abacaxi, mantidos por 10 anos em condições de crescimento lento, sobre as características morfológicas das plantas em campo. II) Estabelecer uma metodologia para a conservação de grãos de pólen de abacaxi. III) Estabelecer parâmetros para a criação de células de conservação de germoplasma de abacaxi em quintais urbanos.

Referências

ALBA, V.; BISIGNANO, V.; ALBA, E.; STRADIS, A.; POLIGNANO, G. B. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 7, p. 977-982, 2011.

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

BENSON E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Cap 2.p.15-32, 2008.

BORROTO, E.; CINTRA, M.; GONZÁLEZ, J.; BORROTO, C.; ORAMAS, P. First report of a closterovirus - like particle associated with pineapple plants (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) affected with pineapple mealybug wilt in Cuba. **Plant Disease**, v. 2, n. 2, p. 263, 1998.

CABRAL, J. R. S.; JUGHANS, D. T. **Variiedades de abacaxi**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 63).

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.; SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, F. R. **Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi**. In: RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DE PLANTAS PARA O NORDESTE BRASILEIRO, 1999, Petrolina, PE. Anais... Petrolina: Embrapa Semi-Árido, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Brasília-DF, 1999.

CARVALHO, P. C. L.; FILHO, W. D. S. S.; RITZINGER, R.; CARVALHO, J. A. B. Conservação de germoplasma de fruteiras tropicais com a participação do agricultor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, 2001.

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.

CRESTANI, M.; BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; CARVALHO, D. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 6, p.1473 - 1483, 2010.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R.; MALAGI, G. Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, 2011.

DAWSON, T.P.; JACKSON, S. T.; HOUSE, J. I.; PRENTICE, I. C.; MACE, G. M. Beyond predictions: Biodiversity conservation in a changing climate. **Science**, v. 332, n. 6025, p. 53-58, 2011.

DELIOPOULUS, T.; KETTLEWELL, P.S.; HARE, M.C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, v.29, n. 10, p.1059-1075, 2010.

DRAPER, D.; MARQUES, I.; GRAELL, A. R.; MARTINS-LOUÇÃO, F. C. **Conservação de Recursos Genéticos**: O banco de sementes de “António Luís Belo Correia”, Lisboa: Museu Nacional de História Natural. 2004.

ECPGR - ECPGR Concept for on-farm conservation and management of plant genetic resources for food and agriculture. European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources, Rome, Italy, 2017.

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

FAO, FAOSTAT - Agricultural statistics database. World Agricultural Information Center, 2016 Rome. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>> Acesso em: 20 fev 2018.

FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Pineapple germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.334, p.23-26, 1993.

GAMBLEY, C. F.; STEELE, V.; GEERING, A. D. W.; THOMAS, J. E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australasian Plant Pathology**, v. 37, n. 2, p. 95-105, 2008.

GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y.; BERISTAIN, C. I.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. **CryoLetters**, v. 25, n. 6, p. 405-414, 2004.

GIACOMETTI, D.C.; FERREIRA, F.R. Organização e uso de bancos germoplasma de frutíferas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9. 1987, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: SBF, 1987. v.1, p.11-17.

GIORDANI, E.; NAVAL, M.; BENELLI, C. In Vitro Propagation of Persimmon (*Diospyros kaki Thunb.*). **Protocols for Micropropagation of Selected Economically Important Horticultural Plants**, pp. 89-98, 2013.

GUERRA, P.A.; **Criopreservação e crioterapia de ápices caulinares para erradicação do complexo viral associado a murcha (PMWAV) em variedades silvestres do Gênero *Ananas***. Dissertação de Mestrado. Cruz das Almas, UFRB, 2017.

HAMMER, K.; TEKLU, Y. Plant genetic resources: selected issues from genetic erosion to genetic engineering. **Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics**, v. 109, n. 1, p. 15 - 50, 2008.

HU, J. S.; SETHER, D. M.; HARRINGTON, H.; ULLMAN, D. E. Two-step heat treatment of pineapple crowns increases thermotolerance. **HortTechnology**, v.5, n.1, p.63-66, 1995.

HU, J. S.; SETHER, D. M.; LIU, X. P.; WANG, M.; ZEE.F.; ULLMAN, D. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple mealybug wilt-associated virus in Hawaii. **Plant Disease**, v.81, n. 10, p.1150-1154. 1997.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ de recursos fitogenéticos*. Cali: IPGRI-Grupo America, p. 210, 2000.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation: review of sugarcane (*Saccharum spp.*) and pineapple (*Ananas comusus (L.) Merrill*) cases. In: KATKOV, I. (Ed.) **Current frontiers in cryopreservation**, Intech, Croatia, pp. 359-396, 2012.

MATOS, A. P.; SANCHES, N. F.; TEIXEIRA, F. A.; SIMÃO, A. H.; GOMES, D. C.; **Monitoramento da Fusariose em plantios de abacaxi 'Pérola' conduzidos em sistema de produção integrada no Estado do Tocantins**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 37 p. (Documentos/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 184).

MEISSNER FILHO, P. E.; SANCHES, N. F.; NICKEL, O.; VELAME, K. V. C.; VASCONCELOS, A. P. A. **A murcha do abacaxi: métodos diagnósticos e resistência genética**. Cruz das Almas: Embrapa, 1998.

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. **Archives of Virology**, v. 153, n. 4, p. 707-714, 2008.

NEGRI, V. **Policies supportive of on-farm conservation and their impact on custodian farmers in Italy**. In: PADULOSI S, Bergamini N, Lawrence T (eds) *On-farm Conservation of Neglected and Underutilized species: Status, Trends and Novel Approaches to cope with Climate Change*. Rome, Italy: Bioversity International, p. 211 - 216, 2012a.

NEGRI, V.; FASOULA, D.; HEINONEN, M.; MUSAYEV, M.; SPATARO, G.; VETELÄINEN, M.; VÖGEL, R. **European on-farm conservation activities: an**

update from six countries. In: MAXTED N, DULLOO ME, FORD-LLOYD BV, FRESE L, IRIONDO J, CARVALHO MAAP (eds) *Agrobiodiversity Conservation: Securing the Diversity of Crop Wild Relatives and Landraces*. Oxfordshire, UK: CAB International, p. 327–332, 2012b.

OLIVEIRA, M. D. M.; NASCIMENTO, L. C.; PEREIRA, R. L. Incidência de fusariose e avaliação de métodos de inoculação de *Fusarium gutiforme* em folhas de abacaxizeiro. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 1, p. 137-142, 2011.

RCS 2009, Hawaii Backyard Conservation: Ideas for every homeowner. Natural Resources Conservation Service, Second Edition, 2009. Available at: Accessed: 12 Jan. 2014.

SANCHES, N.F.; DIAMANTINO, E.P. Índices de infestação da cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Hemíptera: Pseudococcidae) em abacaxizeiro sob regime de irrigação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16, Salvador, 1997. **Resumos**... Salvador: Sociedade Brasileira de Entomologia, p.220, 1997.

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

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.; 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 relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae Members. **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, n. 5, p. 450-456, 2005.

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

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; JESUS VIEIRA, L.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 326-334, 2017.

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; LEDO, C. A.S.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. D. Urban backyards as a new model of pineapple germplasm conservation. **Plant Genetic Resources**, v. Online, p. 1-9, 2018.

SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; S.; SOUZA, E. H. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (Print), p. 1-11, 2016.

SOUZA, E. H.; COSTA.M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. Selection and use recommendation in hybrids os ornamental pineapple. **Revista Ciências Agronômicas**, v. 45, n. 2, p. 409-416, 2014a.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; BRANCALLEÃO, N.; LEDO, C. A. S.; MARTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 204, n. 1, p. 13-28, 2015.

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

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; BRANCALLEÃO, N.; SILVA LEDO, C. A.; MARTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of

Aechmea bicolor (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 204, n.1, p. 13-28, 2014b.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; SANTOS, O. N.; SANTOSSEREJO, J. A.; FERREIRA, F. R. Caracterização morfológica de abacaxizeiros ornamentais. **Magistra**, v. 19, n. 4, p. 319-325, 2007.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoottips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 351 - 360, 2016.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H.; SILVA, R. L. Cryopreservation of Pollen Grains of Pineapple and Other Bromeliads. In: **Plant Cell Culture Protocols**. Humana Press, New York, NY, 2018a. p. 279-288.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H.; SILVA, R. L. Cryopreservation of Pineapple Shoot Tips by the Droplet Vitrification Technique. In: **Plant Cell Culture Protocols**. Humana Press, New York, NY, 2018b. p. 269-277.

USDA, 1998. Backyard Conservation: Bringing conservation from the countryside to your backyard. <http://www.tn.gov/twra/pdfs/backyardbooklet.pdf>. Accessed 12 Jan 2014.

VALOIS, A. C. C. Conservação de germoplasma vegetal "ex situ". In: Pulgnau JP (Ed.), Conservación de germoplasma vegetal. Montevideo: IICAPROCISUR, p. 7-11. 1996.

VELAME, K. V. C.; MEISSNER FILHO, P. E.; SANTOS, L. S.; PORTUGAL, A. M. Produção de anti-soro contra o vírus associado com a murcha do abacaxizeiro (Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus). **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 3, p. 346-349, 2004.

VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M. M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. **HortScience**, v. 43, n. 1, p. 264 - 267, 2008.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Org.). **Controle de doenças de plantas frutíferas**, v.1, p. 445-509,2002.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Org.). **Controle de doenças de plantas frutíferas**, v.1, p. 445-510,2002.

VERZIGNASSI, J. R. et al. Fusariose do abacaxizeiro no Pará. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 329-330, 2009.

VETELÄINEN, M.; NEGRI, V.; MAXTED, N.; European Landraces: On-Farm Conservation Management and use. Rome, Italy: **Bioversity International**, 2009.

WANG, Q. C.; VALKONEN, J. P. T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication, **Trends in Plant Science**, v.14, n. 3, p. 119 - 122. 2009.

YU, N.; LUO, Z.; FA, H.; ZHANF, Z.; LI, X.; WANG, J.; LIU, Z.; HE, F. Complete genomic sequence of a Pineapple mealybug wilt-associated virus-1 from Hainan Island, China. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 3, p. 611 - 615, 2015.

ZAH, R.; HISCHIER, R.; LEÃO, A. L.; BRAUN, I. Curauá fibers in the automobile industry – a sustainability assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 15, n. 11-12, p. 1032-1040, 2007.

CAPÍTULO 1

Caracterização morfológica em condições de campo para validação da conservação *in vitro* por dez anos de germoplasma de abacaxi

¹Artigo a ser submetido a revista Crop Science.

Caracterização morfológica em condições de campo para validação da conservação *in vitro* por dez anos de germoplasma de abacaxi

Ronilze Leite da Silva¹; Everton Hilo de Souza²; Claudinéia Regina Pelacani¹; Jossivanio Santos de Jesus²; Cintia Paula Feitosa Souza², Amanda Bahiano Passos Sousa², Fernanda V. Duarte Souza³

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

²Capes/Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

³Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Resumo

No Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, a duplicata de segurança *in vitro* com mais de 50 % dos acessos já estabelecidos é uma estratégia eficiente para resguardar esse importante germoplasma. No entanto, existem indícios de que as condições de cultivo *in vitro* podem ocasionar variações somaclonais que interferem no resgate e cultivo dos materiais posteriormente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições de campo, a estabilidade genética de 46 acessos de diferentes variedades botânicas do gênero *Ananas*, após a conservação *in vitro* por um período de dez anos. Plantas dos acessos, ainda na condição *in vitro*, foram indexadas por RT-PCR usando *primers* degenerados (primeira indexação) e específicos, já na condição de plantas aclimatizadas (segunda indexação). Após seis meses de aclimatização, os 46 acessos livres de vírus foram plantados em campo de acordo com os tratos culturais estabelecidos para a cultura. Após o fechamento da última flor, procedeu-se à caracterização morfológica pela

aplicação de 21 descritores, sendo 09 quantitativos e 12 qualitativos. Foi realizada análise multivariada pelo método dos Componentes Principais com auxílio do programa estatístico R e *software* SAS® (*Statistical Analysis System*). O cultivo de ápices caulinares foi eficiente para a promoção da limpeza viral dos três acessos infectados pelo vírus. As análises demonstraram que, após dez anos de conservação *in vitro*, os acessos apresentaram um ciclo de produção normal, com variações genéticas identificadas apenas nos acessos BGA-003 e BGA-020, ambos pertencentes a *Ananas comosus* var. *bracteatus*. Alguns acessos dessa avaliação não se agruparam com seus correspondentes do BAG em campo, principalmente devido aos dados quantitativos. Isso deve-se ao maior vigor dessas plantas, por serem oriundas da cultura de tecidos e estarem livres de vírus. Apesar dessas diferenças, os resultados demonstraram a estabilidade morfológica dos acessos conservados e permitem a validação da conservação *in vitro*, como uma estratégia segura e eficiente para a conservação de germoplasma do abacaxizeiro.

Palavras-chave: Vírus da murcha. Aclimatização. Cultivo de ápices caulinares. BAG Abacaxi.

Morphological field characterization for validation of 10 years of *in vitro* pineapple germplasm conservation

Abstract

In the Pineapple Active Germplasm Bank of the Embrapa Cassava and Fruits research unit (Embrapa Mandioca e Fruticultura), the *in vitro* maintenance of security duplicates of more than 50% of the accessions is a strategy adopted to safeguard this important germplasm. However, there are indications that the *in vitro* culture conditions can cause somaclonal variations that can impair subsequent cultivation. The objective of this work was to evaluate the genetic stability, in field conditions, of 46 accessions of three botanical varieties of *Ananas sp.*, conserved *in vitro* for a period of 10 years. These 46 accessions, still under *in vitro* condition, were indexed based on degenerate primers (first indexation) and specific primers (second indexation) by RT-PCR. After acclimatization for six months, the 46 accessions were planted in a field. After closing of the last flower, the plants' morphology was analyzed according to 21 descriptors (09 quantitative and 12 qualitative). The results were submitted to mixed principal component analysis using the R program and software SAS[®] (Statistical Analysis System). The culture of stem tips was efficient for viral cleaning of the three infected accessions. The experiments demonstrated that after *in vitro* preservation for 10 years, the plants presented a normal production cycle, with morphological variations only being identified in accessions BGA-003 and BGA-020, both belonging to the variety *Ananas comosus* var. *bracteatus*. These results demonstrate the morphological stability of the preserved accessions and validate

the *in vitro* conservation technique as an efficient strategy for preservation of pineapple germplasm.

Keywords: Mealybug wilt-associated virus. Pineapple. Acclimatization. Culture of stem tips. BAG pineapple.

Introdução

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Abacaxi) foi estabelecido há quarenta anos, a partir de intercâmbio e diversas coletas realizadas, não apenas no território nacional, mas também em outros países vizinhos (SOUZA et al., 2012). Este BAG é o maior do mundo com mais de 700 acessos conservados em condição de campo, se destacando dentre outras importantes coleções, a exemplo do CIRAD-FLHOR, na Martinica; da coleção do United States Department of Agriculture (USDA), no Havaí e, da coleção do Bioplants Centre, Ciego de Ávila, em Cuba (PAZ et al., 2012).

A conservação *in vitro* é uma estratégia acessória fundamental no BAG de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, já que os mais de 700 acessos de abacaxizeiros conservados em condições de campo (SOUZA et al., 2012) estão suscetíveis ao ataque de pragas, doenças e perda por alterações climáticas. Além disso, a conservação *in vitro* apresenta as vantagens de redução de espaço físico para a manutenção de um grande número de acessos, diminuição dos riscos aos quais os acessos estão sujeitos em condição de campo, além da possibilidade de assegurar intercâmbio de material com segurança (ENGELMAN, 2011; SILVA et al., 2016).

O Banco *in vitro* de Abacaxi começou a ser estabelecido em 2003, visando o estabelecimento de uma duplicata de segurança para reposição de acessos perdidos em campo (SOUZA et al., 2006; SILVA et al., 2016). A estratégia utilizada é a de redução de crescimento por meio da desaceleração do metabolismo das plantas, com a manipulação do meio de cultura, temperatura e intensidade luminosa. O estabelecimento de cópias de segurança dos acessos em condição de crescimento lento tem sido um método bastante viável para salvaguardar o germoplasma de abacaxi, com intervalo de 24 meses entre subcultivos e resgate de acessos viáveis (SILVA et al., 2016).

Entretanto, uma estratégia de conservação eficiente deve considerar a manutenção tanto da viabilidade, quanto da estabilidade genética das plantas. A necessidade de se fazer subcultivos sucessivos e o longo período de cultivo *in vitro* de plantação fatores que podem levar à ocorrência de variação somaclonal,

com consequências para o resgate do acesso (KARP, 1994; BAIRU et al., 2011; SILVA et al., 2016).

Dessa forma, mais do que conservar a variabilidade do gênero *Ananas*, o que se pretende é também avaliar a eficiência da conservação realizada, principalmente em condições de campo, bem como conhecer e explorar amplamente suas potencialidades.

A estabilidade genética e a viabilidade de 66 acessos de abacaxizeiros conservados *in vitro* por dez anos foram avaliadas por Silva et al (2016) e revelaram resultados relevantes para a validação deste tipo de conservação e da dinâmica utilizada pelo BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Porém, é crucial que se avalie também o comportamento morfológico destas plantas quando retomam as condições de crescimento em campo, buscando perceber alterações no fenótipo, ou mesmo no desenvolvimento e no ciclo da planta.

Para tanto, uma importante ferramenta utilizada é a caracterização morfológica, fundamental para o manejo de coleções, pois por meio da coleta de dados é possível a descrição, identificação e diferenciação de acessos dentro de espécies, classes ou categorias, usando descritores adequados (VICENTE et al., 2005; SOUZA et al., 2014).

Com efeito, é imprescindível que os acessos em estudo sejam bem caracterizados e avaliados, tanto a partir de caracteres qualitativos e quantitativos. De acordo com Valls (2007), a caracterização apresenta diversas vantagens, dentre elas: identificar acessos duplicados, estabelecer coleções nucleares e identificar a ocorrência ou não de variabilidade intrínseca entre acessos

Outro aspecto fundamental na conservação de germoplasma de abacaxizeiro diz respeito à fitossanidade das plantas de cada acesso. Estratégias de limpeza têm sido utilizadas na conservação *in vitro*, uma vez que a murcha do abacaxizeiro, causada pelo complexo do PMWaV (*Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus*), tem um efeito devastador nas plantas, causa prejuízos em plantios comerciais e se constitui atualmente em um sério problema para a manutenção da coleção em campo do BAG-Abacaxi, pois tem levado a uma perda significativa de acessos.

Em vista do que foi exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da conservação *in vitro* sobre a morfologia de plantas de abacaxizeiro de

quarenta e seis acessos conservados *in vitro* por dez anos, após aclimatização e retorno às condições de campo, como forma de validar a conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foram utilizados quarenta e seis acessos provenientes da conservação *in vitro* por dez anos, de três variedades botânicas, sendo trinta e sete acessos de *A.comosus* var. *comosus* (BGA-001, BGA-004, BGA-008, BGA-012, BGA-016, BGA-032, BGA-043, BGA-048, BGA-049, BGA-053, BGA-071, BGA-072, BGA-085, BGA-090, BGA-137, BGA-147, BGA-163, BGA-193, BGA-292, BGA-340, BGA-343, BGA-350, BGA-397, BGA-411, BGA-433, BGA-441, BGA-444, BGA-515, BGA-587, BGA-606, BGA-629, BGA-650, BGA-657, BGA-677, BGA-698, BGA-710, BGA-801,); sete acessos de *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-002, BGA-003, BGA-017, BGA-020, BGA-045, BGA-408, BGA-690), um acesso da variedade de *A. comosus* var. *erectifolius* (BGA-739) e um acesso de *Ananas* sp. (BGA-197). As plantas eram mantidas *in vitro*, em tubos de ensaio contendo 15 mL da metade da concentração de sais de MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,4 g L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado em 5,8. As condições de incubação foram de 21 ± 1 °C, intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas.

Indexação e cultivo de ápices caulinares

Os quarenta e seis acessos passaram por duas indexações: a primeira foi realizada para todas as plantas de cada acesso, durante o cultivo *in vitro*.

Entretanto, pela possibilidade de que a titulação do vírus nas plantas *in vitro* pudesse estar muito baixa e direcionar resultados falso-negativos, foi realizada uma segunda indexação com as plantas já aclimatizadas (após os 10 anos), para identificação de possíveis *escapes*.

As plantas positivas para o PMWaV, portanto, entraram na rota de limpeza viral, via cultivo de ápices caulinares, para posteriormente serem aclimatizadas. Para a realização do processo de limpeza viral, os ápices caulinares foram excisados com 0,5 mm 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 μmolm⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Os ápices caulinares permaneceram em cultivo por aproximadamente 200 dias em frascos contendo o mesmo meio de cultura até a regeneração em plantas com tamanho que permitisse a retirada das folhas para nova indexação, a fim de confirmar a limpeza do vírus. Uma terceira indexação foi realizada apenas para os acessos que passaram pelo cultivo de ápices caulinares.

Extração do RNA total para indexação

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

Deteção 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, 2 pmol 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) 0,1 M, 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 ou ausência do vírus, sem objetivar identificar quais os tipos virais e com economia de tempo e recursos, foi utilizado um par de oligonucleotídeos degenerados (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 (SEETHER et al., 2001; 2005).

Aclimatização

As plantas dos quarenta e seis acessos foram aclimatizadas em tubetes contendo substrato Basaplant Hortaliças ® + Fibras de Coco e mantidas em casa de vegetação com luminosidade reduzida para 70 % por um período de seis meses, em temperatura ambiente.

Plantio em campo e caracterização dos acessos

A área para o plantio dos acessos foi escolhida por estar consideravelmente distante do BAG em campo, como garantia de que não houvesse a presença da cochonilha responsável pela transmissão do vírus da murcha do abacaxizeiro, pela disponibilidade de água para irrigação e a sua preparação foi realizada conforme recomendação para a cultura (REINHARDT et al., 1998).

O plantio em campo ocorreu quando as plantas dos acessos atingiram o tamanho mínimo de 25 cm em casa de vegetação. A avaliação foi realizada após o fechamento da última flor e fruto amadurecido no ponto de colheita. Foram aplicados 21 descritores morfológicos publicados pelo "International Board for Plant Genetic Resources" (IBPGR, 1991), sendo nove descritores quantitativos, distribuídos em cinco categorias relacionadas às características da planta: altura (ALT), em (cm), comprimento (CFD) e largura (LFD) da folha "D" (cm), comprimento (CPE) e diâmetro (DPE) do pedúnculo (cm); e seis relacionados ao fruto: comprimento (CSI) e diâmetro (DSI) do sincarpo (cm), peso do sincarpo (PSI) em (g) e °Brix (BRI).

Em relação às características qualitativas foram aplicados doze descritores, cinco deles referentes a características da planta: hábito da planta (HAB), presença/ ausência de espinhos (ESP), cor dos espinhos (CES), variegação das folhas (VAR), presença de antocianina (ANT); e sete relacionadas ao fruto: forma do sincarpo (FSI), forma do ápice das brácteas (FAB), brácteas na base da coroa (BBC), sobreposição das brácteas (SBR), cor da bráctea (CBR), número de cores da coroa (NCC) e formato do ápice da coroa (FAC). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados da caracterização dos respectivos acessos conservados no BAG em campo.

Análise Estatística

Foi realizada uma análise conjunta dos dados qualitativos e quantitativos para determinar a distância genética, com base no algoritmo de Gower (1971). Os acessos foram agrupados hierarquicamente pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), a partir da distância euclidiana média entre todos os acessos. A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (r) (SOKAL; ROHLF, 1962).

Foi realizada também uma análise *Biplot* dos Componentes Principais para avaliar a relação entre as variáveis quantitativas estudadas e qual(is) dessas contribuíram para a variação total disponível entre as espécies, assim como examinar como se agruparam os dados referentes a esses acessos e os que constam no registro do BAG em campo. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (CHAVENT et. al., 2017) e software SAS® (SAS Institute, 2010).

Resultados e Discussão

A primeira indexação foi realizada com plantas *in vitro* dos quarenta e seis acessos conservados por dez anos. Nessa primeira indexação todas as plantas foram negativas para o complexo viral PMWaV. Uma segunda indexação, realizada com todos os quarenta e seis acessos após aclimatização, já demonstrou que três acessos (BGA-16, BGA-45 e BGA-441) estavam infectados (Figura 1A). O objetivo dessa segunda indexação foi exatamente identificar algum tipo de *escape* em relação à indexação realizada com as plantas *in vitro*, uma vez que a titulação viral pode estar muito baixa e impedir a detecção do vírus, ainda

que o RT-PCR seja uma técnica bastante sensível. Esses três acessos entraram na rota de limpeza via cultivo de ápices caulinares (Figura 1B) e, após regeneração das plantas (Figura 1C), foi realizada nova indexação, demonstrando eficiência da limpeza, já que todos estavam negativos para o complexo viral (Figura 1D).

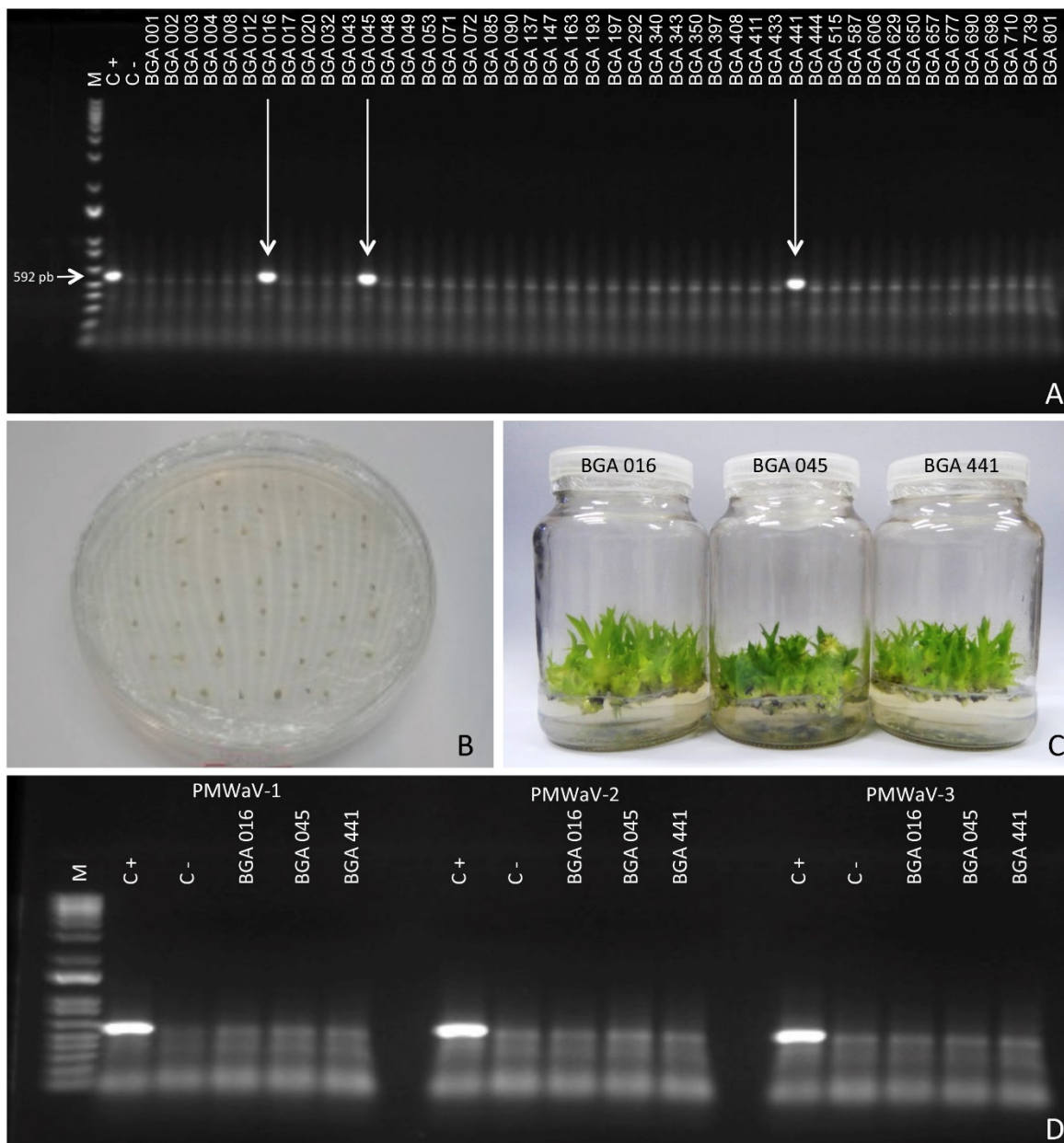


Figura 1. A) Indexação realizada após aclimatização para detecção do complexo viral PMWaV em 46 acessos do BAG conservados *in vitro* por dez anos a partir de *primers* degenerados. B) Cultivo de ápice caulinar do acesso BGA-016. C) Regeneração dos três acessos aos 200 dias de cultivo dos ápices caulinares. D) Indexação por *primers* específicos (PMWaV-1, 2 e 3) dos três acessos, após o cultivo de ápices caulinares comprovando a limpeza do complexo viral.

De acordo com Niehl e Heinlein (2011), o vírus da murcha se distribui nos tecidos do floema da planta infectada e não na região do domo meristemático. Desse modo, o sucesso da técnica está relacionado com o tamanho dos ápices, pois quanto menores forem as dimensões, maior será a chance de isolar apenas a região do domo meristemático e eliminar a região vascularizada, na qual encontra-se o vírus (BISWAS et al., 2007).

Outro aspecto importante é que a ausência de métodos diretos para controle da disseminação do vírus da murcha demanda por ações que minimizem os efeitos da infecção. De modo que, os métodos de detecção e identificação do vírus, tanto em plantas quanto em vetores, desempenham um papel crítico na gestão da doença (NAIDU; HUGHES, 2001). Por isso, os protocolos de detecção e limpeza viral já fazem parte da rotina do banco de abacaxi, como forma de barrar a disseminação do vírus e resguardar o germoplasma sadio.

As diferenças das plantas livres de vírus em relação ao BAG do campo eram visíveis, com plantas apresentando elevado vigor em todo o ciclo de produção (Figura 2A-B). A aplicação dos descritores morfológicos para caracterização quantitativa e qualitativa dos acessos advindos da conservação *in vitro* após plantio em campo demonstrou que, para a maioria das variáveis quantitativas, as médias foram superiores às dos acessos correspondentes caracterizados no Banco Ativo de Germoplasma (Tabela 1). Para as análises qualitativas não foram observadas diferenças entre as plantas conservadas *in vitro* e as plantas do BAG em campo, com exceção do BGA-003 e BGA-020 que não apresentaram sincarpo, impossibilitando dessa forma uma caracterização das características do fruto (Tabela 2).

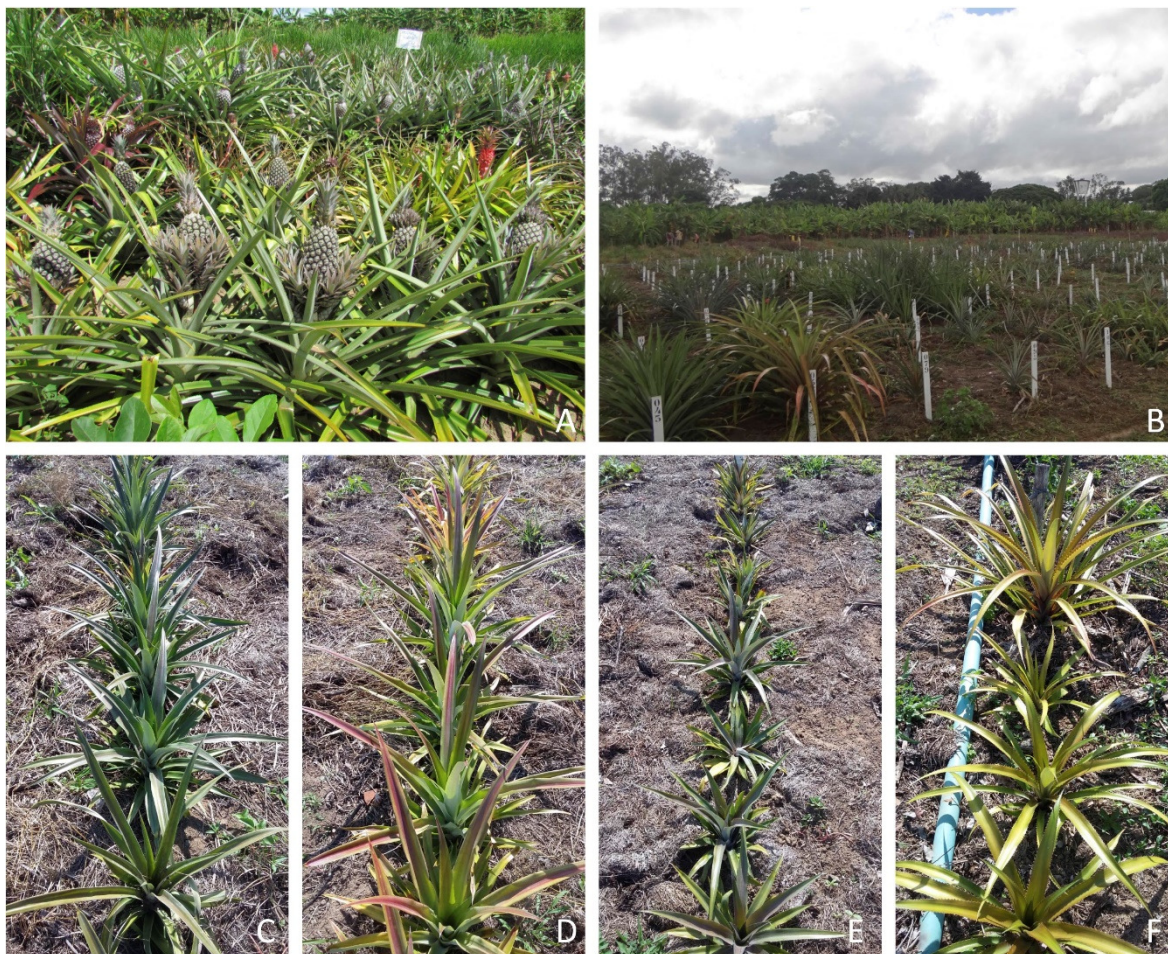


Figura 2. A) Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi (BAG Abacaxi) livre do PMWaV após conservação *in vitro* por dez anos. B) BAG em campo. C-F) Acessos perdidos em campo e recuperados a partir do BAG *in vitro* e isentas do PMWaV (C) BGA-049; (D) BGA-071; (E) BGA-515 e (F) BGA -587.

Tabela 1. Caracterização morfológica quantitativa dos acessos de abacaxizeiro provenientes da conservação *in vitro* (BGL) por dez anos em comparação com a caracterização do BAG em campo (BGC).

ACESSO	ALT (cm)		CFD (cm)		LFD (cm)		DPE (cm)		CPE (cm)		° BRX		PSI (g)		CSI (cm)		DSI (cm)	
	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC
BAG-001	62,0	43,0	67,0	78,0	5,0	6,5	3,0	3,0	27,0	23,5	14,0	13,0	1692,0	1909,0	27,0	23,3	13,0	12,7
BAG-002	105,0	97,0	100,0	104,0	5,0	5,3	2,0	1,7	28,0	19,9	-	-	-	-	6,5	5,5	6,3	5,8
BAG-003	64,0	90,5	63,0	85,0	4,0	4,4	2,0	1,7	29,0	28,0	-	-	-	-	*	*	*	*
BAG-004	109,0	51,0	126,0	116,0	5,0	5,8	3,0	3,2	38,0	25,5	13,0	11,5	3119,0	820,0	19,0	11,5	13,0	11,4
BAG-008	95,0	43,0	103,0	81,0	6,0	5,4	3,0	2,0	31,0	30,0	12,0	13,0	1664,0	1151,0	21,0	16,2	12,0	11,6
BAG-012	97,0	49,0	90,0	110,0	6,0	5,5	3,0	2,0	27,0	29,5	11,0	9,0	2318,0	994,0	21,0	14,5	11,0	11,2
BAG-016	69,0	40,5	72,0	80,0	6,0	4,5	3,0	3,0	23,0	24,5	16,0	12,6	1505,0	716,0	18,0	13,9	13,0	11,3
BAG-017	98,0	89,5	104,8	102,0	5,0	4,9	1,8	1,4	41,0	28,2	-	-	-	-	8,0	7,3	8,0	5,7
BAG-020	68,5	85,0	64,4	99,3	4,0	4,4	2,0	2,0	20,0	27,3	-	-	-	-	*	*	*	*
BAG-032	76,0	30,0	90,0	69,5	4,0	4,8	3,0	2,4	27,0	69,5	14,0	9,8	1460,0	1136,5	19,0	16,0	11,0	11,0
BAG-043	78,0	46,0	74,0	82,0	4,0	5,2	3,0	2,8	32,0	16,0	16,0	13,3	1776,0	1593,5	19,0	16,8	12,0	12,8
BAG-045	95,0	85,0	103,0	95,0	5,0	4,4	3,2	1,9	29,0	27,0	-	-	-	-	8,0	7,2	7,5	6,7
BAG-048	82,0	34,0	80,0	58,5	5,0	4,5	3,0	2,0	21,0	16,5	15,0	15,8	1383,0	1041,5	17,0	14,4	11,0	11,2
BAG-049	78,0	65,0	62,0	52,0	4,5	3,4	6,0	4,3	29,0	26,7	15,0	13,0	1468,0	1080,0	18,4	14,2	11,7	8,1
BAG-053	63,0	46,0	69,0	72,5	5,0	5,8	3,0	2,4	25,0	25,5	17,0	12,3	910,0	1338,0	16,0	15,3	11,0	12,9
BAG-071	84,0	71,0	92,0	80,0	4,7	4,2	2,4	2,1	24,0	22,5	18,0	16,3	1050,0	874,0	16,4	14,0	10,3	8,5
BAG-072	64,0	37,0	85,0	59,5	6,0	5,8	3,0	2,1	31,0	15,0	14,0	15,5	1424,0	956,0	24,0	15,0	13,0	11,0
BAG-085	81,0	48,0	86,0	76,0	5,0	6,0	4,0	2,1	19,0	29,0	14,0	13,0	2502,0	1269,0	17,0	22,5	12,0	10,5
BAG-090	73,0	39,0	82,0	58,0	9,0	5,0	3,0	1,8	27,0	17,0	15,0	12,7	1612,0	902,0	18,8	13,5	13,0	11,1
BAG-137	80,0	89,5	98,0	166,5	3,7	8,5	3,5	2,6	24,0	15,0	11,5	-	2250,0	6800,0	21,0	38,0	12,5	28,0
BAG-147	57,0	31,0	59,0	66,0	3,1	5,0	7,2	2,0	22,8	17,0	18,0	12,0	1338,0	1308,0	13,0	21,0	15,0	11,0
BAG-163	85,0	64,0	88,0	113,0	4,0	6,0	3,0	3,0	39,0	38,0	14,0	13,0	2098,0	1223,0	21,0	16,0	12,0	12,0
BAG-193	81,0	66,0	70,0	65,0	4,0	5,0	4,0	1,0	25,0	25,0	14,0	11,0	1278,0	1145,0	18,0	17,0	11,0	11,0
BAG-197	40,0	45,5	33,0	35,0	3,0	3,08	1,3	0,5	27,0	31,3	-	-	-	-	4,8	3,8	4,0	3,4
BAG-292	95,0	61,0	96,0	71,0	6,0	5,0	3,0	3,0	23,0	28,0	13,0	11,0	1350,0	869,0	23,0	15,0	14,0	11,0
BAG-340	72,0	58,0	77,0	67,0	4,0	4,0	2,0	2,0	28,0	26,0	16,0	15,0	1716,0	992,0	20,0	17,0	12,0	10,0
BAG-343	73,0	46,0	78,0	63,0	4,0	4,5	2,0	2,5	28,0	27,5	15,0	13,0	884,0	1002,0	17,0	20,0	10,0	10,0
BAG-350	70,0	52,0	77,0	84,0	3,0	6,0	3,0	3,0	16,0	20,0	14,0	12,0	841,0	1124,5	18,0	21,0	11,0	11,0
BAG-397	49,0	45,0	58,0	80,0	5,0	6,0	2,0	2,7	14,0	16,0	17,0	15,0	572,0	1075,0	19,0	19,0	11,0	10,5
BAG-408	67,0	104,0	90,0	103,0	4,8	5,0	2,2	2,6	39,0	36,4	-	-	-	-	12,0	**	8,6	**
BAG-411	74,0	50,0	97,0	89,0	6,0	7,0	2,0	3,0	18,0	20,0	12,0	13,0	1352,0	1082,0	20,0	16,0	12,0	11,0
BAG-433	84,0	43,0	83,0	76,0	6,0	6,0	3,0	2,0	33,0	24,0	12,0	12,0	1477,0	1146,0	20,0	16,0	12,0	11,3
BAG-441	64,0	42,5	62,0	75,5	5,0	5,5	2,0	3,0	28,0	23,5	12,0	12,0	830,0	797,0	13,0	11,0	10,0	9,0
BAG-444	62,0	47,0	68,0	77,0	4,0	5,0	3,0	3,0	15,0	27,0	13,0	13,0	1060,0	1259,0	20,0	20,0	12,0	11,0
BAG-515	75,0	62,0	65,0	51,0	4,5	3,8	3,0	3,0	20,0	17,0	13,2	12,1	1720,0	1120,0	18,3	14,3	13,4	11,5
BAG-587	78,0	59,0	78,0	60,0	4,0	3,6	1,5	1,1	37,0	30,0	-	-	-	-	-	**	-	**
BAG-606	70,0	51,0	79,0	65,0	5,0	5,0	2,0	2,0	24,0	23,0	12,0	15,0	1630,0	789,0	18,0	11,0	11,0	9,0
BAG-629	66,0	65,0	82,0	78,0	4,0	5,0	2,0	2,0	29,0	20,0	14,0	14,0	598,0	989,0	13,0	16,0	10,0	12,0
BAG-650	46,0	61,0	50,0	60,0	3,0	4,0	2,0	1,9	18,0	21,0	16,0	14,0	537,0	690,0	14,0	16,0	12,0	9,0
BAG-657	75,0	61,0	78,0	65,0	3,0	4,0	3,0	2,0	30,0	28,0	16,0	13,0	1478,0	593,0	19,0	12,0	12,0	9,0
BAG-677	54,0	70,0	77,0	95,0	4,0	5,0	2,0	3,0	22,0	28,0	18,0	14,0	1361,0	781,0	15,0	11,8	11,0	9,3
BAG-690	98,0	96,5	100,0	102,0	5,0	4,8	1,5	1,9	36,0	27,5	-	-	-	-	-	7,7	-	6,2
BAG-698	55,0	54,0	53,0	72,0	3,0	5,0	2,0	3,0	27,0	25,0	15,0	15,0	869,0	1233,0	16,0	19,0	11,0	12,0
BAG-710	60,0	58,0	68,0	74,0	4,0	4,0	2,0	2,0	27,0	30,0	13,0	14,0	1337,0	1035,0	19,0	17,0	11,0	10,0
BAG-739	94,0	84,7	86,0	83,0	4,3	4,1	1,6	0,7	38,0	40,0	-	-	-	-	6,3	5,0	4,7	4,5
BAG-801	68,0	76,0	74,0	87,0	4,0	6,0	2,0	2,0	29,0	22,0	14,0	15,0	1344,0	1219,0	25,0	22,0	12	10,0

ALT = Altura da planta; CFD = Comprimento da folha "D"; LFD = Largura da folha "D"; CPE = Comprimento do pedúnculo; DPE = Diâmetro do pedúnculo; PSI = Peso do sincarpo; CSI = Comprimento do sincarpo; DSI = Diâmetro do sincarpo; BRX = °Brix; BGL = Banco de Germoplasma conservado *in vitro* por dez anos; BGC = Banco de Germoplasma em Campo; * Variação somacional. ** Acesso perdido em campo e sem avaliação. - Caracterização não realizada com perda de parcela.

Tabela 2. Caracterização morfológica qualitativa dos acessos de abacaxizeiro provenientes da conservação *in vitro* (BGL) por dez anos em comparação com a caracterização do BAG em campo (BGC).

ACESSO	HAB		ESP		CES		VAR		ANT		FSI		FAB		BBC		SBR		CBR		NCC		FAC		
	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	BGL	BGC	
BAG-001	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	COM	CON	OBT	OBT	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-002	ERE	ERE	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	DIF	DIF	DUA	DUA	FAG	FAG
BAG-003	SEM	SEM	PRE	PRE	DIF	DIF	AUS	AUS	PRE	PRE	*	OVO	*	AGU	*	AUS	*	TOT	*	IGU	*	DUA	-	FAG	FAG
BAG-004	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-008	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	COM	CON	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	DIF	DIF	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-012	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	DIF	DIF	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-016	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-017	ERE	ERE	PRE	PRE	IGU	IGU	PRE	PRE	PRE	PRE	COM	CON	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	IGU	IGU	DUA	DUA	ACU	ACU	
BAG-020	DEC	DEC	PRE	PRE	DIF	DIF	AUS	AUS	AUS	AUS	*	OVO	*	AGU	*	AUS	*	TOT	*	IGU	*	DUA	-	FAG	FAG
BAG-032	SEM	SEM	AUS	AUS	-	-	PRE	PRE	PRE	PRE	CCIL	CCIL	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-043	SEM	SEM	AUS	AUS	-	-	AUS	AUS	PRE	PRE	CCIL	CCIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-045	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	DIF	DIF	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-048	SEM	SEM	AUS	AUS	-	-	PRE	PRE	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-049	SEM	SEM	AUS	AUS	-	-	PRE	PRE	PRE	PRE	CCIL	CCIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-053	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	PRE	PRE	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-071	DEC	DEC	AUS	AUS	-	-	PRE	PRE	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	DUA	DUA	ACU	ACU	
BAG-072	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	OBT	OBT	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-085	DEC	DEC	AUS	AUS	-	-	PRE	PRE	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-090	ERE	ERE	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-137	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-147	SEM	SEM	AUS	AUS	-	-	PRE	PRE	AUS	AUS	COM	CON	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	DIF	DIF	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-163	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	IGU	IGU	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-193	ERE	ERE	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	COM	CON	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	DIF	DIF	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-197	ERE	ERE	PRE	PRE	IGU	IGU	PRE	PRE	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-292	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-340	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-343	ERE	ERE	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-350	ERE	ERE	AUS	AUS	-	-	PRE	PRE	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-397	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-408	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	PRE	PRE	PRE	PRE	-	OVO	-	AGU	-	AUS	-	TOT	-	IGU	-	DUA	-	FAG	FAG
BAG-411	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	PRE	PRE	PRE	PRE	CCIL	CCIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	UMA	UMA	MAG	MAG	
BAG-433	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	PRE	PRE	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	PAR	PAR	IGU	IGU	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-441	DEC	DEC	AUS	AUS	-	-	AUS	AUS	PRE	PRE	COM	CON	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-444	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-515	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	DIF	DIF	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-587	SEM	SEM	PRE	PRE	-	-	PRE	PRE	PRE	PRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BAG-606	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CCIL	CCIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	IGU	IGU	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-629	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	DIF	DIF	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-650	DEC	DEC	AUS	AUS	-	-	AUS	AUS	PRE	PRE	CCIL	CCIL	OBT	OBT	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-657	ERE	ERE	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	GLO	GLO	AGU	AGU	PRE	PRE	PAR	PAR	DIF	DIF	UMA	UMA	FAG	FAG	
BAG-677	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	DIF	DIF	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-690	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	-	OVO	-	AGU	-	AUS	-	TOT	-	IGU	-	DUA	-	FAG	FAG
BAG-698	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	IGU	IGU	DUA	DUA	FAG	FAG	
BAG-710	DEC	DEC	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	PRE	PRE	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	TOT	TOT	IGU	IGU	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-739	ERE	ERE	AUS	AUS	-	-	AUS	AUS	PRE	PRE	CCIL	CCIL	AGU	AGU	PRE	PRE	TOT	TOT	DIF	DIF	DUA	DUA	MAG	MAG	
BAG-801	SEM	SEM	PRE	PRE	IGU	IGU	AUS	AUS	AUS	AUS	CIL	CIL	AGU	AGU	AUS	AUS	TOT	TOT	IGU	IGU	DUA	DUA	MAG	MAG	

HAB = Hábito; ESP = Espinho; CES = Cor do Espinho; VAR = Variagem; ANT = Antocianina; FSI = Forma do Sincarpio; FAB = Formato do Ápice da Bráctea; BBC = Brácteas na Base da Coroa; SBR = Sobreposição das brácteas; CBR = Cor das brácteas; NCC = Número de cores da coroa; FAC = forma do ápice da coroa; BGL = Banco de Germoplasma conservado *in vitro* por dez anos; BGC = Banco de Germoplasma em Campo; ERE = Ereto; SEM = Semiereto; DEC = Decumbente; PRE = Presente; AUS = Ausente; IGU = Igual; DIF = Diferente; CIL = Cilíndrico; CCIL = Cônico cilíndrico; GLO = Globoso; OVO = Ovoide; OBT = Obtuso; PAR = Parcial; TOT = Total; UMA = Uma; DUA = Duas; FAG = Fortemente agudo; MAG = Moderadamente agudo; ACU = Acuminado; * Variação somaclonal. - Caracterização não realizada com perda de parcela.

Os resultados superiores obtidos neste trabalho para a maioria das plantas de acessos advindos do cultivo *in vitro* são coerentes com os conhecimentos já consolidados em cultura de tecidos, uma vez que estudos enfatizavam que as plantas advindas do cultivo *in vitro* apresentam muitas vantagens em relação às mudas convencionais e dentre essas vantagens se destaca o vigor (VUYLSTEKE; ORTIZ, 1996; KUMAR et al., 2004). Em bananeira (*Musa* sp.), por exemplo, estudo da década de 90 já relatava que plantas micropropagadas apresentavam maior produtividade, maior rapidez no estabelecimento, maior vigor no decorrer do crescimento, maior altura e um ciclo de produtividade mais uniforme e precoce, quando comparadas com mudas convencionais (VUYLSTEKE; ORTIZ, 1996). Kumar et al. (2004), trabalhando com *Tagetes erecta* L. micropropagado, afirmam que as plantas possuíam mais vigor no crescimento e desempenho superior as mudas convencionais.

Por outro lado, o fato das plantas de abacaxizeiro advindas da conservação *in vitro* estarem livres do vírus da murcha pode ser outro fator que contribuiu para que os resultados quantitativos fossem superiores aos das plantas do BAG em campo. Um dos mais graves problemas detectados no BAG em campo, nos últimos anos, tem sido o aumento da frequência de acessos contaminados pelo complexo viral PMWaV. Em alguns materiais, essa infecção é assintomática, mas qualquer estresse pode funcionar como um gatilho para sua manifestação, algumas vezes de forma devastadora. Já é de conhecimento que a presença do vírus na planta compromete seu crescimento radicular, a turgescência das folhas e das partes suculentas da planta, bem como ocasiona outras alterações fisiológicas culminando com a morte do vegetal (SETHUR; HU, 2002).

No caso específico do BAG em campo, o vírus tem se disseminado, o que já ocasionou a perda de alguns acessos altamente suscetíveis. Até o momento não se conhecem fontes de resistência, o que vem motivando a curadoria do BAG a novos estudos envolvendo a ecologia do vírus e possíveis fontes de resistência.

Um dos resultados importantes deste trabalho foi a possibilidade de repor quatro acessos que haviam sido perdidos em campo, dentre eles, BGA-049(Figura 2C), BGA-071(Figura 2D), BGA-515 (Figura 2E) e BGA-587(Figura 2F), todos pertencentes a variedade *A. comosus* var. *comosus*, cumprindo assim,

um importante objetivo da conservação *in vitro*, o de se constituir em um repositório de plantas sadias.

É interessante a implementação de diferentes formas de conservação, ações e mecanismos de gestão que sejam efetivos para minorar perdas e resguardar o germoplasma de modo eficiente e, nesse sentido, é importante a validação da conservação *in vitro* por meio da caracterização em condições de campo.

A análise conjunta dos dados qualitativos e quantitativos, com base no algoritmo de Gower (1971) demonstrou a estabilidade de quarenta e quatro acessos avaliados do universo de quarenta e seis. Foram formados seis grupos (Figura 3) pelo método de agrupamento UPGMA, a partir da distância euclidiana média, utilizando como ponto de corte a dissimilaridade genética ($D_{dg} = 0,28$).

O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ($r = 0,71$) demonstrou que houve bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original (ROHLF; FISHER, 1968). Houve similaridade entre 17 acessos advindos da conservação *in vitro* e do BAG em campo (Figura 3).

O grupo G1 foi formado por apenas um acesso de *Ananas* sp. (Figura 3 A). Segundo Souza et al. (2012) há uma dificuldade de classificação taxonômica do gênero, existindo a possibilidade de que se trate de um híbrido natural entre *A. comosus* var. *ananassoides* e *A. comosus* var. *paraguayensis*, já que apresentam características de ambas as variedades, o que justifica o fato de ficar em um grupo isolado.

O grupo G2 é formado pelas plantas de *A. comosus* var. *erectifolius* (BGA-739) oriundas da conservação *in vitro* por dez anos e do BAG campo do acesso (Figura 3B). Esse acesso é diferente de todos os acessos avaliados, pois não possuem espinhos, apresentam folhas arroxeadas, hábito de crescimento ereto, dentre outras características. Souza et al. (2012) verificou em um estudo de caracterização de germoplasma com 89 acessos que os três acessos de *A. comosus* var. *erectifolius* formaram um grupo separado dos demais, devido principalmente ao hábito de crescimento ereto e à ausência de espinhos.

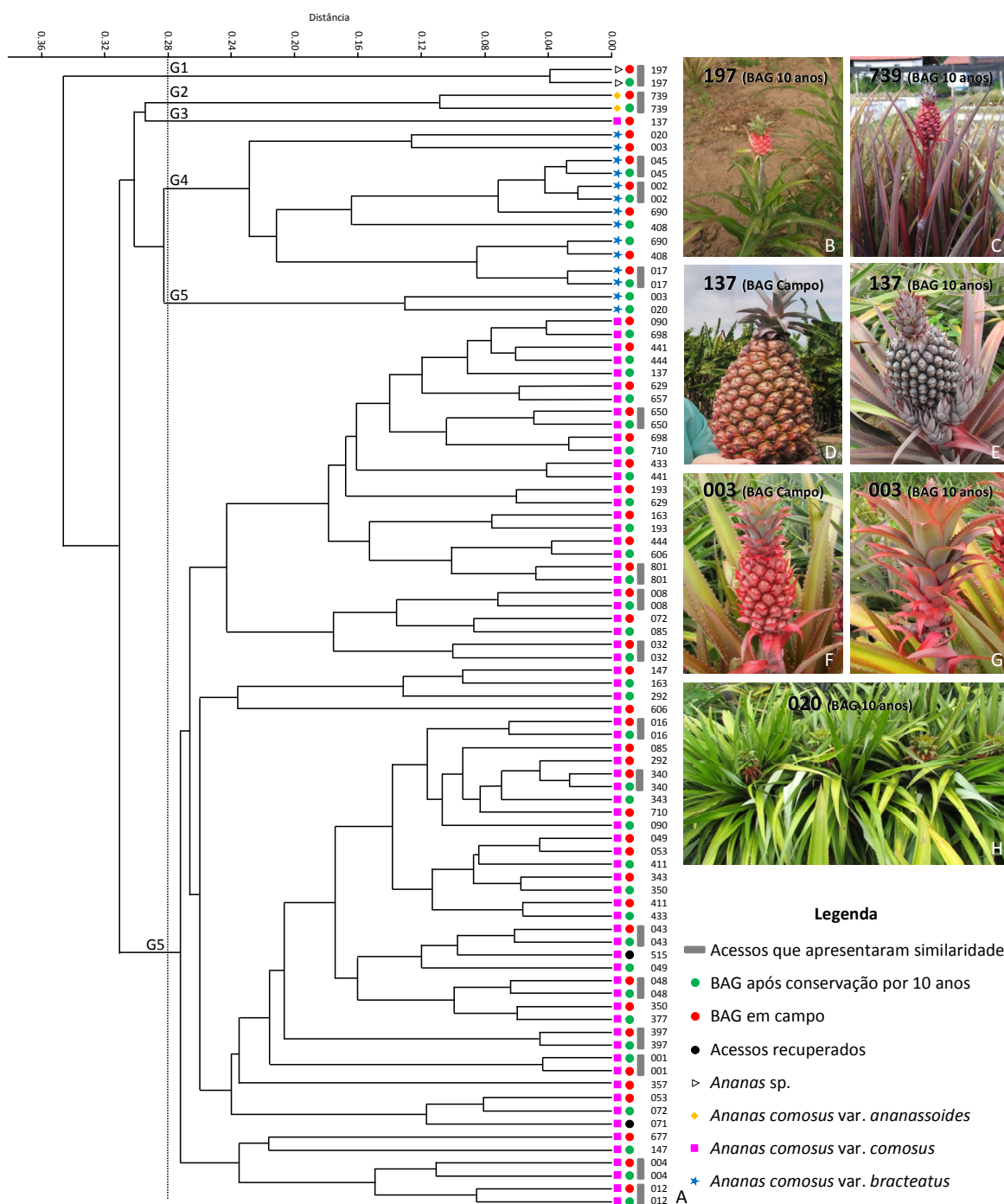


Figura 3.A) Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 46 acessos do Banco de Germoplasma de Abacaxi conservados *in vitro* por dez anos e BAG em campo, obtido pelo método UPGMA com base no algoritmo de Gower, a partir de vinte e um descritores qualitativos e quantitativos; B) BGA-197 proveniente do BAG *in vitro* (dez anos de conservação); C) BGA-197 proveniente do BAG em campo; D) BGA-137 oriundo do BAG em campo; E) BGA-137 oriundo do BAG *in vitro* (dez anos de conservação); F) BGA-003 proveniente do BAG em campo; G) BGA-003 proveniente do BAG *in vitro* (dez anos de conservação) mostrando

ausência de sincarpo; G) BGA-020 proveniente do BAG *in vitro* (dez anos de conservação) mostrando ausência de sincarpo.

O grupo G3 ficou isolado com as plantas do BGA-137 advindas do BAG em campo (Figura 3C). Provavelmente esse isolamento se deu devido ao tamanho elevado do fruto, que apresentou uma massa média de 6,800 Kg, comprimento (38 cm) e diâmetro do sincarpo (28 cm). Esse acesso é denominado comercialmente como 'Arroba de Tarauacá', podendo seu fruto alcançar a massa de 15 Kg na região de origem, o tamanho superior do "Arroba" se justifica pelo fato de se tratar de um triploide, já que estes normalmente apresentam sincarpes maiores e mais pesados do que os de cultivares de abacaxi diplóides (SCHERER et al., 2015). No entanto, neste trabalho os frutos pesaram em média 2,250 Kg, valor inferior em 10,45 Kg quando comparados com o peso na região de origem e, em 4,550 Kg, quando comparado com o peso médio do fruto no BAG em campo o qual foi de 6,800 Kg. Souza et al. (2012), em trabalho de caracterização deste acesso encontrou também valores de comprimento médio e largura das folhas de 166,50 cm e largura de 8,5 cm, respectivamente (Tabela 1). Tais resultados foram superiores aos deste trabalho, uma vez que, o comprimento médio das folhas superou em 68, 5 cm o das folhas de abacaxizeiros advindos da conservação *in vitro* de dez anos, nos quais o comprimento médio das folhas foi de 98,00 cm. Quanto ao diâmetro das folhas, as plantas do BAG em campo obtiveram resultados superiores em 4,8 cm, já que o diâmetro médio das plantas conservadas foi de apenas 3,7 cm, enquanto que nas plantas advindas do BAG em campo foi de 8,5 cm.

Schereret al. (2015) sugerem que o sistema tradicional de cultivo empregado por agricultores de Tarauacá (principalmente relacionados com o ciclo de cultivo de cerca de 2 anos) e as características ambientais da região, as quais são ótimas para desenvolvimento de abacaxi, interagem com o genótipo triplóide para produzir os enormes frutos de abacaxi relatados lá.

Os grupos G4 e G5 foram formados por acessos de *Ananas comosus* var. *bracteatus*, tanto da conservação *in vitro* de dez anos quanto do BAG em campo (BGA-020, BGA-003, BGA-045, BGA-002, BGA-408, BGA-690, BGA-017) (Figura 3). O que chama atenção é que no grupo G5, assim como na Análise de Componentes Principais (Figura 4) os acessos BAG-003 e BAG-020 oriundos

da conservação *in vitro* não apresentaram similaridade com as plantas do BAG em campo (Figura 3E-G). Isso reflete as variações que foram encontradas em relação, principalmente, à não formação do sincarpo.

Já o grupo G6 foi composto apenas por acessos pertencentes à variedade *Ananas comosus* var. *comosus*, tanto da conservação *in vitro* por dez anos quanto do BAG em campo, (BGA-001, BGA-004, BGA-008, BGA-012, BGA-016, BGA-032, BGA-043, BGA-048, BGA-049, BGA-053, BGA-071, BGA-072, BGA-085, BGA-090, BGA-137, BGA-147, BGA-163, BGA-193, BGA-292, BGA-340, BGA-343, BGA-350, BGA-357, BGA-377, BGA-408, BGA-411, BGA-433, BGA-441, BGA-444, BGA-515, BGA-606, BGA-629, BGA-650, BGA-657, BGA-677, BGA-698, BGA-710, BGA-801). Dentre estes, 12 acessos apresentaram similaridade (BAG-650, BAG-801, BAG-008, BAG-032, BAG-016, BAG-340, BAG-043, BAG-048, BAG-397, BAG-001, BAG-004 e BAG-012) (Figura 3).

A. *comosus* var. *comosus* apresenta grande variabilidade genética, possuindo grande diversidade de cores, tamanhos e formas de frutos (SOUZA et al., 2012), sendo que é nesta variedade que se encontram os frutos para consumo *in natura* e para processamento (CABRAL et al., 2003). A maioria dos acessos dessa variedade, provenientes da conservação *in vitro* de dez anos, obtiveram resultados superiores aos caracterizados no BAG em campo, para a maioria das variáveis avaliadas, como pode ser observado na Tabela 1 em acessos como: BGA-004, BGA-008, BGA-012, BGA-016, BGA-032, dentre outros).

Considerando os resultados da Análise de Componentes Principais, vale ressaltar que, o estudo dos componentes principais foi avaliado pela porcentagem de variância total com o intuito de entender as relações entre as variáveis e os acessos (MUNIZ et al., 2014). Os acessos foram distribuídos ao longo dos eixos dos componentes principais, sendo que quanto mais próximos os acessos das variáveis, maior é a relação existente entre eles. Ao passo que os acessos mais distantes das variáveis são os mais divergentes.

Na Figura 4 foi possível observar, por meio do gráfico *biplo*t, que os componentes PC1 (42,72%) altura da planta e PC2 (22,96%) comprimento da folha D, explicam 65,68 % da variação dos dados.

A partir da análise de PCA, foi possível observar o agrupamento dos acessos por variedade botânica e de 16 combinações desses acessos

caracterizados do BAG em campo e conservados *in vitro* por dez anos (BGA-001, BGA-002, BGA-004, BGA-008, BGA-012, BGA-016, BGA-017, BGA-032, BGA-043, BGA-045, BGA-048, BGA-340, BGA-397, BGA-444, BGA-650 e BGA-801).

Observou-se que os vetores de todas as variáveis relacionadas ao fruto (PSI, CSI, DSI) apresentaram mesma direção, indicando que essas variáveis estão correlacionadas positivamente. Essa correlação positiva e alta entre as variáveis demonstra que, na prática, há necessidade de avaliar apenas o caráter de mais fácil determinação, já que os genes que controlam um caráter podem ser os mesmos que controlam o outro, os demais, por sua vez, estão ligados.

O mesmo pode ser observado para a variável altura da planta (ALT) e comprimento da folha “D” (CFD), que apresentaram direções opostas às variáveis do fruto. O comprimento do pedúnculo (CPE) e diâmetro do pedúnculo (DPE) foram as duas variáveis que menos contribuíram para explicar os dados e ambos estão em direções opostas.

É possível observar também o agrupamento dos acessos em função da variedade botânica. Os acessos de *A. comosus* var. *comosus* estão basicamente concentrados nos dois quadrantes à direita e fortemente ligados às variáveis relacionadas ao sincarpo.

O acesso BGA-137 caracterizado no BAG em campo, mais uma vez se distanciou dos demais acessos e o peso, comprimento e diâmetro do sincarpo foram as variáveis que mais contribuíram para esse distanciamento.

Os acessos de *A. comosus* var. *bracteatus* formaram um grupo no qual as variáveis que mais influenciaram foram a altura da planta (ALT) e comprimento da folha “D” (CFD). Apenas os acessos BGA-003 e BGA-020, ambos *A. comosus* var. *bracteatus*, advindos da conservação *in vitro* formaram um grupo independente (Figura 4).

Isso pode ter ocorrido pelo fato de que tais acessos divergiram bastante em relação algumas variáveis avaliadas, principalmente no que se refere ao sincarpo, já que ambos só apresentaram coroa, quando comparados com os mesmos acessos caracterizados em campo.

Assim, ficou evidente que os acessos BGA-003 e BGA-020, pertencentes à variedade *A. comosus* var. *bracteatus* são os mais propensos a sofrer variação somaclonal quando conservados *in vitro* por longo período, o que foi também observado por Silva et al. (2016) por meio da caracterização molecular por ISSR. Esses autores relataram também que, dentre as variedades botânicas de abacaxizeiro, *A. comosus* var. *bracteatus* foi a que apresentou maior potencial propagativo, tanto em relação ao crescimento médio dos brotos (267 brotos no quinto subcultivo), quanto na taxa de crescimento geométrico (1,25 no quinto subcultivo), de modo que, essa pode ter sido segundo os autores, uma possível causa para explicar a ocorrência de variação observada nesses acessos, o que pode ter maior relação com a resposta do genótipo e da variedade, do que às condições de cultivo *in vitro*.

A caracterização morfológica por caracteres quantitativos e qualitativos das plantas em campo, advindas da conservação *in vitro*, foi fundamental para a confirmação destes resultados, bem como para identificação das características que sofreram alteração.

A variação somaclonal, por sua vez, se constitui em um fator limitante na micropropagação de plantas, o que se deve principalmente ao fato de os meios de cultura serem suplementados por substâncias reguladoras de crescimento (COSTA; ZAFARI, 2005). No entanto, estudos de fidelidade genética sugerem que a variação está mais relacionada ao genótipo do que às condições da cultura de tecidos (PATHAK; DHAWAN, 2012).

Os acessos que apresentaram variações estão em campo e ainda continuarão sendo avaliados por mais alguns ciclos, o que pode trazer mais informações relevantes sobre a estabilidade das variações somaclonais observadas.

Vale ressaltar que a conservação *in vitro* é eficaz para a maioria das culturas. Entretanto, são poucos os registros que validam a eficiência dessa forma de conservação até a condição de campo. Esse trabalho deixa evidente que a conservação *in vitro* de abacaxi, mesmo considerando um período de 10 anos pode ser considerada eficiente.

Referências

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.; 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.

CABRAL, J. R. S.; JUGHANS, D. T. **Variedades de abacaxi**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 63).

CHAVENT, M.; KUENTZ, V.; LABENNE, A.; LIQUET, B.; SARACCO, J. PCAmixdata: Multivariate Analysis of Mixed Data. R package version 3.1. 2017.

COSTA, T.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de Ananas bracteatus (shuttz) cv. Streatus. **Revista de Horticultura Ornamental**, v.11, n. 2, p. 109- 113, 2005.

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

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v. 27, n. 4, p. 857-874, 1971.

IBPGR - INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Descriptors for pineapple**. Rome, 1991. 41p.

KARP, A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.7, p.139-151, 1994.

KUMAR, A.; SINGH, S.K.; SHARMA, S.K.; RAGHAVA, S.P.S.; MISRA, R.L. Comparison of seed-derived with micropropagated male-sterile plants of *Tagetes erecta* L. for F1 hybrid seed production. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, n. 2, p.260-266, 2004.

MUÑIZ, S.; LACARTA, J.; PATA, M.P.; JIMÉNEZ, J.J.; NAVARRO, E. Analysis of the diversity of substrate utilisation of soil bacteria exposed to Cd and earthworm activity using generalised additive models. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e85057, 2014.

NAIDU, R. A.; HUGHES J. A. Methods for the detection of plant virus diseases. In: HUGHES, J. A., ODU B. O. (Eds.). **Plant Virology in Sub-Saharan Africa**. Proceedings of a Conference Organized by IITA (Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture) p. 233-260, 2001.

NIEHL A.; HEINLEIN M. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. **Protoplasma**, v.248, n. 1, p. 75-99, 2011.

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, n. 1, p. 137-143, 2012.

PAZ, E.Y.; GIL, K.; REBOLLEDO, L.; REBOLLEDO, A.; URIZA, D.; MARTÍNEZ, O.; ISIDRO´N, M.; DÍAZ, L.; LORENZO, J.C.; SIMPSON, J. Genetic diversity of Cuban pineapple germplasm assessed by AFLP Markers. **Crop Breed Appl Biotechnol.** v. 12, n. 2, p. 104 - 110, 2012.

REINHARDT, D. H. R. C. Manejo e produção de mudas de abacaxi. Informe Agropecuário, v. 19, n. 195, p. 13-19, 1998.

ROHLF, F. J.; FISHER, D. R. Tests for Hierarchical structure in Random Data Sets. **Systematic Zoology**, v. 17, n. 4, p. 407-412, 1968.

SAS Institute. SAS/STATs 9.22 User's Guide, Cary, North Carolina: SAS Institute, 2010.

SCHERER, R. F., OLKOSKI, D., SOUZA, F. V. D., NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Gigante de Tarauacá: a triploid pineapple from Brazilian Amazonia. **Scientia Horticulturae**, v.181, p.1-3, 2015.

SETHUR, 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, R. L.; FERREIRA, C. F.; LÊDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 123-133, 2016.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, n. 2, p.33-40, 1962.

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 Ciências Agronômicas**, v. 45, n. 2, p. 409 - 416, 2014.

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

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; CARDOSO, J. L.; BENJAMIN, D. A. Identification and selection of ornamental pineapple plants. **Acta Horticulturae**, v. 702, p. 93-99. 2006.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Org.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, p. 283-305, 2007.

VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAMANATHA RAO, V. Genetic Characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY, 2005. Turin. **Proceedings...**, Turin: [s.n.], p. 121-128, 2005.

VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Field performance of conventional vs. in vitro propagules of plantain (Musa spp., AAB group). **HortScience**, v. 31, n. 5, p. 862-865, 1996.

CAPÍTULO 2

Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions

¹Artigo publicado:

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; VIEIRA, L. J.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 326-334, 2017.

Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions

Ronilze Leite da Silva^a, Everton Hilo de Souza^b, Lívia de Jesus Vieira^a, Claudinéia Regina Pelacani^a, Fernanda V. Duarte Souza^{d*}

^a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brazil, ^b Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia, Brazil, ^d Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Cruz das Almas, Bahia, Brazil.

Abstract

Cryopreservation of pollen is an additional way to conserve many species. In particular, it can be used as an alternative strategy to preserve the genetic variation of the genus *Ananas*. The aim of this study was to cryopreserve pollen from wild pineapple accessions to conserve a gene pool of the genus *Ananas*, as well as to minimize problems of asynchronous flowering among accessions preserved in a germplasm bank. Accessions of all botanical varieties were used to investigate different protocols for freezing pollen, as well as to determine their viability *in vitro/in vivo* during the investigation and after freezing in liquid nitrogen. Anthers with pollen of the different accessions were dehydrated and then immersed in liquid nitrogen for periods of 24 h, 60 days and 120 days. After freezing, the viability percentage and pollen tube length were determined. *In vivo* viability tests were performed through 24 pollinations involving different accessions. The results showed that the cryopreservation of pollen was efficient, attaining *in vitro* germination rates ranging from 8.24% to 94.25%, with average of 62.67% achieved 120 days after cryopreservation and pollen tube lengths longer than 0.23 mm after this same period. In the *in vivo* pollinations with cryopreserved grains, the seed formation rate was 70.83% for the different combinations. It was possible to cryopreserve pollen from all the pineapple accessions investigated after dehydration for 6 h on silica gel, with significant *in vitro* germination percentages and production of viable seeds.

Keywords

Ananas comosus (L.)Merr., Germplasm conservation, Pollen viability, *In vivo* fertilization, Genetic resources.

1. Introduction

Pineapple belongs to the genus *Ananas* and has very high value in global fruit growing. Besides food, this genus has a wide range of uses, such as production of pharmaceuticals and cosmetics (Sun et al., 2002, Manetti et al., 2009), biofuels (Hossain et al., 2008), fibers and paper (Sena Neto et al., 2013, Sena Neto et al., 2015), as well as its ornamental potential (Sanewski, 2009, Souza et al., 2012a, Souza et al., 2014). However, the increasingly pronounced genetic erosion of the genus *Ananas* and its vulnerability to some pests and diseases (Panis and Lambardi, 2006) are cause for concern, making actions and strategies urgently needed to assure preservation of this important germplasm.

On the matter of preservation, mention should be made of the Pineapple Active Germplasm Bank (AGB-Pineapple) of the Embrapa Cassava and Fruits, which has more than 600 accessions of the genus *Ananas* and other bromeliads preserved under field conditions. Indeed, the bank is considered to have the largest collection of varieties of pineapple and similar species in the world, where a large part of the natural genetic variability of this fruiting genus is represented (Souza et al., 2012a). The conservation of the pineapple germplasm has mainly been carried out under field conditions (Paz et al., 2012, Souza et al., 2012a) since the culture propagates basically in vegetative form, although seed formation occurs under natural conditions.

However, plants in the field are subject to constant biotic risks, such as pests and diseases, as well as abiotic threats, from pollution and climate change. This makes it necessary to find complementary strategies to assure the effective maintenance of the gene pool of this genus (Reed et al., 2011). Therefore, *in vitro* preservation, as a security backup, has been adopted since 2003 (Silva et al., 2016).

Furthermore, cryopreservation of stem apices, with increasingly efficient protocols, has been found to be an attractive option for long-term preservation of pineapple (González-Arno et al., 1998, Martínez-Montero et al., 2005, Hu et al., 2015, Souza et al., 2016).

Among these complementary strategies, the conservation of pollen is relevant, not only to preserve important alleles, but also to help overcome asynchronous flowering, making it a significant tool for genetic improvement. In particular, in studies focused on non-food uses of plants, the inclusion of wild varieties is significant, and asynchronous flowering can pose a barrier to the development of new hybrids.

Although studies have analyzed cryopreservation of pollen of some bromeliads, to the best of our knowledge no reports have been published in this respect for pineapple (Parton et al., 2002, Souza et al., 2015).

Cryopreservation of pollen has been put into practice for various plant species, such as olives (Alba et al., 2011), citrus fruits (Volk et al., 2015), orchids (Vendrame et al., 2008) and some bromeliads (Parton et al., 2002, Souza et al., 2015), among others.

Regardless of the purpose, a basic premise for preservation of these structures is to maintain their viability after long storage periods (Bajaj, 1995, Souza et al., 2015). One of the methods to assess pollen viability is *in vitro* germination of grains in culture media (Soares et al., 2011). However, *in vitro* germination is not conclusive, because success in the laboratory does not guarantee that fertilization will occur in practice. For this purpose, *in vivo* hybridization tests are most efficient (Souza et al., 2015). In this sense, it is essential for the viability of the preserved pollen to be between 50 and 80% and for the pollen tubes to be well developed to obtain successful crosses (Scorza and Sgerman, 1995).

Various factors can affect the results of pollen cryopreservation. The number of grains can be a determining factor for conduction of tests and can vary substantially among species. For some species, collection is easy since the pollen grains are abundant, while in others their scarcity can hamper conservation testing. Another factor that influences the cryopreservation of pollen is the low temperatures and moisture levels required. The pollen of many species must be dehydrated before freezing, so the ideal moisture level must be known or discovered in advance to determine the best drying method (Vendrame et al., 2008, Bettiol Neto et al., 2009).

The aim of this study was thus to establish the best conditions for cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions, as a complementary strategy for conservation of the genus *Ananas*, and to overcome the problems of asynchronous flowering among these varieties.

2. Material and methods

2.1. Action strategy to cryopreservation tests

Before the cryopreservation assays, some preliminary optimization tests were performed, such as by varying the sucrose concentration in the culture medium and varying the dehydration times. In this sense, five sucrose concentrations were evaluated (5, 10, 15, 20 and 25%) in the BK medium (Brewbaker and Kwack, 1963). After determining the best sucrose concentration, five different silica gel dehydration times were analyzed (1, 3, 6, 12 and 24 h). After determining the optimal values, the cryopreservation tests were conducted, with periodical removal of pollen grains for *in vitro* germination (24 h, 60 d and 120 d) and *in vivo* pollination (60 d and 120 d).

2.2. Selection of the culture medium for *in vitro* germination of the pollen

We performed a preliminary study to determine the best culture medium for *in vitro* germination of the pollen grains, using six wild accessions of *A. comosus* var. *ananassoides* (AGB-25, AGB-203, AGB-206, AGB-207, AGB-432 and AGB-651), two accessions of *A. comosus* var. *comosus* (AGB-148 and AGB-526) and two accessions of *A. comosus* var. *bracteatus* (AGB-110 and AGB-495) from the Pineapple Active Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Fruits, since for the other botanical varieties a method had already been determined, as described by Soares et al. (2011). Pollen grains were collected after anthesis and inoculated in BK culture medium (Brewbaker and Kwack, 1963) with five different sucrose concentrations (5, 10, 15, 20, 25%). The pollen grains were distributed in Petri dishes containing the various media with tweezers and kept in a climatic chamber at a temperature of 27 ± 1 °C for 24 h. Then they were photographed through a Leica EZ4D stereomicroscope (Leica, Wetzlar, Germany).

The experimental design for the germination of the pollen was entirely randomized in a 5×6 factorial scheme with five sugar concentrations and six genotypes, with six repetitions, where each repetition was one Petri dish.

The germination percentage was determined by counting all the pollen in each dish (germinated and total), while the pollen tube length was ascertained by measuring five tubes at random in each dish, for a total of 60 pollen tubes of each genotype studied. Pollen grains were considered germinated when the pollen tube length was greater than the diameter of the pollen grain. The tube length was determined by the average of five tubes in each of the six repetitions. The germination percentage data were transformed to arcsine ($\sqrt{x}/100$) before statistical

analysis. For comparison of means the data were submitted to analysis of variance and the Scott-Knott test ($p \leq 0.01$), using the SAS Institute software (2014).

2.3. Dehydration of the pollen

In the dehydration studies, complete anthers were used. The moisture level of the anthers with pollen was determined according to the method described by Souza et al. (2015). First, small sheets of aluminum foil were weighed on a precision balance with four-decimal-place accuracy to establish the tare weight (W_t). Then the anthers and pollen grains were deposited on each foil sheet for a second weighing to determine the moist weight (W_m). The samples (anthers with pollen grains on the foil sheets) were dehydrated with silica gel in a closed compartment for five time intervals (1, 3, 6, 12, 24 h). After this, the foil sheets were folded into closed envelopes with anther and again weighed to obtain the dry weight (W_d). Next, the samples were placed for germination in Petri dishes containing the best culture medium (BK with 15% sucrose), as determined in the previous test. The moisture of the samples was determined by the following equation: $M = [(W_m - W_d)/(W_m - W_t)] \times 100$, where: M = moisture level of the anthers with pollen grains (%); W_m = moist weight (g); W_d = dry weight (g); W_t = tare weight (g).

The experimental design for the dehydration tests was also entirely randomized, here with a 5×13 factorial scheme (dehydration intervals x genotypes) with six repetitions, each repetition being represented by a Petri dish. The same procedure described before was used to determine the germination percentage and pollen tube length.

The germination percentage data were transformed to arcsine ($\sqrt{x}/100$) before the statistical analysis. The means were compared by analysis of variance and the Scott-Knott test ($p \leq 0.01$), with the SAS Institute software (2014).

2.4. Cryopreservation of the pollen

For cryopreservation, the anthers were removed from the flowers and placed in Petri dishes on aluminum foil sheets and dried for 6 h, the best time as determined in the previous test. Then the foil sheets with the anthers were folded into envelopes,

placed in cryogenic tubes (3 mL) and immersed in liquid nitrogen at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h, 60 days and 120 days. After removal from the tubes, the samples were evaluated for *in vitro* germination and pollen tube length to ascertain the post-freezing pollen vitality.

2.5. *In vitro* and *in vivo* viability testing of the pollen

BK culture medium with 15% sucrose was used to determine the germination percentage and pollen tube length. The germination percentage was calculated by the ratio between the germinated grains and total grains on each plate while the tube length was measured in the same way described for the test to choose the best culture medium.

The data were evaluated by analysis of variance, considering an entirely randomized experimental design in a split-plot time scheme, in which the plots were composed of the factorial interactions and the sub-plots were composed of time and its interactions with the treatments. The percentage data were transformed into arcsine ($\sqrt{x/100}$) to satisfy the assumptions for analysis of variance. The means were submitted to the Scott-Knott test and the F-test was applied for the presence or absence of dehydration, both at 5% probability, using the SAS Institute program (2014).

For the *in vivo* viability tests, 24 pollinations were carried out involving different accessions from the AGB-Pineapple preserved under field conditions. Pollen grains of the 13 accessions cryopreserved in liquid nitrogen and stored for 60 d and 120 d in the previous step were used as male parents. For female parents, 11 accessions from the different biological varieties preserved in the AGB were used: *Ananas comosus* var. *comosus* (AGB-10, AGB-141, AGB-144, AGB-336, AGB-345, AGB-370 and AGB-411), *A. comosus* var. *ananassoides* (AGB-223, AGB-230 and AGB-703), *A. comosus* var. *bracteatus* (AGB-20 and AGB-35), and *A. comosus* var. *paraguayensis* (AGB-211). The controlled pollinations were always carried out at 8:00 a.m. (just after anthesis) and different numbers of flowers were used for each cross, depending on the availability of open flowers.

In the flowering step of the female plants, the anthers were removed before anthesis and the flowers were protected against contamination by pollen of other accessions. After emasculation, the pollen preserved with the different treatments (60

d and 120 d) were thawed for about five minutes at ambient temperature (the time between removal from the liquid nitrogen and arrival at the experimental field). Then the pollen were placed on the stigmas of flowers and these were protected again. The pollinated flowers were labeled with the treatment number and pollination date. After the fruit ripened, the number of seeds generated was counted, since the pineapple plant is infrutescence.

The seeds generated in the crosses involving different botanical varieties and *A. macrodontes* were treated with the antifungal Cercobin[®] (700 Wp) and placed in Gerbox[®] boxes on sterile foam moistened with autoclaved distilled water.

3. Results

3.1. Establishment of the culture medium for *in vitro* germination of the pollen

The *in vitro* germination rates of the pollen grains in the preliminary preservation step varied among accessions and different sucrose concentrations in the BK culture medium. For the majority of the accessions, the best results were obtained with the medium supplemented with 15% sucrose (Table 1). The highest germination percentages were observed for accessions AGB-025, AGB-203, AGB-207 (*A. comosus* var. *ananassoides*) and AGB-110 (*A. comosus* var. *bracteatus*), with viability values higher than 50%. Unlike the other accessions, AGB-203 (*A. comosus* var. *ananassoides*) presented the best result in the medium containing 20% sucrose.

The lowest germination rates ($\leq 10\%$) were in general obtained at the sucrose concentrations of 5% and 25% (Table 1). In turn, the longest pollen tube lengths were observed at sucrose concentrations of 15% and 20%, in which the longest lengths varied from 0.55 mm to 0.63 mm.

3.2. Dehydration of the pollen

After treatment of the anthers with different exposure times to silica gel, the same behavior was observed for all the accessions studied, with a decline in the

moisture percentage as the exposure time increased. After 3 h, the moisture declined to approximately 50% and after 6 h to about 28%, after which it stabilized (Table 2).

Although all the pollen grains only attained the desired moisture (25–30%) after exposure to silica gel for 6 h, there was no significant difference between the times of 3 and 6 h regarding the *in vitro* germination rates and pollen tube lengths. The highest *in vitro* germination percentages were 40 and 45%, and the longest tube lengths varied from 47 to 67 mm, in accessions AGB-081 and AGB-344, respectively (Table 2). Therefore, in general the time of 6 h was considered the best, because it resulted in the lowest moisture levels (26–30%), highest germination rates and longest tube lengths for the great majority of accessions. The variable with the strongest effect on the *in vitro* germination rates was the identity of the accession, with significant variations for each silica gel exposure time. Some accessions presented low germination rates after all of the exposure times, such as AGB-047, AGB-345 and AGB-411, while AGB-081 and AGB-344 showed percentages higher than 40% with 6 h of exposure. In turn, the *in vitro* germination results, regarding exposure times, only varied after 12 h, with lower percentages for the majority of accessions. The behavior regarding pollen tube length followed the same pattern as that for germination.

3.3. Preservation and viability of the pollen grains

In the *in vitro* viability tests of the seeds after freezing in liquid nitrogen, no significant interaction was noted between accessions and conservation times. The differences observed were only between accessions, confirming again the effect of genotype on the results. The highest germination percentages for the pollen grains preserved in liquid nitrogen were observed for accession AGB-081 (*A. macrodontes*), followed by AGB-047, AGB-110, AGB-690 and AGB-776 (*A. comosus* var. *bracteatus*), and AGB-141 and AGB-345 (*A. comosus* var. *comosus*). The lowest germination rate was observed for AGB-411, belonging to *A. comosus* var. *comosus* (Table 3). The differences observed regarding accessions after freezing did not generally correspond to those observed in the previous step, with only AGB-081 and AGB-411 presenting similar results.

Even for the accessions with germination rates below 50%, these percentages along with the pollen tube lengths were relatively stable at the three conservation

times. The *in vitro* germination rates of accessions AGB-081 (highest germination percentage) and AGB-411 (lowest germination percentage) can be seen in Fig. 1(A and B), respectively.

With respect to pollen tube length, accessions AGB-081, AGB-148 AGB-690 and AGB-776 presented the longest lengths, with values greater than 0.54 mm. No significant difference was observed in relation to preservation times (24 h, 60 d and 120 d), except for accession AGB-345, at 24 h, with 0.31 mm, and at 60 d and 120 d (0.38 and 0.40 mm, respectively).

Table 1. *In vitro* germination percentage of pollen from different pineapple accessions cultured on BK medium (Brewbaker and Kwack, 1963) with different sucrose concentrations.

Accessions	In vitro pollen germination (%)				
	5%	10%	15%	20%	25%
AGB-025	25 bB	23 bB	55 aA	12 cC	30 bB
AGB-110	31 aB	34 aB	55 aA	34 bB	23 cC
AGB-148	10 dC	16 cC	40 bA	28 bB	12 dC
AGB-203	5 eD	6 dD	40 bB	65 aA	20 cC
AGB-206	15 cC	20 bB	30 cA	6 dD	5 dD
AGB-207	5 eC	7 dC	50 aA	35 bB	8 dC
AGB-432	26 bA	20 bA	28 cA	5 dB	25 cA
AGB-495	22 bB	18 bB	35 cA	14 cB	10 dB
AGB-526	13 cC	24 bB	43 bA	23 bB	20 cB
AGB-651	7 eC	23 bB	5 dC	10 cC	40 aA
Variation factor	Degrees of freedom		Mean square	F value	
Accessions	9		0.079	87.902**	
Sucrose	4		0.318	355.123**	
Accessions × Sucrose	36		0.125	140.231**	
Error	144		0.001		
Coefficient of variation (%)			8.48		
Accessions	Pollen tube length (mm)				
	5%	10%	15%	20%	25%
AGB-025	0.34 bB	0.32 cC	0.40 cB	0.60 aA	0.41 bB
AGB-110	0.37 bC	0.45 aB	0.49 bB	0.61 aA	0.45 bB
AGB-148	0.37 bC	0.36 bC	0.58 aA	0.63 aA	0.41 bB
AGB-203	0.33 bB	0.37 bB	0.44 cA	0.45 dA	0.45 bA
AGB-206	0.34 bC	0.37 bB	0.57 aA	0.50 cA	0.41 bB
AGB-207	0.33 bB	0.32 cB	0.46 cA	0.42 dA	0.29 dB
AGB-432	0.37 bB	0.38 bB	0.55 aA	0.56 bA	0.43 bB
AGB-495	0.46 aB	0.37 bC	0.60 aA	0.61 aA	0.50 aB
AGB-526	0.36 bA	0.40 bA	0.30 dB	0.32 eB	0.37 cA
AGB-651	0.34 bB	0.32 cC	0.40 cB	0.60 aA	0.41 bB

Accessions	Pollen tube length (mm)				
	5%	10%	15%	20%	25%
Variation factor	Degrees of freedom		Mean square		F value
Accessions	9		0.347		47.710**
Sucrose	4		1.117		153.548**
Accessions × Sucrose	36		0.092		12.626**
Error	1081		0.007		
Coefficient of variation (%)			19.67		

Means followed by the same upper-case letter in the row and lower-case letter in the column, within the same factor, do not differ by the Scott-Knott test ** ($p \leq 0.01$). AGB-25, AGB-203, AGB-206, AGB-207, AGB-432 and AGB-651 = *A. comosus* var. *ananassoides*; AGB-148 and AGB-526 = *A. comosus* var. *comosus*; and AGB-495 and AGB-110 = *A. comosus* var. *bracteatus*.

In the *in vivo* pollinations with cryopreserved pollen grains, seeds were formed in 18 of the total 24 combinations analyzed (Table 4, Fig. 1C). So, only six combinations were not successful, including between varieties and within the same botanical variety. The largest number of seeds was produced by the cross between AGB-081 (*A. macrodontes*) as male parent and AGB-223 (*A. comosus* var. *ananassoides*) as female parent, with an average of 7.5 seeds per pollinated flower (Fig. 1D). It should be noted that this is an interspecific cross. Accessions AGB-081, AGB-110, AGB-144, AGB-148, AGB-179, AGB-296, AGB-345 and AGB-690 as male parents formed seeds in all the crosses carried out (Table 4).

4. Discussion

4.1. Establishment of the culture medium for germination of the pollen

The germination percentages varied in function of the accessions instead of the botanical varieties, confirming the genotype dependence of *in vitro* germination of pineapple pollen grains. This significant effect of genotype has been reported based on various experimental tests with wild pineapple plants for purposes of micropropagation or to verify behavior after *in vitro* preservation (Souza et al., 2012b, Silva et al., 2016) or after cryopreservation (Souza et al., 2016). The *in vitro* germination of pollen grains is influenced by several factors, such as sucrose concentration in the culture medium, genotype, nutritional state of the plants, time of day and method of collecting pollen grains, photoperiod, temperature, incubation

period and composition of the culture medium (Taylor and Hepler, 1997, Soares et al., 2008).

In the present study, the sucrose concentration was a determining factor for the *in vitro* germination success. Soares et al. (2011), in a study involving other wild pineapple accessions, also obtained better *in vitro* germination of pollen grains in BK medium with a 15% sucrose concentration, and suggested that the low germination rates of some accessions might have been related to the culture medium itself and the excess hydration of the pollen grains, since the organic and inorganic compounds contained in the culture medium (e.g., sucrose, agar, boron and calcium) can interfere *in vitro* germination (Galletta, 1983, Holdaway-Clarke et al., 2003, Soares et al., 2008). Therefore, the germinative potential of a genotype cannot be discarded based only on the particular conditions imposed by the test.

The best results regarding pollen tube length in this study were achieved with sucrose concentrations of 15% and 20%, demonstrating that the sugar concentration influences the germination and growth of pollen of pineapple accessions. The tube length is a very important metric, because it indicates how much the culture medium contributed to the development of the tubes. The proper sucrose concentration assures osmotic balance between the pollen grains and the culture medium, besides being an important source of energy for the pollen tube to develop (Galletta, 1983). The presence of substances like calcium nitrate and boric acid also influences the osmotic balance and their shortage or excess in the culture medium can cause the pollen grains to rupture, and hence impair the viability results (Brewbaker and Kwack, 1963).

Table 2. Moisture of the entire anther, *in vitro* pollen germination percentage and pollen tube length of different wild pineapple accessions after different dehydration times on silica gel in closed containers.

Accessions	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
	Moisture of the entire anther (%)				
AGB-047	81.25 aA	46.34 aB	29.67 aC	19.47 aD	21.33 aD
AGB-081	75.37 aA	46.08 aB	27.90 aC	20.20 aC	19.73 aC
AGB-110	83.53 aA	42.23 aB	28.30 aC	22.15 aC	21.51 aC
AGB-141	84.74 aA	50.33 aB	30.20 aC	21.68 aD	19.50 aD
AGB-144	78.92 aA	41.12 aB	26.32 aC	22.01 aC	19.06 aC
AGB-148	76.08 aA	49.07 aB	27.67 aC	19.85 aD	20.14 aD
AGB-179	80.50 aA	47.54 aB	26.90 aC	20.45 aC	21.08 aC

AGB-296	79.80 aA	50.04 aB	28.56 aC	20.98 aC	20.56 aC
AGB-344	82.65 aA	42.15 aB	30.40 aC	19.57 aD	19.80 aD
AGB-345	77.48 aA	45.18 aB	27.68 aC	21.35 aC	19.74 aC
AGB-411	80.23 aA	48.22 aB	28.96 aC	20.85 aC	20.97 aC
AGB-690	79.74 aA	50.07 aB	29.45 aC	20.65 aC	21.59 aC
AGB-776	82.80 aA	44.37 aB	30.18 aC	21.24 aC	20.18 aC

Variation factor	Degrees of freedom	Mean square	F value
Accessions	12	0.127	4.511**
Time	4	0.075	2.692**
Accessions × Time	48	0.365	13.008**
Error	325	0.028	
Coefficient of variation (%)		21.31	

In vitro pollen germination (%)

AGB-047	10.50 dA	10.25 dA	10.10 dA	7.33 cA	10.10 dA
AGB-081	43.33 aA	40.33 aA	40.33 aA	31.10 aB	30.33 bB
AGB-110	30.33 bA	31.10 bA	30.67 bA	23.25 bB	25.67 bB
AGB-141	31.13 bA	30.25 bA	32.33 bA	28.67 bA	30.25 bA
AGB-144	22.10 cA	22.10 cA	20.10 cA	20.33 bA	18.10 cA
AGB-148	18.00 cA	16.33 dA	16.25 dA	4.10 dB	4.33 eB
AGB-179	32.10 bA	30.67 bA	30.33 bA	22.25 bB	27.67 bA
AGB-296	31.33 bA	30.25 bA	28.10 bA	5.10 dB	6.33 dB
AGB-344	46.67 aA	44.33 aA	45.10 aA	33.67 aB	40.25 aB
AGB-345	13.33 dA	11.25 dA	10.25 dA	10.33 dA	8.33 dB
AGB-411	11.10 dA	9.67 dB	8.67 dB	5.25 dC	6.10 eC
AGB-690	14.10 dA	12.33 dA	12.25 dA	8.33 cB	8.25 dB
AGB-776	17.25 cA	15.10 dA	15.33 dA	12.67 cB	13.10 dB

Variation factor	Degrees of freedom	Mean square	F value
Accessions	12	0.300	70.989**
Time	4	0.004	1.071**
Accessions × Time	48	0.073	17.236**
Error	325	0.004	
Coefficient of variation (%)		14.24	

Accessions	Pollen tube length (mm)				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
AGB-047	0.60 aA	0.60 aA	0.59 aA	0.28 aB	0.28 aB
AGB-081	0.63 aA	0.60 aA	0.60 aA	0.30 aB	0.29 aB
AGB-110	0.59 aA	0.57 aA	0.58 aA	0.28 aB	0.30 aB
AGB-141	0.50 bA	0.47 bA	0.49 bA	0.34 aB	0.30 aB
AGB-144	0.59 aA	0.60 aA	0.59 aA	0.23 cB	0.31 aB
AGB-148	0.49 bA	0.49 bA	0.47 bA	0.31 aB	0.29 aB
AGB-179	0.62 aA	0.60 aA	0.62 aA	0.29 aB	0.28 aB
AGB-296	0.53 bA	0.51 bA	0.50 bA	0.24 bB	0.20 cB
AGB-344	0.50 bA	0.48 bA	0.46 bA	0.27 bB	0.25 bB
AGB-345	0.59 aA	0.57 aA	0.56 aA	0.27 bB	0.25 bB

AGB-411	0.59 aA	0.57 aA	0.56 aA	0.30 aB	0.25 bB
AGB-690	0.69 aA	0.67 aA	0.67 aA	0.28 aB	0.30 aB
AGB-776	0.60 aA	0.60 aA	0.59 aA	0.32 aB	0.28 aB
Variation factor	Degrees of freedom	Mean square	F value		
Accessions	12	0.083	21.972**		
Time	4	5.318	1406.614**		
Accessions × Time	48	0.033	8.805**		
Error	1560	0.004			
Coefficient of variation (%)		18.47			

Means followed by the same upper-case letter in the row and lower-case in the column, within the same factor, do not differ by the Scott-Knott test ** ($p \leq 0.01$). AGB-141, AGB-144, AGB-148, AGB-179, AGB-296, AGB-344, AGB-345 and AGB-411 = *Ananas comosus* var. *comosus*; AGB-25 and AGB-432 = *A.comosus* var. *ananassoides*; AGB-47, AGB-110, AGB-690 and AGB-776 = *A.comosus* var. *bracteatus*; and AGB-81 = *A. macrodontes*.

4.2. Dehydration of the pollen

Dehydration on silica gel was chosen based on the results of the study of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) carried out by Souza et al. (2015), mainly because of its better repeatability than other methods used. Evaluation of the different dehydration times was important, because it allowed combining better pollen germination percentages *in vitro* with greater pollen tube growth and with lower moisture level, a premise suggested as fundamental for the success of preserving pollen of bromeliads by Souza et al. (2015). To achieve successful cryopreservation, some authors have suggested that the moisture of the pollen grains should be around 30% (Towill, 2000, Souza et al., 2015), to avoid the formation of ice crystals and rupture of the exine layers (Benson, 2008, Souza et al., 2015).

Table 3. *In vitro* germination percentage and pollen tube length of cryopreserved pollen of different wild pineapple accessions.

Accessions	<i>In vitro</i> pollen germination (%)		
	24 h	60 d	120 d
AGB-47	72.10 b	68.67 b	62.67 c
AGB-81	95.33 a	92.25 a	94.25 a
AGB-110	82.25 a	76.33 b	77.33 b
AGB-141	65.67 b	70.10 b	71.67 b
AGB-144	30.33 d	32.25 d	30.10 e
AGB-148	35.10 d	30.67 d	28.33 e
AGB-179	20.10 e	20.10 e	24.25 e
AGB-296	33.67 d	30.67 d	35.67 d

Accessions	<i>In vitro</i> pollen germination (%)		
	24 h	60 d	120 d
AGB-344	38.33 d	42.33 d	40.10 d
AGB-345	54.25 c	50.10 c	53.33 d
AGB-411	6.33 e	8.25 e	8.25 e
AGB-690	64.33 b	60.10 c	57.10 c
AGB-776	68.10 b	63.25 c	60.25 c
Variation factor	Degrees of freedom	Mean square	F value
Accessions	12	1.439	918,221**
Time	2	0.007	4.466 ^{ns}
Accessions x Time	24	0.007	4.298 ^{ns}
Error	195	0.001	
Coefficient of variation (%)		18.20	

Accessions	Pollen tube length (mm)		
	24 h	60 d	120 d
AGB-47	0.43 cA	0.44 cA	0.49cA
AGB-81	0.55 bA	0.55 cA	0.61aA
AGB-110	0.48 cA	0.48cA	0.46dA
AGB-141	0.46 cA	0.52bA	0.50cA
AGB-144	0.38 dA	0.37dA	0.41dA
AGB-148	0.61 aA	0.50cA	0.61aA
AGB-179	0.55 bA	0.40dA	0.55bA
AGB-296	0.45 cA	0.48cA	0.43dA
AGB-344	0.51 bA	0.47cA	0.52bA
AGB-345	0.31 dB	0.38dA	0.40dA
AGB-411	0.25 eA	0.24eA	0.23eA
AGB-690	0.63 aA	0.60aA	0.63aA
AGB-776	0.54 bA	0.54bA	0.60aA
Variation factor	Degrees of freedom	Mean square	F value
Accessions	12	0.777	136.760**
Time	2	0.146	25.769**
Accessions x Time	24	0,069	12.175**
Error	924	0,006	
Coefficient of variation (%)		15.84	

Means followed by the same upper-case letter in the row and lower-case in the column, within the same factor, do not differ by the Scott-Knott test ** ($p \leq 0.01$), ^{ns} = not significant. AGB-141, AGB-144, AGB-148, AGB-179, AGB-296, AGB-344, AGB-345 and AGB-411 = *Ananas comosus* var. *comosus*; AGB-25 and AGB-432 = *A.comosus* var. *ananassoides*; AGB-47, AGB-110, AGB-690 and AGB-776 = *A.comosus* var. *bracteatus*; and AGB-81 = *A. macrodontes*.

Table 4. Number of pollinations and seeds generated after cross-pollination involving different wild pineapple accessions with cryopreserved pollen.

♂	♀												
	AGB-020	AGB-035	AGB-110	AGB-141	AGB-144	AGB-211	AGB-223	AGB-230	AGB-336	AGB-345	AGB-370	AGB-411	AGB-703
AGB-047	5/3	–	–	–	5/0	–	–	–	3/4	–	–	5/0	–
AGB-081	–	8/11	–	5/8	–	–	8/60	–	–	–	–	–	–
AGB-110	–	–	–	–	–	–	–	7/10	8/16	–	–	–	–
AGB-141	–	–	7/0	–	–	–	–	–	–	5/9	–	–	–
AGB-144	–	–	3/5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AGB-148	–	–	–	–	–	–	–	5/7	–	–	–	–	–
AGB-179	–	–	–	–	5/7	–	–	–	–	–	–	–	–
AGB-344	–	–	5/0	5/9	–	–	–	–	–	–	5/0	–	–
AGB-411	–	–	–	6/0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AGB-296	–	–	–	–	–	5/7	–	–	–	–	–	–	–
AGB-345	–	–	–	5/3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AGB-690	–	–	–	–	–	–	–	–	5/4	–	–	–	–
AGB-776	–	–	–	–	–	–	–	2/3	3/5	–	–	–	2/0

Number of pollinations/number of seeds generated. AGB-141, AGB-144, AGB-148, AGB-179, AGB-296, AGB-336, AGB-344, AGB-345, AGB-370 and AGB-411 = *Ananas comosus* var. *comosus*; AGB-025 and AGB-432 = *A. comosus* var. *ananassoides*; AGB-020, AGB-035, AGB-047, AGB-110, AGB-690 and AGB-776 = *A. comosus* var. *bracteatus*; and AGB-081 = *A. macrodontes*; AGB-223, AGB-230 and AGB-703 = *A. comosus* var. *ananassoides* and AGB-211 = *A. comosus* var. *paraguayensis*.

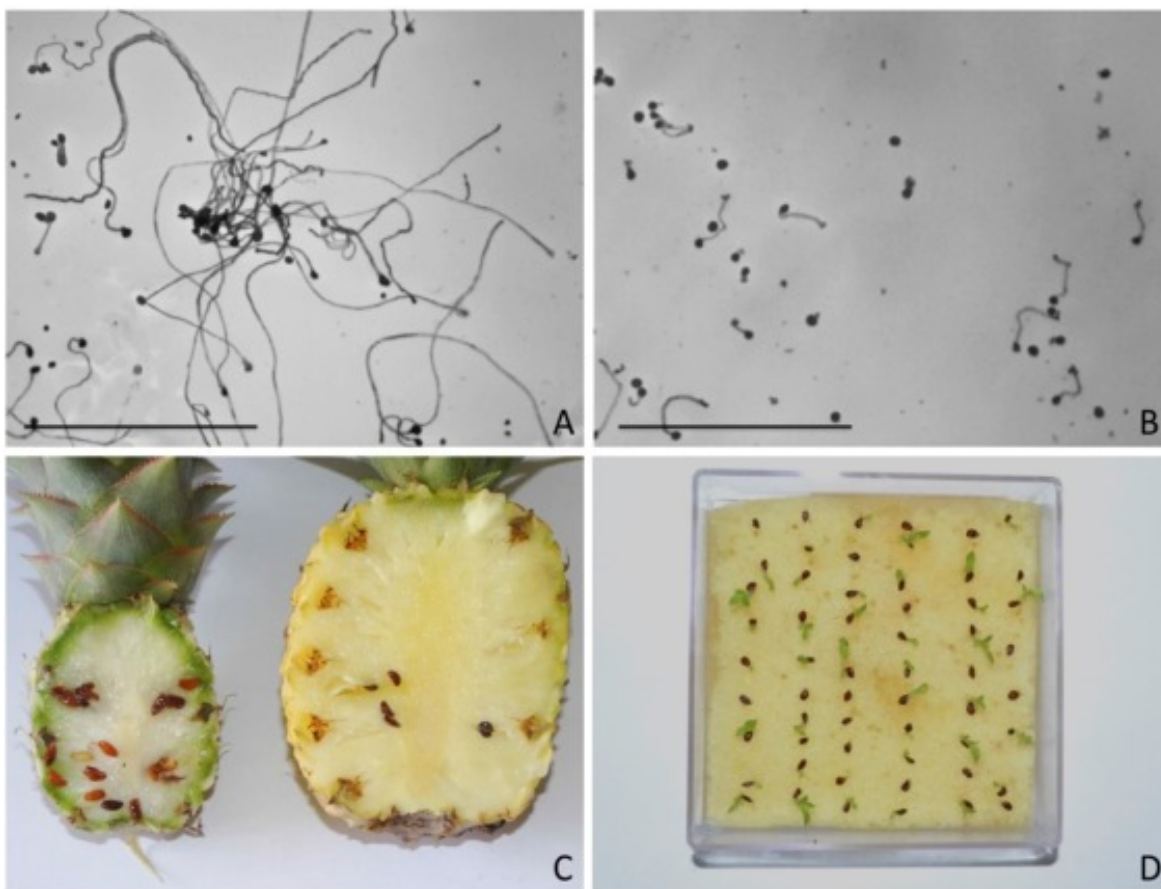


Fig. 1. *In vitro* germination of pollen grains cultured in BK medium (Brewbaker and Kwack, 1963) with 15% sucrose for accessions AGB-081 (*A. macrodontes* E. Morren) (A); AGB-411 (*Ananas comosus* var. *comosus*) (B) from the Active Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Fruits. C) Fruits with seeds from pollinations with cryopreserved pollen grains. D) Germination of seeds from crosses with cryopreserved pollen grains of accession AGB-081 with accession AGB-223 (*A. comosus* var. *ananassoides*) after preservation for 30 days. Bars: 0.5 mm.

This low moisture level is crucial for successful cryopreservation not only of pollen grains, but of many other plant structures (Benson, 2008). Various articles have indicated that the formation of ice crystals during freezing impairs the osmotic, structural and colligative integrity of cells, and hence causes physical

damage and mechanical injury (Song and Tachibana, 2007, Benson, 2008, Xu et al., 2014, Souza et al., 2015).

In this study, the ideal moisture level (around 30%) was attained after 6 h of dehydration on silica gel, so this interval is recommended for pineapple pollen. In another bromeliad, Souza et al. (2015) attained the same moisture level after 3 h, also using silica gel, indicating the need to adjust the time to each species. This difference in optimal dehydration time is possibly related to the difference in pollen grain sizes between these species. Soares et al. (2011), studying different pineapple botanical varieties, observed that the pollen grains varied in size from 44.7 μm to 53.06 μm , while Souza et al. (2015), studying *Aechmea bicolor*, described pollen grains with size of 21.95 μm .

4.3. Preservation and viability of the pollen

The results obtained after cryopreservation showed that this method is very promising for conservation of wild pineapple pollen grains. After all three preservation intervals evaluated, the different pineapple accessions maintained good *in vitro* germination rates, demonstrating that the grains can remain viable for use after being frozen at very low temperature. The absence of a significant difference of the three conservation times corroborates the theory that metabolism stops just a few hours after immersion in liquid nitrogen (Lambardi et al., 2008).

An interesting aspect was that the preservation in liquid nitrogen increased the viability percentages in the great majority of accessions in relation to the viability of the fresh pollen grains germinated, the exception being AGB-411. This increase in germination percentage can possibly be attributed to the ultra-low temperature or the dehydration, either or both of which may have permitted breaking the dormancy of the grains, and consequently increasing the germination rate. Wang et al. (2012) reported that dehydration is considered one of the determining factors for controlling the dormancy of pollen grains. No studies have been published on the dormancy of pineapple pollen, but in various species self-incompatibility might be the result of the dormancy of pollen grains, which in reality is nothing more than a strategy to avoid this phenomenon and consequently endogamy. It is known that pineapple is self-incompatible (Coppens d'Eeckenbrugge et al., 2011) and this low germination rate of the fresh grains

observed in this study, which is compatible with the results reported by other authors, might be part of this mechanism to prevent self-fecundation. Soares et al. (2011), investigating the pollen viability of wild pineapple plants, also obtained low germination rates for accessions of *A. comosus* var. *bracteatus*. The exposure to liquid nitrogen might have broken this dormancy and assured higher germination rates after preservation. Is it also necessary to consider that the low germination rates might have resulted from the choice of culture medium. However, since the same medium was used before and after freezing, the effect of nitrogen on the germination was clear.

With respect to conservation time, there was no loss of viability of any accession, since the germination percentages remained stable until the end of the experiment at 120 days. Souza et al. (2015) described that the viability of pollen grains of *A. bicolor* remained stable for up to one year and mooted the possibility of preservation for longer periods.

Evrenosoğlu et al., (2011) and Giordani et al. (2013), studying the preservation of persimmon pollen (*Diospyros* spp.) at low and ultra-low temperatures, noted a positive and significant effect on viability and germination *in vitro* after preservation in liquid nitrogen. Those results are compatible with ours for pineapple.

The consolidation of these results was obtained with the *in vivo* fertilization from the cryopreserved pollen grains, since a large number of seeds were produced after preservation for 120 days in liquid nitrogen (Table 4). It should be highlighted that the pineapple plant is infrutescence, so it was not possible to quantify the seeds per flower, only per fruit.

Although some pollinations were not successful, all the accessions except AGB-411 formed seeds from at least one cross, indicating the possibility of preserving pollen grains in this condition. The failure to form seeds by some combinations might have been due to the incompatibility between accessions rather than to preservation problems. AGB-047 is a good example of this, since it presented high *in vitro* germination rates after freezing (about 70%) but a low setting rate and seed formation in the crosses. On the other hand, accessions like AGB-411 presented low germination rates under all the conditions analyzed and no seed formation from *in vivo* crossing after thawing. Incompatibility can only be confirmed by studying the growth of the pollen tube on the stigma, which we did

not do. This can be accomplished by fluorescence microscopy or by molecular analysis.

Various authors have confirmed the efficiency of conservation of different species by *in vivo* pollination, such as orchids (Vendrame et al., 2008), camellias (Li et al., 2011) and bromeliad (Souza et al., 2015). Li et al. (2011) reported an increase in the fruiting percentage in two crosses (*C. chekiangoleosa* X *C. japonica* 'DaHuaJinXin' and *C. japonica* 'NaiDong' X *C. chekiangoleosa*) using pollen grains after cryopreservation for one year.

The results obtained in this work are groundbreaking and will allow the implementation of the technique for the other accessions preserved at the Pineapple Active Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Fruits, aiming to minimize problems of asynchronous flowering of the species and thus contribute to genetic improvement programs, and equally important, to provide an alternative to protect the germplasm of the genus *Ananas*.

Acknowledgements

To the Office to Improve University Personnel (CAPES) of the Brazilian Ministry of Education for the doctoral scholarship granted to R. L. Silva and postdoctoral to E. H. Souza and L. J. Vieira.

References

Alba, V., Bisignano, V., Alba, E., Stradis, A., Polignano, G.B. **Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen.** *Genet. Resour. Crop.Evol.*, 58 (2011), pp. 977-982, 10.1007/s10722-011-9736-z.

Bajaj, Y.P.S. **Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity.** In: Y.P.S. Bajaj (Ed.), **Cryopreservation of Plant Germplasm I**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1995), pp. 3-28, 10.1007/978-3-662-03096-7_1.

Benson, E.E. **Cryopreservation theory.** In: B.M. Reed (Ed.), **Plant Cryopreservation**, A Practical Guide, Springer, New York (2008), pp. 15-32, 10.1007/978-0-387-72276-4_2.

BettioNeto, J.M., DelNeto, M., Kavati, R., Pinto-Maglio, C.A.F. **Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais.** *Bragantia*, 68 (2009), pp. 825-837, 10.1590/S0006-87052009000400002.

Brewbaker, J.L., Kwack B.H. **The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth.** *Am. J. Bot.*, 50 (1963), pp. 859-865.

Coppensd'Eeckenbrugge, G., Sanewski, G.M., Smith, M.K., Duval, M.F. F., Leal. **Ananas.** Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Tropical and Subtropical Fruits*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2011), pp. 21-41, 10.1007/978-3-642-20447-0.

Evrenosoğlu, Y., Acarsoy, N., Misirli, A. **Investigations on fertilization biology and description of fruit characteristics of some persimmon (*Diospyros kaki*) cultigens.** *Afr. J. Agric. Res.*, 6 (2011), pp. 1383-1392, 10.5897/AJAR11.090.

Galletta, G.J. **Pollen and seed management.** Moore, J.N., Janinick, J. (Eds.), **Methods in Fruit Breeding**, Purdue University Press, pp 23 - 47 (1983).

Giordani, E., Naval, M., Benelli, C. **In vitro propagation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.).** Lambardi, M., Ozudogru, E.A., Jain, S.M. (Eds.), **Protocols for**

Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Humana Press, New York (2013), pp. 89-98, 10.1007/978-1-62703-074-8_7.

González-Arno, M.T., Ravelo, M.M., Urra, C., Martínez-Montero, M.E., Engelmann, F. **Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices**. *CryoLetters*, 19 (1998), pp. 375-382.

Holdaway-Clarke, T.L., Weddle, N.M., Kim, S., Robi, A., Parris, C., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. **Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes**. *J. Exp. Bot.*, 54 (2003), pp. 65-72, 10.1093/jxb/erg004.

Hossain, A.B.M.S., Saleh, A.A., Aishah, S., Boyce, A.N., Chowdhury, P.P., Naquiuddin, M. **Bioethanol production from agricultural Waste biomass as a renewable bioenergy resource in biomaterials**. *IFMBE Proceed.*, 21 (2008), pp. 300-305, 10.1007/978-3-540-69139-6_77.

Hu, W., Liu, S., Liaw, S. **Long-term preconditioning of plantlets: a practical method for enhancing survival of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) shoot tips cryopreserved using vitrification**. *CryoLetters*, 36 (2015), pp. 226-236.

Lambardi, M., Ozudogru, A., Benelli, C. **Cryopreservation of embryogenic cultures**. Reed B.M. (Ed.), **Plant Cryopreservation**, A Practical Guide, Springer, New York (2008), pp. 177-194, 10.1007/978-0-387-72276-4_9.

Li, B., Wang, H., Liu, Y. **Pollen cryopreservation of *Camellia***. *Acta Hortic.*, 908 (2011), pp. 265-268, 10.17660/ActaHortic.2011.908.34.

Manetti, L.M., Delaporte, R.H., Laverde Junior, A. **Metabólitos secundários da família Bromeliaceae**. *Quim. Nova*, 32 (2009), pp. 1885-1897.

Martínez-Montero, M.E., Martínez, J., Engelmann, F., González-Arno, M.T. **Cryopreservation of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] apices and calluses**. *Acta Hortic.*, 666 (2005), pp. 127-130, 10.17660/ActaHortic.2005.666.12.

Panis, B. Lambardi, M. **Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The Role of Biotechnology**, Villa Gualino, Turin, Italy (2006).

Parton, E., Vervaeke, I., Delen, R., Vandenbussche, B., Deroose, R. **Viability and storage of bromeliad pollen.***Euphytica*, 125 (2002), 10.1023/A:1015884019619.

Paz, E.Y., Gil, K., Rebolledo, L., Rebolledo, A., Uriza, D., Martínez, O., Isidrón, M., Díaz, L., Lorenzo, J.C., Simpson, J. **Genetic diversity of Cuban pineapple germplasm assessed by AFLP Markers.** *Crop Breed.Appl. Biotechnol.*, 12 (2012), pp. 104-110, 10.1590/S1984-70332012000200002.

Reed, B.M., Sarasan, V., Kane, M., Brunn, E., Pence, V.C. **Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools.***In Vitro Cell.Dev.-Plant*, 47 (2011), pp. 1-4, 10.1007/s11627-010-9337-0.

SAS Institute. **Inc. Sas/Stat Users Guide: Statistics, Version 9.2.** SAS Institute Cary, NC, USA (2010).

Sanewski, G.M. **Breeding *Ananas* for the cut-flower and garden markets.***Acta Hortic.*, 822 (2009), pp. 71-78, 10.17660/ActaHortic.2009.822.7.

Scorza, R., Sgerman, W.B. **Peaches.** Janik, J., Morre, J.N. (Eds.), *Fruit Breeding*, John and Sons, New York (1995), pp. 325-440.

Sena 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.** *Ind. Crop.Prod.*, 43 (2013), pp. 529-537, 10.1016/j.indcrop.2012.08.001.

Sena Neto, A.R., Araujo, M.A.M., Barboza, R.M.P., Fonseca, A.S., Tonoli, G.H., Souza, F.V.D., Mattoso, L.H.C., Marconcini, J.M. **Comparative study of 12 pineapple leaf fiber varieties for use as mechanical reinforcement in polymer composites.** *Ind. Crop Prod.*, 64 (2015), pp. 68-78, 10.1016/j.indcrop.2014.10.042

Silva, R.L., Ferreira, C.F., Ledo, C.A.S., Souza, E.H., Silva, P.H., Costa, M.A.P.C., Souza, F.V.D. **Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. Plant Cell Tiss.Org.**, 127 (2016), pp. 123-133, 10.1007/s11240-016-1035-0.

Soares, T.L., Silva, S.O., Costa, M.A.P.C., Santos-Serejo, J.A., Souza, A.S., Lino, L.S.M., Souza, E.H., Jesus, O.N. **In vitro germination and viability of pollen grains of banana diploids. Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, 8 (2008), pp. 111-118, 10.12702/1984-7033.v08n02a03.

Soares, T.L., Souza, E.H., Rossi, M.L., Souza, F.V.D. **Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. Cienc Rural**, 41 (2011), pp. 1744-1749, 10.1590/S0103-84782011001000011.

Song, J., Tachibana, S. **Loss of viability of tomato pollen during long-term dry storage is associated with reduced capacity for translating polyamine biosynthetic enzyme genes after rehydration. J. Exp. Bot.**, 58 (2007), pp. 4235-4244, 10.1093/jxb/erm280.

Souza, E.H., Souza, F.V.D., Costa, M.A.P.C., Costa, J.R.D.S., Santos-Serejo, J.A., Amorim, E.P., Ledo, C.A.S. **Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. Genet. Resour. Crop Evol.**, 59 (2012), pp. 1357-1376, 10.1007/s10722-011-9763-9.

Souza, E.H., Souza, F.V.D., Carvalho, M.J.S., Souza, A.S., Carvalho, M.A.P. **Growth regulators and physical state of culture media in the micropropagation of ornamental pineapple hybrids. Plant Cell Cult.Microp.**, 8 (2012), pp. 1-12.

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. Rev. Cien. Agron.**, 45 (2014), pp. 409-416, 10.1590/s1806-66902014000200024.

Souza, E.H., Souza, F.V.D., Rossi, M.L., Brancalleão, N., Ledo, C.A.S., Martinelli, A.P. **Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor***

(Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. *Euphytica*, 204 (2015), pp. 13-28, 10.1007/s10681-014-1273-3.

Souza, F.V.D., Kaya, E., Vieira, L.J., Souza, E.H., Amorim, V.B.O., Skogerboe, D., Matsumoto, T., Alves, A.A.C., Ledo, C.A.S., Jenderek, M.M. **Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes.** *Plant Cell Tiss.Org.*, 124 (2016), pp. 351-360, 10.1007/s11240-015-0899-8.

Sun, J., Chu, Y., Wu, X., Liu, R.H. **Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits.** *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002), pp. 7449-7454, 10.1021/jf0207530.

Taylor, L.P., Hepler, P.K. **Pollen germination and tube growth.** *Ann. Rev. Plant Phys.*, 48 (1997), pp. 461-491, 10.1146/annurev.arplant.48.1.461.

Towill, L.E. **Germplasm preservation.** Trigiano, R.N., Gray, D.J. (Eds.), *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, CRC Press, Boca Raton (2000), pp. 337-353.

Vendrame, W.A., Carvalho, V.S., Dias, J.M.M., Maguire, I. **Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen.** *HortScience*, 43 (2008), pp. 264-267.

Volk, G.M., Bonnart, R., Shepherd, A., Krueger, R.R., Lee, R. **Cryopreservation of *Citrus* for long-term conservation.** *Acta Hort.*, 165 (2015), pp. 187-191, 10.17660/ActaHortic.2015.1065.19.

Wang, Y., Chu, Y.J., Xue, H.W. **Inositol polyphosphate 5-phosphatase-controlled Ins(1, 4, 5)P₃/Ca²⁺ is crucial for maintaining pollen dormancy and regulating early germination of pollen.** *Development*, 139 (2012), pp. 2221-2233, 10.1242/dev.08122.

Xu, J., Liu, Q., Jia, M., Liu, Y., Li, B., Shi, Y. **Generation of reactive oxygen species during cryopreservation may improve *Lilium* × *Siberia* pollen viability.** *In Vitro Cell.Dev.-Plant*, 50 (2014), pp. 369-375, 10.1007/s11627-014-9615-3.

CAPÍTULO 3

Urban backyards as a new model of pineapple germplasm conservation

¹Artigo publicado:

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; LÊDO, C. A. S.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. D. Urban backyards as a new model of pineapple germplasm conservation. **Plant Genetic Resources-Characterization and Utilization**, v. Online, p. 1-9, 2018.

Urban backyards as a new model of pineapple germplasm conservation

Ronilze Leite da Silva^{1,4}, Everton Hilo de Souza^{2,4}, Carlos Alberto da Silva Ledo³, Claudinéia Regina Pelacani¹ and Fernanda V. Duarte Souza^{3*}

¹ Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brazil, ² Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia, Brazil, ³ Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Cruz das Almas, Bahia, Brazil and ⁴ Programa de Bolsas Capes-Embrapa (CAPES), Brazil.

Abstract

The conservation of pineapple in urban backyards is an innovative strategy that aims to involve city residents. A program of this nature requires careful planning and monitoring because of the involvement of people who do not have technical knowledge. This paper reports the implementation and evaluation of 30 gardens in urban backyards in Cabaceiras do Paraguaçu, Bahia, Brazil, to establish the parameters to allow creating a model for pineapple germplasm conservation cells with the collaboration of urban residents. A questionnaire was applied in two steps to people interested in participating, from which it was possible to choose and evaluate a general profile of the participants. Thirty pineapple accessions from the Active Germplasm Bank (AGB) of the Embrapa were selected for testing in the gardens. Two production cycles were considered, during which quantitative and qualitative traits of the plants and fruits were evaluated. The data were compared with the characteristics of the same accessions in the Pineapple AGB and were analysed by mixed principal component analysis. With respect to adequate maintenance, 20 gardens were well cared for until the end of the assessments, five were reasonably well tended and five were lost, due to home remodelling or lack of care by the guardians. Despite the loss of the five gardens, no accession was totally lost, thanks to the experimental design with three plants of each accession in three different gardens. The plants preserved in the gardens did not differ from those maintained by the AGB, demonstrating the effectiveness of this conservation strategy.

Keywords: *Ananas comosus* (L.) Merr, genetic diversity, pineapple, preservation, urban guardians.

Introduction

The use of gardens in urban backyards for the conservation of plant species can be a good strategy to maintain the variability of species of medicinal, ornamental or commercial interest, among others, besides instilling in urban residents the concepts on proper use and conservation of agrobiodiversity (Akinnifesi *et al.*, 2010).

Embrapa Cassava and Fruits has an Active Germplasm Bank (AGB) with over 700 pineapple accessions kept in the field and nearly 300 preserved *in vitro*, with security backups, constituting one of the largest pineapple germplasm collections in the world (Souza *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016). Nevertheless, risks of losses exist both in the field and laboratory. In reaction to these problems, there is growing demand for new strategies for preservation of germplasm, ranging from cryopreservation (Souza *et al.*, 2015) to conservation in urban gardens.

Few actions have been carried out to induce urban residents to plant and conserve in their backyards native species or those important to a region. Most such actions have occurred in European countries and USA, where efforts at participative conservation have obtained relevant results. These experiences demonstrate that domestic gardens are a potential reservoir of genes, of great importance to local agriculture. Furthermore, studies have sought to contemplate the management aspects that are preponderant in this type of preservation (USDA, 1998; Bailey *et al.*, 2009; RCS, 2009, Veteläinen *et al.*, 2009; Negri *et al.*, 2012a,b; ECPGR, 2017). A study produced by the United Nations Human Settlements Program (UN-Habitat) in 2013 indicated that the urban share of the population in Latin America will reach 89% in 2050 (Alves and Marra, 2009). This forecast reveals the need to educate urban residents about the benefits of protecting the agrobiodiversity of the species that surround and feed them, aiming to establish a model for participative preservation of natural resources (Carvalho *et al.*, 2001).

However, there are no structured models for this type of program and the concept and format of this type of conservation need to be constructed considering the involvement of different actors, including city residents, research companies or agencies, universities and municipal officials. Validation of this new proposal is fundamental to guarantee the success of this conservation model, starting with

good development and propagation of plants and ending with their maintenance in the selected gardens. The model's success depends not only on citizens' understanding of the importance of the work but also their training to maintain the plants adequately.

Therefore, this paper describes the implementation of conservation cells in urban backyards, by recruiting urban dwellers as elements of the process and with the possibility of exploiting the use of conserved accessions. The paper discusses the different aspect that permeates this effort in 30 urban gardens in the municipality of Cabaceiras do Paraguaçu, Bahia, aiming to consolidate a complementary model for preservation and use of pineapple germplasm in partnership with urban residents.

Materials and methods

The study was conducted in Cabaceiras do Paraguaçu, located in the Recôncavo region of the state of Bahia, 160 Km from the capital (Salvador), with a population of 17,327 inhabitants according to the most recent census conducted by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2010). To establish the gardens, members of the staff of the Pineapple Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Fruits, through a member of the community associated with our Research Institute, carried out an informal survey of city residents who already had a tradition of growing local species in their backyards, asking about their interest in taking part in the Pineapple Conservation Project. Those who expressed interest were invited to attend a meeting, including a visit to the facilities of the Germplasm Bank, where the project was explained. Then an initial questionnaire was applied to ascertain whether the prospective participants satisfied the basic requirements: ownership of an urban property; availability of a suitable area and water resources; and interest in the work and understanding of its importance. The result allowed selecting 30 guardians. Next another questionnaire was administered to learn the profiles of those selected and to contribute to the establishment of the model, by eliciting the following information: home and street infrastructure (electricity, piped or well water, paving); number of persons in the household; number of children per household; schooling level of the owner; work aspects (working hours, professional occupation, sector); and gender.

In this evaluation, we also considered aspects related with the care of the gardens: a person who takes care of the yard; the level of yard care; and interest in participating and understanding of the Project.

Thirty accessions were selected from the Pineapple AGB, encompassing four botanical varieties of the genus *Ananas* (*A. comosus* (L.) Merr.var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F.Leal, *A. comosus* (L.) Merr.var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F.Leal, *A. comosus* var. *comosus* (L.)Merr., *A. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L.B.Sm.) Coppens & F.Leal) and one *Ananas* sp. accession. The accessions were introduced in the gardens in two steps, with 15 being planted in August 2014 and the other 15 in January 2015, and with three different accessions of three plants in each garden, where each accession was repeated three times across the 30 gardens. The three repetitions were planted in separate backyards, to reduce the risk of total loss of the accession or all the plants in a yard.

Each guardian was responsible for three different accessions, for a total of nine plants in each garden. The experimental design was completely randomized, with nine plants, from three accessions and three different botanical varieties, for a total of 30 backyards. Within the preserved accessions, plants were chosen belonging to different botanical varieties or that were easily distinguishable, in case of loss of the identification tag of each plant by the guardian. The choice of accessions gave priority to those already characterized for various purposes, and that would attract the interest of the guardians due to their characteristics: local varieties resistant to fusariosis, accessions with ornamental potential or containing fibres with qualities needed for handicrafts, among other parameters.

Of the selected accessions, five belong to the variety *Ananas comosus* var. *ananassoides* (AGB-025, AGB-323, AGB-377, AGB-465, AGB-651); five to the variety *A. comosus* var. *bracteatus* (AGB-35, AGB-408, AGB-495, AGB-584, AGB-690); 17 to *A. comosus* var. *comosus* (AGB-001, AGB-016, AGB-137, AGB-139, AGB-159, AGB-194, AGB-298, AGB-341, AGB-344, AGB-397, AGB-413, AGB-432, AGB-556, AGB-673, AGB-758, AGB-759, AGB-772); two to *A. comosus* var. *erectifolius* (AGB-804, AGB-820); and one to *Ananas* sp. (AGB-507). With respect to the uses of each botanical variety, we can mention the ornamental potential of *A. comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *bracteatus* and *A. comosus* var. *erectifolius*, since they stand out for the beauty of their stems with fruits or mini-

fruits (Souza *et al.*,2007, 2012). The variety *A. comosus* var. *erectifolius*, besides ornamental potential, stands out for its production of high-quality fibre with potential uses in a range of industrial segments and for handicrafts, as demonstrated by several articles (Sena Neto *et al.*,2015; Souza *et al.*,2017). Finally, *A. comosus* var. *comosus* has edible fruits with good organoleptic properties that can be eaten fresh or processed into jellies and compotes.

The areas in the backyards for planting the garden were prepared under the guidance of the project's curator and were monitored by an agricultural technician, according to the technical recommendations for the culture (Reinhardt *et al.*,1998). The guardians received a kit containing an illustrated manual to identify pests, diseases and nutritional deficiencies of pineapple plants (Matos *et al.*,2010), specific fertilizers and a technical circular describing the basic care for the plants, to make them as independent as possible. The plants were identified with tags affixed to small stakes next to the plants.

The work involved various actors, necessary for consolidation of this strategy, as depicted in Fig. 1. Besides the technical aspects, the project demanded motivational activities and the search for participants and partners among entities of the Cabaceiras do Paraguaçu municipal government and the Rural Association of Cabaceiras do Paraguaçu – Bahia (ARCACAP).

The plants were monitored during two complete cycles. A full cycle ranges from the initial planting to the formation of the fruit, which takes approximately 18 months (accompanied with instructions on how to renew the cultivation). During the evaluations, we also tried to infer the level of satisfaction of the guardians and the care of the gardens, by applying a second questionnaire and engaging in informal conversations. All the evaluations were concluded in March 2017. Gardens were considered to be well tended when there was: regular weeding; watering at least three times a week; fertilization as necessary; and no loss of plants or accessions due to failure to follow the basic care recommendations.

The urban gardens were evaluated according to the following quantitative and qualitative descriptors: plant height (cm), length and width of leaf 'D' (cm), length of the peduncle (cm), length and diameter of the inflorescence (cm), length and diameter of the syncarp (cm), length and diameter of the crown (cm), shape of the syncarp, habit of the plant, spine presence and variegation.

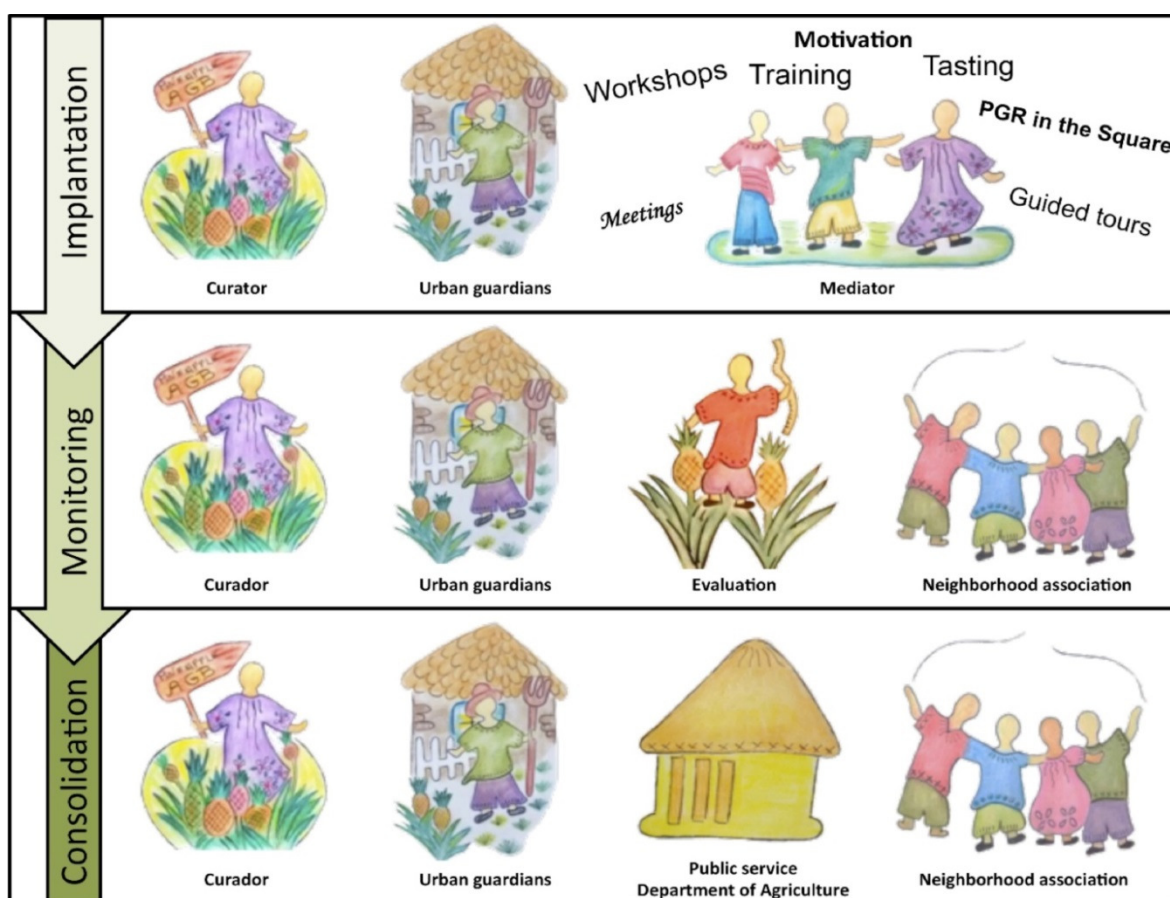


Fig. 1. Actors involved in the different steps of implementation and consolidation of the urban conservation gardens. Illustrations: Fernanda Vidigal Duarte Souza.

The gardens were visited monthly to verify flowering and the general condition of the plants. The data were tabulated and compared with morphological characterization data obtained in the field of Embrapa Cassava and Fruits, where accessions of the Pineapple AGB are maintained, as reported by Souza *et al.* (2012). The data were analysed by mixed principal component analysis with the PCAmixdata package of the R program (Chavent *et al.*, 2017). The significance of the cophenetic correlation was calculated by the Mantel test (10,000 permutations).

Results

Based on the initial criteria established, of having adequate infrastructure (property ownership, availability of a suitable area and water resources), we

selected 30 homeowners as guardians also due to their good understanding of the importance of the program. The results of the questionnaire given to evaluate their profiles showed that 100% of the homes had electricity and access to piped or well water; 75% of the streets were paved; the majority of households were small, varying from one to four people, with only one household having six members (Fig. 2(a)). The number of children per household varied from one to five, with the great majority having two children (Fig. 2(b)).

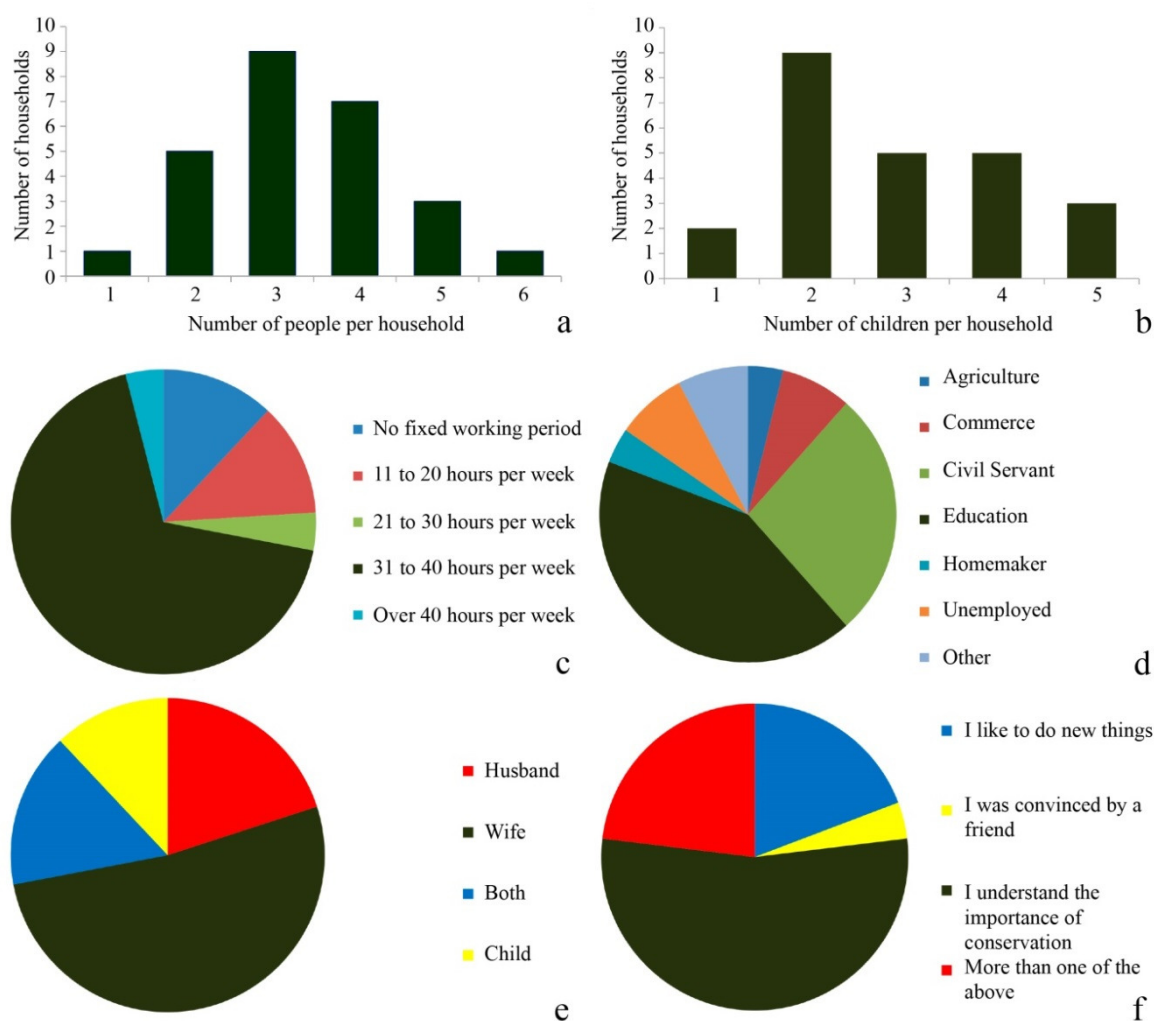


Fig. 2. Graphs presenting the socioeconomic aspects of the owners of the homes with urban gardens; (a) number of people per household; (b) number of children per household; (c) working period of the homeowners; (d) occupation/profession of the homeowners; (e) participation of each member of the household in caring for the urban garden; (f) motivation for participation in the project to preserve pineapple germplasm in urban gardens.

With respect to occupational aspects, 75% of the guardians worked up to 40 h a week (Fig. 2(c)), and more than 50% worked as educators, 25% were civil servants and the other 25% were engaged in sectors like agriculture, commerce or 'homemaker', among others (Fig. 2(d)). With respect to gender, 95% were women, although the care of the accessions involved several people in most households in 15% of the cases, the gardens were tended by children, 20% by men and more than 50% by women (Fig. 2(e)). When asked about their interest in the project, 60% of the participants stated they understood the importance of conservation, 15% were motivated by liking to do new things and the remaining 25% were prompted by both reasons (Fig. 2(f)). With respect to the quality of the care for the gardens, 75% were very well-tended, 15% well-tended, 5% reasonably cared for and 5% were neglected.

Regarding the morphological characterization, in both cycles, the qualitative and quantitative characteristics were considered, as represented by Fig. 3(a) and (b) and online Supplementary (Tables S1–S4). The significance of the correlation obtained by the Mantel tests was $r = 0.87$, demonstrating the similarity and stability between cycles 1 and 2.

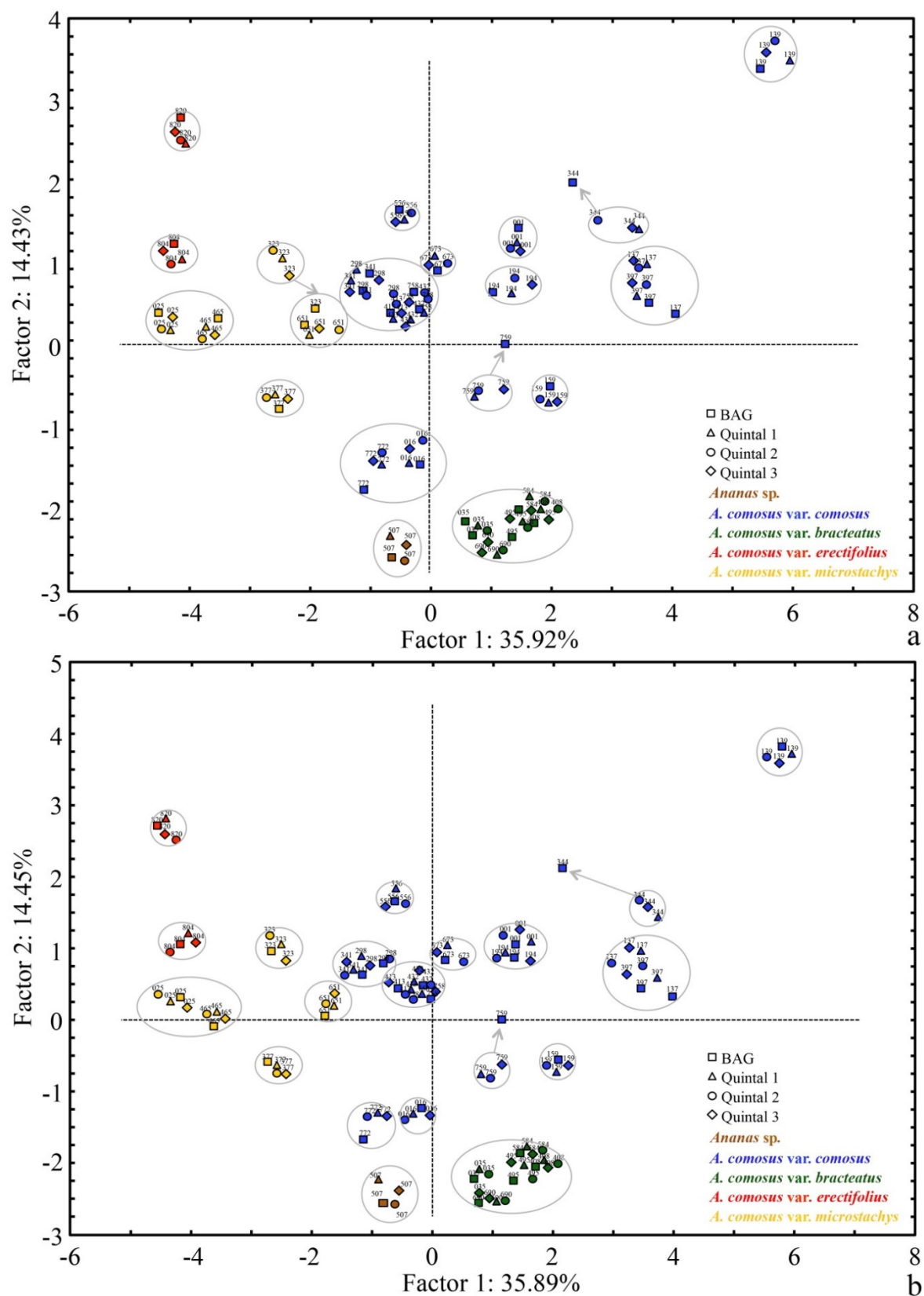


Fig. 3. Mixed principal component analysis of the quantitative and qualitative data of the accessions evaluated in the urban residential gardens and the facilities of the Pineapple Active Germplasm Bank. (a) Grouping of accessions characterized

in the first growing cycle. (b) Grouping of accessions characterized in the second growing cycle.

As can be seen in Fig. 3(a), the same accessions, whether from the AGB or residential gardens, formed groups, with only a few exceptions. In the case of accessions AGB-323, AGB-344 and AGB-759, the values of variables such as height and length of leaf 'D' varied between the gardens and AGB, indicating the responsibility of these aspects for the results obtained. For accession AGB-323, the plant height values were greater than in the AGB, while for the length of leaf 'D', the residential garden plants had larger mean values than the plants kept at the AGB facilities. For AGB-344, the plants in the gardens were taller than those in the AGB. In turn, for accession AGB-759, the mean heights of the plant and length of leaf 'D' were greater in the plants of the AGB

With respect to the second cycle of assessments, all of them formed groups in function of the botanical variety, except for accession AGB-507, which was not grouped in any of the varieties, because it is an *Ananas* sp. Accessions of *Ananas* sp. are difficult to classify taxonomically in the genus because they have traits that are common to *A. comosus* var. *ananassoides* and *A. comosus* var. *paraguayensis*, but without being classified in either of those varieties (Souza *et al.*,2012). In relation to the uniformity of the accessions, in the second cycle (Fig. 3(b)) only AGB-759 and AGB-344 (from the gardens) were distant regarding the length of leaf 'D'.

Discussion

The profile of the guardians is relevant for the successful implementation of any participatory conservation program like this one. Therefore, the application of the questionnaires to learn details of their profile was an important step. It revealed that the people involved had a good level of schooling, understood the importance of germplasm and its conservation, had the interest and skills necessary for proper care of the plants and had residences with the minimum necessary infrastructure.

Besides providing knowledge about the profile of the guardians, this initial evaluation was fundamental to plan additional strategies and direct the actions necessary for more efficient conservation, considering some aspects observed.

The project was implemented together with the homeowners, considering their opinion on the location of the accessions in the gardens, as well as how to plant them. Two meetings were held with the guardians in the implementation phase, as well as a visit by them to the facilities of the Pineapple AGB of Embrapa Cassava and Fruits (Fig. 4(a) and (b)), with the purpose of supplying them with the necessary information for good understanding and progress of the work.



Fig. 4. Actions to motivate the urban pineapple guardians. (a) Meeting with the curator, mediator and urban guardians to present the culture and its potential. (b) Technical visit of the guardians to the facilities of the Pineapple Active Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Fruits. (c) and (d) Event to test some accessions planted in the urban gardens. (e) and (f) Workshop on floral arrangements with ornamental pineapple varieties.

The developments of a project like this one can affect city's panorama with respect to quality of life and conservation of genetic resources that are important for the region's agrobiodiversity.

The morphological characterization carried out in the two cycles was mainly due to the need to see how the accessions were responding to the local edaphoclimatic conditions, including quantitative characteristics, since learning about these traits was one of the objectives of the program. This revealed that the accessions were homogeneous and stable compared with the accessions maintained at the AGB previously characterized by Souza *et al.* (2012).

The losses of plants or accessions were minimal (15 plants, three of which were replaced) and were generally due to the fact that some plants did not develop well. This may have occurred due to the response of an accession to changes in environmental conditions since in the field of Embrapa Cassava and Fruits the accessions are irrigated, fertilized and monitored by technicians with specific training for the culture.

The plants that died at the start of forming the gardens were replaced, which occurred with one lot (three plants) of accession AGB-25 in one of the gardens. One month after planting, these plants showed symptoms of Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus (PMWaV). In the case of accessions AGB-465 (2), AGB-584 (2) and AGB-820 (2), the plants showed symptoms of the virus during the flowering and fruiting period. The fruits did not develop adequately and the plants died at the end of the cycle. However, the monthly visit by the evaluator to the gardens enabled detection and replacement of the three plants of this accession with healthy ones, which also prevented the dissemination of the virus to the other accessions. In turn, the plants of accessions AGB-159 (3) and AGB-344 (3), in different gardens, were lost after flowering because, despite the guidance and monitoring, the guardians did not care for the plants properly during the cycle.

Of the 30 gardens planted, only three no longer existed at the end of the second cycle, after the conclusion of the evaluations, because the guardians decided to remodel their homes, involving the construction of walls or paving of backyards, making it impossible to maintain the accessions. In a strategy of this nature, risks exist that cannot be ignored, such as the death of homeowners, sale

or remodeling of the house, losses of some or even all the accessions in a given garden caused by inadequate care, pests or diseases, among other causes.

In this work, the losses of plants of some accessions were minimal and were overcome by the experimental design used or by replacement of dead plants. The experimental design, whereby each accession was distributed in three different gardens, prevented total loss of any one accession. Likewise, the regular monitoring by the technicians and curator allowed early identification of problems and their solution, considering the implementation of a permanent model. Some aspects are crucial, both to minimize the risks of losing accessions and laxity by the guardians, who need to be consistently committed to the program. In this respect, the long growing cycle of pineapple plants can be considered a negative feature. The development of a model for this conservation strategy should involve the government, which can act as a partner in the initiative by creating incentives for citizens to preserve biodiversity, to strengthen and maintain this practice with native plants and crops important to the region. In this pilot project, we formed working arrangements with the Municipal Secretariat of Agriculture and a farmer association, which were very important to promote the awareness and motivation of the guardians.

Some specific actions were taken to solidify the commitment and motivation of the guardians, such as workshops to demonstrate floral arrangements with ornamental pineapple plants (Fig. 4(e) and (f)), a pineapple tasting party, with appetizers made from local varieties (landraces) belonging to the collection of Embrapa, and distribution of seedlings of these varieties for larger-scale planting (Fig. 4(c) and (d)). Those strategies were highly relevant because they allowed a good understanding of the potential uses of the conserved accessions. Ornamental use, for example, was a novelty among the guardians and is now being better exploited. We also sought to establish a range of accessions in the home gardens to enable the guardians to experience the different uses and obtain extra income from their efforts. The city has a street market that attracts buyers and sellers from the region, giving the guardians a chance to sell products, including ornamental potted plants, fresh and processed fruits and handicrafts. Besides this, the partnership with the municipal government and local farmer associations, an ongoing step of the project, aims to supply seedlings in large

quantity to the guardians who want to become small producers, providing a chance to earn extra income over the long run.

The results obtained allow concluding that a model for conservation in partnership with urban residents is workable, although certain adjustments will always need to be made. Two aspects that should be considered are the regular monitoring by the curator and the establishment of partnerships with local officials and associations. Therefore, work is now being done to identify new guardians and introduce new accessions, to continue and expand the program with new conservation cells. At the end of the project, a party was held with all the guardians, who received a certificate of recognition as 'Urban Pineapple Guardian' and a keepsake with the symbol of the project. In particular, most of the people involved in the project are motivated to expand cultivation of some accessions for commercial purposes, to increase household income. Finally, the success has attracted interest by other people in the community in the conservation of plant genetic resources, many of whom have expressed interest in joining the project.

Supplementary material

The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S1479262118000114>

Acknowledgements

The authors would like to thank the support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/ Embrapa) for the scholarships granted.

References

- Akinnifesi, FK, Sileshi, GW, Ajayi, OC, Akinnifesi, AI, Moura, EG, Linhares, JFP and Rodrigues, I (2010) Biodiversity of the urban homegardens of São Luís city, Northeastern Brazil. *Urban Ecosystems*13: 129–146. doi: 10.1007/s11252-009-0108-9.
- Alves, E and Marra, RA (2009) Persistente migração urbana-rural. *Revista de Política Agrícola*18: 5–18.

Bailey, A, Eyzaguirre, P and Maggioni, L (2009) Crop genetic resources in European home gardens. Proceedings of a workshop, 3-4 October 2007, Ljubliana, Slovenia. Bioversity International, Rome, Italy. Available at https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/1348.pdf. (accessed 20 March 2014).

Carvalho, PCL, Filho, WDSS, Ritzinger, R and Carvalho, JAB (2001) Conservation of germplasm of tropical fruits with the farmer's participation. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23: 730–734. doi: 10.1590/S0100-29452001000300058.

Chavent, M, Kuentz, V, Labenne, A, Liquet, B and Saracco, J (2017). *PCAmixdata: Multivariate Analysis of Mixed Data*. R package version 3.1.

ECPGR (2017) ECPGR Concept for on-Farm Conservation and Management of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Italy: European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010). Cidade de Cruz das Almas, Bahia. Available at <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=290980>. (accessed 20 ago 2017).

Matos, AP, Sanches, NF and Souza, LFS (2010) *Manual de Identificação de Pragas, Doenças E Deficiências Nutricionais na Cultura do Abacaxi*. Cruz das Almas: Embrapa.

Negri, V (2012a) Policies supportive of on-farm conservation and their impact on custodian farmers in Italy. In: Padulosi, S, Bergamini, N, Lawrence, T (eds) *On-farm Conservation of Neglected and Underutilized species: Status, Trends and Novel Approaches to cope with Climate Change*. Rome, Italy: Bioversity International, pp. 211–216.

Negri, V, Fasoula, D, Heinonen, M, Musayev, M, Spataro, G, Veteläinen, M and Vögel, R (2012b) European on-farm conservation activities: an update from six countries. In: Maxted, N, Dulloo, ME, Ford-Lloyd, BV, Frese, L, Iriondo, J, Carvalho, MAAP (eds) *Agrobiodiversity Conservation: Securing the Diversity of*

Crop Wild Relatives and Landraces. Oxfordshire, UK: CABI International, pp. 327–332.

RCS (2009) *Hawaii Backyard Conservation: Ideas for every homeowner*. Natural Resources Conservation Service, Second Edition, 2009. Available at http://www.opala.org/solid_waste/pdfs/Hawaii_Backyard_Conservation.pdf. (accessed 12 January 2014).

Reinhardt, DH, Souza, LFS, Matos, AP, Sanches, NF, Cabral, JRS, Cunha, GAP and Souza, JS (1998) *Recomendações técnicas para a cultura do abacaxi, em condições de sequeiro, na região de Coração de Maria, Bahia*. Cruz das Almas: Embrapa Cassava and Fruits.

Sena Neto, AR, Araujo, MA, Barboza, RMP, Fonseca, AS, Tonoli, GH, Souza, FVD, Mattoso, LHC and Marconcini, JM (2015) Comparative study of 12 pineapple leaf fiber varieties for use as mechanical reinforcement in polymer composites. *Industrial Crops and Products*64: 68–78. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.10.042.

Silva, RL, Ferreira, CF, Ledo, CAS, Souza, EH, Silva, PH, Carvalho, CMAP and Souza, FVD (2016) Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*127: 123–133. doi: 10.1007/s11240-016-1035-0.

Souza, CPF, Ferreira, CF, Souza, EH, Sena Neto, AR, Marconcini, JM, Ledo, CAS and Souza, FVD (2017) Genetic diversity and ISSR marker association with the quality of pineapple fiber for use in industry. *Industrial Crops and Products*104: 263–268. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.04.059.

Souza, EH, Souza, FVD, Costa, MAPC, Costa, DSJr, Santos-Serejo, JA, Amorim, EP and Ledo, CAS (2012) Genetic variation of the Ananas genus with ornamental potential. *Genetic Resources and Crop Evolution*59: 1357–1376. doi: 10.1007/s10722-011-9763-9.

Souza, FVD, Cabral, JRS, Souza, EH, Santos, OSN, Santos-Serejo, JA and Ferreira, FR (2007) Caracterização morfológica de abacaxizeiros ornamentais. *Magistra*19: 319–325.

Souza, FVD, Kaya, E, Jesus, VL, Souza, EH, Oliveira, AVB, Skogerboe, D, Matsumoto, T, Alves, AAC, Ledo, CAS and Jenderek, MM (2015) Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*124: 351–360. doi: 10.1007/s11240-015-0899-8.

USDA (1998) *Backyard Conservation: Bringing conservation from the countryside to your backyard*. https://conservationtools.org/library_items/522-Backyard-Conservation-Bringing-Conservation-From-the-Countryside-to-Your-Backyard. (accessed 12 January 2014).

Veteläinen, M, Negri, V and Maxted, N (2009) *European Landraces: On-Farm Conservation Management and use*. Rome, Italy: Bioversity International.