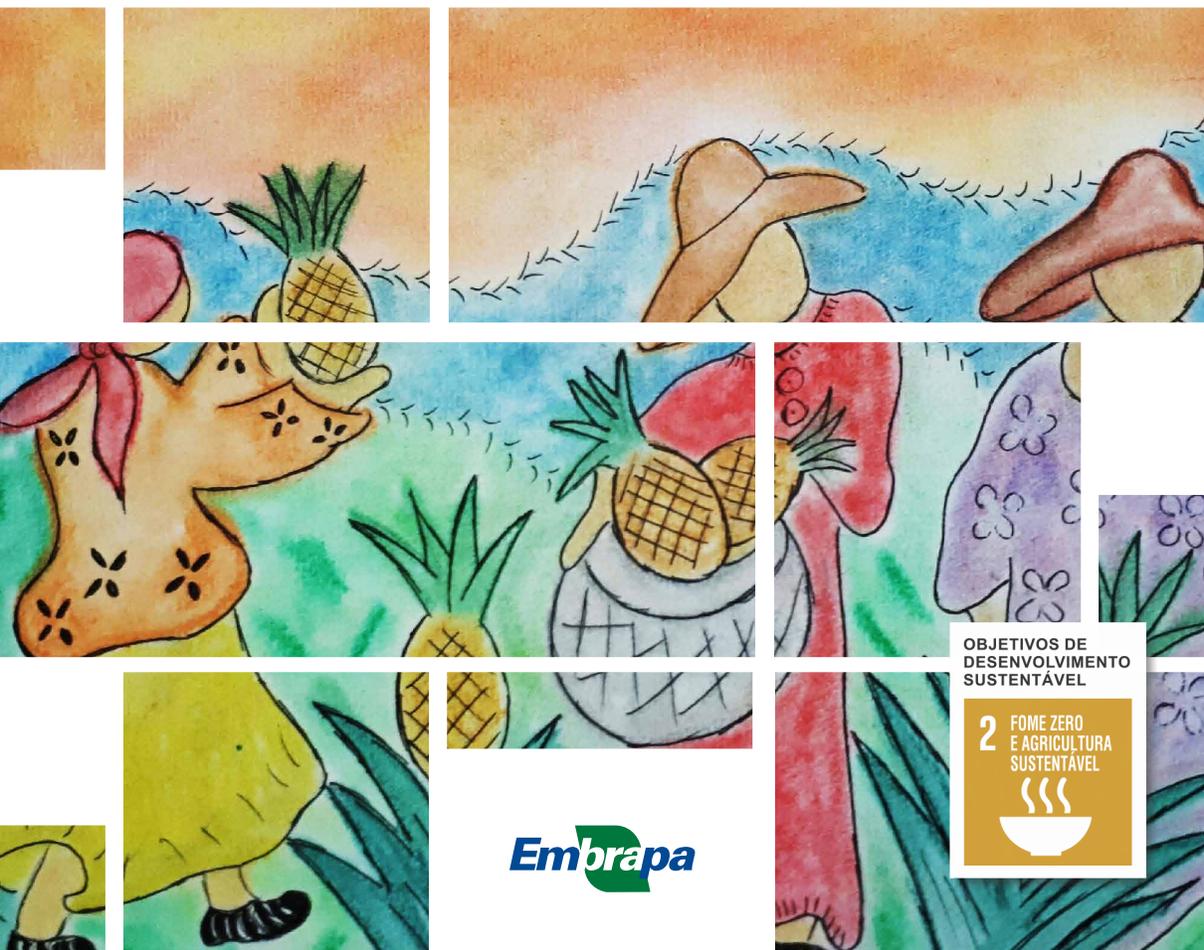


Manual de gestão do banco ativo de germoplasma de abacaxi



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 250

Manual de gestão do banco ativo de germoplasma de abacaxi

*Fernanda Vidigal Duarte Souza
Fabiana Ferraz Aud
Everton Hilo de Souza
Francisco Ricardo Ferreira
Gilmar Souza Santos
(Autores)*

***Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2021***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 07
44380-000, Cruz das Almas, Bahia
Fone: 75 3312-8048
Fax: 75 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Francisco Ferraz Laranjeira

Secretário-Executivo
Maria da Conceição Pereira da Silva

Membros
Ana Lúcia Borges, Áurea Fabiana Apolinário de Albuquerque Gerum, Cinara Fernanda Garcia Morales, Harllen Sandro Alves Silva, Herminio Souza Rocha, Jailson Lopes Cruz, José Eduardo Borges de Carvalho, Paulo Ernesto Meissner Filho, Tatiana Góes Junghans

Supervisão editorial
Francisco Ferraz Laranjeira

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Anapaula Rosário Lopes

Ilustração da capa
Fernanda Vidigal Duarte Souza

1ª edição
Publicação digital: PDF (2021)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Manual de gestão do banco ativo de germoplasma de abacaxi / Fernanda Vidigal Duarte Souza ... [et. al.]. Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2021.

57 p.: il. (Documentos / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-4996, 250)

1. Recurso genético 2. Fruticultura 3. Abacaxi I. Souza, Fernanda Vidigal Duarte. II. Aud, Fabiana Ferraz. III. Souza, Everton Hilo de. IV. Ferreira, Francisco Ricardo. V. Título. VI. Série.

CDD 581.15

Ficha catalográfica elaborada por por Sônia Maria Sobral Cordeiro CRB511/49 – Embrapa Mandioca e Fruticultura © Embrapa, 2021

Dedicatória

Dedicamos essa publicação aos pesquisadores que ao longo desses anos, em expedições por esse Brasil afora, coletaram os abacaxis que hoje formam esse valioso germoplasma.

Autores

Fernanda Vidigal Duarte Souza

Bióloga, doutora em Biologia Celular, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA

Fabiana Ferraz Aud

Bióloga, mestre em Ecologia, analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA

Everton Hilo de Souza

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Ciências, professor do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA

Francisco Ricardo Ferreira

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos, Brasília, DF

Gilmar Souza Santos

Economista, doutor em Engenharia de Produção, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA

Apresentação

O banco de abacaxi localizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura está entre os mais antigos da Empresa, tendo sido estabelecido em 1975 a partir de 39 acessos recebidos do Instituto Agronômico de Campinas. A ampliação dessa coleção começou a partir de 1979, quando a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a Embrapa Mandioca e Fruticultura iniciaram várias expedições de coleta em regiões prioritárias do Brasil e atividades de intercâmbio. Esse banco constituiu-se na maior coleção de germoplasma de abacaxi do mundo e atualmente conta com 764 acessos conservados, tanto em condições de campo, quanto em telado, com uma duplicata de segurança *in vitro*.

Durante muitos anos o público-alvo desse banco foi apenas o programa de melhoramento genético voltado para a alimentação. Entretanto, nos últimos 10 anos esse panorama mudou e, além dos programas de melhoramento, o banco de abacaxi vem se consolidando pela busca de novas funções no germoplasma conservado. Atributos ornamentais, fibras vegetais de qualidade, moléculas bioativas para uso em fármacos, estão entre as características identificadas na última década nesse Banco Ativo de Germoplasma, buscando novos usos e agregando valor aos genes conservados.

Esse manual aborda, além dos aspectos da gestão do banco de germoplasma de abacaxi, sua história, as atividades que o norteiam e os resultados obtidos até o presente momento, deixando evidente a importância do abacaxizeiro no panorama da fruticultura do país.

Alberto Duarte Vilarinhos

Chefe-geral da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Sumário

Introdução	11
Histórico, formação e Estado da Arte	11
Perda de acessos, novas abordagens e a necessidade de novas coletas	13
Infraestrutura do BAG	15
BAG em campo	15
BAG em telado	16
BAG in vitro	17
Acervo	17
Gestão do BAG	20
Equipe	22
Sistema de Gestão de Qualidade	23
Formação de Recursos Humanos e supervisão de colaboradores	25
Registros	26
Parcerias Nacionais e Internacionais	26
Cadastro no sistema SISGEN	27
Operacionalização do BAG abacaxi	28
Operacionalização do BAG abacaxi	28
Coleta de plantas	28
Coleta de solo rizosférico	29

Doações e intercâmbio de germoplasma.....	30
Recepção de amostras e plantio de acessos.....	30
Recepção em casa de vegetação.....	30
Recepção em laboratório de cultura de tecidos: conservação in vitro como duplicata de segurança.....	31
Indexação das plantas e limpeza clonal.....	34
Indexação das plantas	34
Limpeza clonal	38
Transferência de plantas sadias para compor a duplicata de segurança do BAG in vitro	39
Manutenção das plantas do BAG in vitro.....	39
Aclimatização das plantas de abacaxi in vitro para retorno ao campo	41
Preparo das bandejas de cultivo.....	42
Retirada e cultivo das plantas	42
Irrigação e acompanhamento da aclimatização.....	43
Duplicata de segurança dos acessos em condições de telado.....	43
Procedimento para o cultivo das plantas	44
Procedimentos fitotécnicos para a manutenção das plantas.....	45
Plantio, conservação e manutenção das plantas do BAG em campo e em telado.....	45
Caracterização de acessos de abacaxi.....	47
Saúde e segurança	53
Controle de acesso às dependências do BAG.....	54
BAG em campo (matriz).....	54
BAG em telado	55
BAG in vitro	55
Agradecimentos.....	55
Referências	55

Introdução

Histórico, formação e Estado da Arte

O abacaxi pertence à família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae. Com aproximadamente 79 gêneros e cerca de 3.692 espécies, esta é a maior família de distribuição natural restrita ao Novo Mundo, com exceção da *Pitcairnia feliciana* (Aug. Chev.) Harms & Mildbr, nativa da Guiné (Gouda et al., 2021).

A primeira coleção de germoplasma de abacaxi que se tem registro no Brasil foi do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que começou a reunir as primeiras variedades de abacaxi, em 1929, na Fazenda Santa Elisa, sob a responsabilidade do pesquisador Felisberto C. Camargo. De 1939 a 1961, esta coleção foi bastante enriquecida, com a introdução de novos exemplares oriundos de várias regiões do país. A partir de 1967 esta coleção passa a ser mantida na Estação Experimental de Limeira, sendo substancialmente ampliada, com a introdução de acessos coletados em excursões científicas realizadas à região amazônica e a diversos países das América do Sul e Central. Essas expedições possibilitaram a formação de uma coleção de germoplasma de abacaxi, constituída de 46 acessos de *Ananas comosus* var. *comosus*, dois de *Ananas* sp., cinco de *Ananas comosus* var. *ananassoides* e três de *Ananas comosus* var. *bracteatus*.

Em 1972, outra coleção começa a ser formada a partir dessa e de alguns acessos cedidos pelo Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A Embrapa Mandioca e Fruticultura, ao receber 39 acessos do Instituto Agrônomo de Campinas, dá início ao que viria a se constituir no maior Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi do mundo.

A ampliação dessa coleção começa a partir de 1979, quando a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a Embrapa Mandioca e Fruticultura iniciam várias expedições de coleta em regiões prioritárias do Brasil e começam a introduzir variedades de outros países, como França (Martinica), Bolívia, Colômbia, Guiana Inglesa e Austrália.

Assim, foram realizadas expedições de coleta nas margens do Rio Paraná (no Brasil e no Paraguai, antes da formação do lago de Itaipu) e nos Estados

de Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Pará (antes da formação do lago de Tucuruí).

Outras expedições, nos anos 1990 envolvendo uma cooperação internacional com o *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD), foram realizadas no Amapá, Pará, Acre, Mato Grosso, Amazonas/Rio Negro, Amazonas/Rio Solimões, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Guiana Francesa e possibilitaram a coleta de 326 acessos de diferentes variedades botânicas e procedências variadas.

Nessas expedições de coleta foi observada grande variabilidade genética, encontrando-se os mais variados tipos de abacaxi, desde variedades locais cultivadas pelos índios e pequenos agricultores, além de populações silvestres de abacaxi que ocorrem naturalmente em diversas regiões. A abundância de variabilidade obtida nessas coletas foi notável e permitiu a constatação de que os agricultores e índios da região amazônica têm tradição de cultivar mais de uma variedade em seus plantios.

A riqueza de formas e cores encontrada em abacaxis na Amazônia foi significativa, tanto no que se refere à planta, quanto ao fruto em si. Algumas variedades tinham nomes regionais interessantes, algumas vezes relacionados com o tamanho do fruto. O 'Maipuri' ou 'Cabeça de Anta', encontrado no Amapá e pertencente ao grupo Cayenne, chamou atenção pelo tamanho do fruto, que pode alcançar 8 kg. O 'Poti', também do mesmo grupo tem fruto grande, porém um pouco menor que o 'Maipuri'. Já o 'Gigante de Tarauacá' ou 'Arroba de Tarauacá', cultivado tradicionalmente no município de Tarauacá, no Acre, o fruto pode atingir 15 kg. O 'Ananás Branco' caracteriza-se por apresentar folhas e fruto de cor verde-claro e polpa branca, contudo a planta se assemelha bastante com a cultivar Smooth Cayenne. Foi encontrado um acesso do grupo Cayenne na Guiana Francesa, que produz cerca de 15 mudas tipo filhote e um a dois rebentões precoces e com tamanho adequado para plantio já na época da colheita.

Na expedição realizada às margens do Rio Solimões, no Estado do Amazonas, foram coletados materiais que apresentam características próximas aos das variedades comerciais. Algumas dessas variedades têm sabor excelente e não necessitaram de nenhum trabalho de seleção para

serem consumidas. Outra variedade, de folhas lisas e chamada de 'Tchaú' pelos índios Ticuna, ocorre com bastante frequência na região. Suas folhas têm coloração verde, poucas manchas de antocianina e produz frutos de tamanho médio a grande, cilíndricos, de polpa branca e de bom sabor. Também foi observada uma variedade, que segundo os agricultores da região, tem um sabor excelente, com alto teor de açúcar e baixa acidez, no estágio de desenvolvimento do fruto, considerado como imaturo. Vale também mencionar, que em uma comunidade da tribo Ticuna, um agricultor plantava 12 variedades de abacaxi. Nas imediações de Tefé no Estado do Amazonas, ocorre uma variedade de folha roxa, fruto arroxeadado e polpa de cor alaranjada e de excelente sabor, denominada de 'Roxo-de-Tefé'. Todas essas cultivares mencionadas e selecionadas por indígenas são da variedade botânica *Ananas comosus* var. *comosus*, onde se encontram a grande maioria dos abacaxis comestíveis.

Constatou-se na coleta do Rio Negro que o 'Curauá' (*Ananas comosus* var. *erectifolius*), usado no passado pelos índios da região para confecção de cordas, redes e linhas para pesca, está desaparecendo, pois com o advento do náilon, a tradição da utilização desta fibra está sendo perdida. Os habitantes das comunidades visitadas informaram que este abacaxi era muito utilizado pelos seus pais e avós, mas que, naquele momento da coleta, já não vinha sendo mais plantado.

Para a realização dessas coletas fez-se um levantamento de herbários regionais para a identificação das possíveis espécies a serem coletadas e prováveis áreas de ocorrência. Além dos dados catalogados nos herbários e na literatura existente, foram consideradas informações de pessoas e instituições das áreas das expedições que tinham conhecimento da ocorrência de abacaxi na região. Os deslocamentos foram dirigidos visando buscar a maior variabilidade genética possível nos mais diversos ambientes.

As coletas foram realizadas utilizando-se os meios de transporte adequados para atingir os locais onde se encontra abacaxi cultivado e silvestre. De maneira geral, os deslocamentos foram feitos de carro, barco, e quando necessário avião e helicóptero. Em algumas situações para se alcançar o local indicado para as coletas foi necessário improvisar. As coletas realizadas às margens dos rios Negro e Solimões foram feitas de barco, ainda

que algumas vezes foi necessário recorrer ao uso de lanchas pequenas e mais velozes.

Nestas coletas foram prospectados acessos silvestres na vegetação nativa com grande variação no tamanho do fruto em plantios tradicionais da região em comunidades de agricultores.

Também foram realizadas expedições de coleta nos estados do Nordeste e se constatou que a variabilidade encontrada na região foi restrita, não se tendo encontrado nenhuma espécie nativa do gênero *Ananas*, mas apenas variedades tradicionais cultivadas por populações locais.

Essas expedições de coleta foram realizadas por vários pesquisadores da Embrapa, o Dr. Francisco Ricardo Ferreira, o Dr. Renato dos Santos Cabral, o Dr. Luciano de Bem Bianchetti, dentre outros. Esse esforço de coleta e introdução de germoplasma possibilitaram a ampliação significativa da coleção da Embrapa Mandioca e Fruticultura que atualmente se constitui de aproximadamente 764 acessos e reúne uma enorme riqueza em formas e cores dos mais diversos abacaxis.

Perda de acessos, novas abordagens e a necessidade de novas coletas

Ao longo de pelo menos 20 anos, os acessos foram mantidos apenas em condições de campo, com o registro de perdas por causas variadas, que foram desde a não adaptação de alguns materiais por condições edafoclimáticas até a incidência do vírus da murcha do abacaxizeiro (*Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus – PMWaV*), que efetivamente causou graves danos ao germoplasma.

Em vista disso, em 2003 deu-se início ao estabelecimento de uma duplicata de segurança *in vitro*, com 10 cópias por acesso e de uma duplicata do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) em condições de telado, com uma ou duas plantas em vaso/acesso. Em paralelo foi realizado um trabalho com a finalidade de indexar as plantas do BAG para a presença do vírus da murcha e, por meio do cultivo de ápices caulinares *in vitro*, resgatar os acessos infectados pelo vírus.

Assim para minimizar as perdas ocorridas, novas coletas foram realizadas nos anos de 2016, 2017, 2018 e 2019 permitindo um enriquecimento do BAG em aproximadamente 122 acessos. Essas coletas mais recentes já levaram em consideração uma abordagem nova, que considera o microbioma associado às plantas de abacaxi em condições naturais de ocorrência.

Infraestrutura do BAG

BAG em campo

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi em campo está instalado na Embrapa Mandioca e Fruticultura em uma área localizada a 12°40' de latitude sul e 39°06' longitude oeste, no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (Figura 1A). O clima do município de Cruz das Almas, segundo classificação de Köppen, é uma transição entre as zonas Am e Aw, com precipitação pluviométrica média anual de 1.143 mm, temperatura média de 24,28 °C e umidade relativa de 60,47%. O solo da área experimental é um LATOSSOLO amarelo distrófico típico, A moderado, textura franco-argiloarenosa, caulinitico, hipoférrico, fase transição floresta tropical subperenifólia/subcaducifólia com declive de 0 a 3% (Souza et al., 2012).

Os acessos estão dispostos sequencialmente em fileiras simples no espaçamento de 1,0 m x 0,4 m em uma área total de 2.600 m² (Figura 1A). A identificação dos acessos é feita por piquetes brancos de ripões numerados com tinta óleo preta de forma sequencial. A manutenção e renovação dos acessos são realizadas frequentemente, a depender da frutificação e idade das plantas com capinas que são realizadas mensalmente. O sistema de irrigação é localizado por gotejamento e de forma complementar, com periodicidade de duas vezes por semana, principalmente, nos meses de setembro a março. A adubação é feita em função da análise de solo e realizada no período chuvoso. O manejo de pragas e doenças é feito sob monitoramento e quando necessário é realizado o controle, principalmente, para cochonilha. O rodízio da área do BAG abacaxi é realizado a cada 10 anos.



Figura 1. Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi) em campo (A); BAG abacaxi em telado (B) e BAG abacaxi *in vitro* (C).

BAG em telado

O BAG abacaxi em telado está mantido na mesma unidade da Empresa em condições de sombrite a 50% em uma área de 108 m² (Figura 1B). Os acessos estão plantados em vasos plásticos pretos de 7 litros com substrato comercial (uma ou duas plantas por vaso/acesso) e dispostos em 14 bancadas de cimento (2,1 m x 2,4 m), a 1,2 m do solo. O piso do telado está revestido com rafia preta (tela de solo em prolipileno), para evitar plantas daninhas. O sistema de irrigação é localizado por microaspersão e realizado de forma complementar com frequência diária. A manutenção e a renovação dos acessos são realizadas frequentemente, a depender da frutificação e idade das

plantas. A adubação é conduzida na renovação do substrato, assim como a limpeza dos vasos é feita a depender da necessidade, normalmente uma vez por mês. O manejo e controle de pragas são realizados sob monitoramento frequente e principalmente para formigas e cochonilhas.

BAG in vitro

A conservação de acessos do BAG abacaxi in vitro consiste na manutenção das plantas dos acessos em condições de crescimento lento no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura (LCT) (Figura 1C), preservando sua identidade genética e capacidade de regeneração por meio de subcultivos periódicos. Seis a 10 plantas são mantidas por acesso em sala de conservação de 10,5 m² a uma temperatura de 20 °C ± 1 °C, fotoperíodo de 12 horas e densidade de fluxo de fótons de 20 μmol m⁻² s⁻¹. Os acessos estão dispostos em tubos de ensaio (15 cm x 2,5 cm) com meio nutritivo composto por metade da concentração de sais e vitaminas da formulação MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com 3% (m/v) de sacarose e 2,4 g L⁻¹ do agente gelificante Phytigel® como solidificante (Silva et al., 2021). Os tubos estão dispostos em grades de ferro (18 cm x 12 cm) sobre prateleira de ferro e vidro (2,1 m x 0,6 m). Os subcultivos das plantas para o meio de conservação fresco ocorrem em câmara de fluxo laminar, em sala climatizada no mesmo laboratório. Vale destacar que o LCT conta ainda com sala de transferência de materiais, sala de reagentes em uso, sala de microscopia, sala de preparo de meios, sala de esterilização, sala de crescimento, sala de conservação com controle de temperatura a 18 °C e sala de convívio. A introdução no BAG in vitro se dá à medida que hajam plantas disponíveis do acesso a fim de não comprometer o número necessário de plantas em campo.

Acervo

O acervo do BAG abacaxi se constitui atualmente de 764 acessos conservados em campo, 680 conservados em telado e 300 conservados in vitro (40%) mantendo uma grande variabilidade genética do gênero (Figura 2). Destes, em campo e telado estão conservados 476 acessos de *Ananas comosus* var. *comosus*, 140 de *A. comosus* var. *ananassoides*, 39 de *A. comosus* var. *bracteatus*, 12 de *A. comosus* var. *erectifolius*, 16 de

A. comosus var. *paraguayensis*, 23 de *A. macrodontes*, 15 de *Ananas* sp. e 43 de outras bromeliaceae. No BAG in vitro estão dispostos: 177 de *Ananas comosus* var. *comosus*, 29 de *A. comosus* var. *ananassoides*, 24 de *A. comosus* var. *bracteatus*, cinco de *A. comosus* var. *erectifolius*, seis de *A. comosus* var. *paraguayensis*, seis de *Ananas* sp. e quatro de outras bromeliaceae. Esses acessos incluem ainda variedades tradicionais coletadas no Brasil, cultivares comerciais e amostras de populações de espécies silvestres. Todos os acessos estão cadastrados no Portal Alelo (<https://www.embrapa.br/alelo>) e duas coleções temáticas, sendo uma de ornamentais e outra de fibras.

Após a aquisição dos acessos, seja por doação, intercâmbio ou coleta, cada acesso recebe um código precedido das iniciais BGA (Banco de Germoplasma de Abacaxi) e um número sequencial em relação ao último acesso cadastrado. As plantas provenientes de expedições de coleta, onde se considera também solo rizosférico, atendem a um procedimento operacional padrão (POP) de separação e identificação que estão detalhados nos POPs: coleta de germoplasma de abacaxizeiros em populações naturais ou áreas de cultivo tradicional com variedades locais (014.2.4.02.3.010) e recepção de amostras e plantio de abacaxizeiros após coleta, doação ou intercâmbio de germoplasma (014.2.4.02.3.011).

O Brasil é o principal centro de diversidade do gênero e esse germoplasma constitui-se em um reservatório de genes de inestimável valor para o desenvolvimento de novas cultivares de abacaxi. A Embrapa Mandioca e Fruticultura, em parceria com outras instituições de pesquisa e de extensão rural, vem desenvolvendo, desde 1979, um amplo programa de melhoramento genético e de coleta de acessos em várias regiões do Brasil. Até o momento foram realizadas inúmeras expedições de coleta, abrangendo todos os estados do Brasil e países vizinhos como Venezuela, Guiana, Guiana Francesa entre outros. O Brasil é um país que ainda dispõe de populações extensivas de germoplasma silvestre em condições naturais, principalmente na Amazônia e no Cerrado.

A Embrapa vem utilizando esses acessos no desenvolvimento de um programa de pré-melhoramento, com o objetivo de incorporar seus genes em linhagens/cultivares elites, que serão usadas na ampliação da base genética das populações do melhoramento do abacaxi, visando à obtenção de cultivares de alta produtividade e outras características agrônômicas de

interesse. Outros programas de melhoramento genético estão atrelados a essa coleção, a exemplo da geração de cultivares para fins ornamentais, para produção de fibras e enzimas e metabólitos secundários. Os programas de melhoramento genético têm grande interesse no uso desse germoplasma para ampliação da base genética e ou uso de novos alelos tolerantes aos estresses bióticos e abióticos no desenvolvimento das novas cultivares comerciais de abacaxi.



Fotos: Everton Hilo de Souza

Figura 2. Variabilidade genética dos abacaxis conservados em condições de campo do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi), revelando a riqueza de cores e formas existentes no germoplasma. *Ananas comosus* var. *comosus* (A-C), *Ananas comosus* var. *ananassoides* (D-E), *Ananas comosus* var. *bracteatus* (F-H), *Ananas comosus* var. *erectifolius* (I), *Ananas comosus* var. *parguazensis* (J) e *Ananas macrodontes* (K-L).

Gestão do BAG

O BAG abacaxi é um dos bancos integrantes do projeto “Implementação e Monitoramento de Sistemas da Qualidade na Vertente Vegetal (Qualiveg) e vem adotando na sua gestão padrões de qualidade baseados em Normas Internacionais, (ABNT ISO/IEC 17025, ABNT NBR ISO 17034:2017 e Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos) que preconizam a inclusão de procedimentos operacionais padrão e controles de registros para todas as atividades que são realizadas no âmbito da conservação, permitindo uma gestão mais eficiente e a rastreabilidade de seus processos. A gestão do BAG é realizada pelo curador, que coordena todas as atividades, realiza intercâmbios, coletas e busca parcerias. A gestão está subordinada ao sistema de curadoria da Embrapa e, em nível de Unidade, à pasta de Pesquisa e Desenvolvimento, conforme Figura 3.

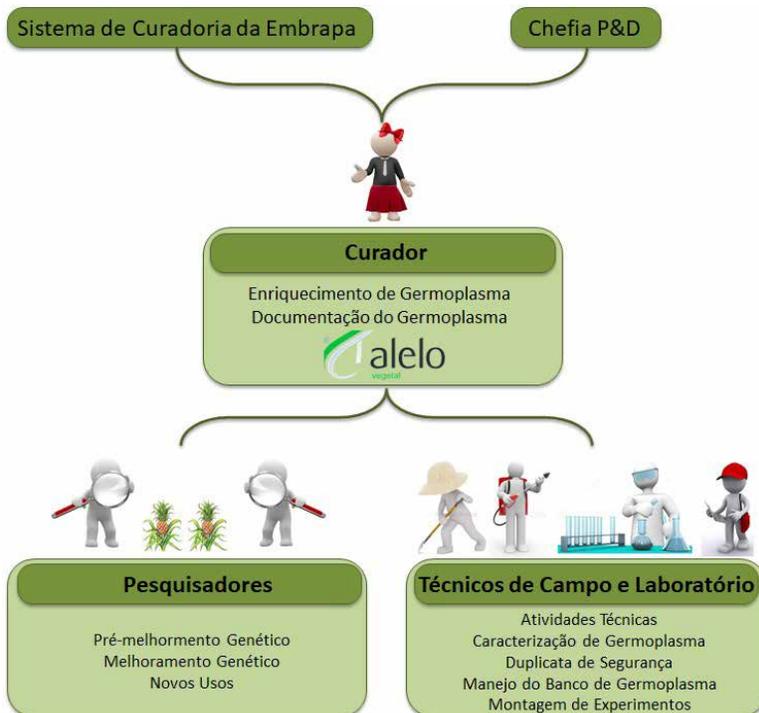


Figura 3. Sistema de gestão do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

As atividades de rotina são: a) enriquecimento do acervo, realizado por meio de coleta e intercâmbio com outras instituições de pesquisa do Brasil; b) indexação para identificação de acessos infectados pelo vírus PMWaV; c) limpeza dos acessos infectados por meio do cultivo de ápices caulinares e introdução no BAG in vitro e replantio no campo; d) a documentação (registro) é realizada por meio do Portal Alelo – todos os dados de passaporte e manejo dos acessos são inseridos no Alelo, que é a plataforma de gerenciamento dos dados de germoplasma da Embrapa; e) atividades de caracterização implicam diferentes abordagens, desde a morfológica, molecular, fitoquímica, dentre outras e estão diretamente ligadas às linhas de pesquisa realizadas no BAG, a seguir: melhoramento para novas variedades voltadas para mesa e processamento; abacaxis ornamentais; bioativos voltados para a indústria de fármacos e/ou indústria alimentar; fibras vegetais para reforço em matrizes biodegradáveis; microbioma associado e implicações na promoção de crescimento e resistência às principais doenças da cultura; f) desenvolvimento de produtos é uma consequência das atividades de caracterização e, em alguns casos do pré-melhoramento e do melhoramento. Na Figura 4 está o fluxograma de funcionamento do BAG abacaxi.



Figura 4. Representação gráfica das atividades de funcionamento do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi) na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Equipe

A equipe mínima para não comprometer o germoplasma deve ser de seis colaboradores, com competências e habilidades específicas. Todos os membros da equipe têm conhecimento sobre a cultura e capacitação em gestão da qualidade como requisito importante para a conservação do germoplasma de abacaxi.

Na Figura 5 está apresentada a matriz de competência do BAG abacaxi, considerando os conhecimentos e as habilidades necessárias para operar cada uma das funções estabelecidas, tanto para o BAG, quanto para as duplicatas de segurança. O sistema da qualidade perpassa todas as atividades realizadas.

Uma matriz mais detalhada, que indica procedimentos, instruções e atividades para as quais os empregados e colaboradores do BAG estão aptos e foram designados, encontra-se disponível no Setor de Gestão de Pessoas da Unidade e em pasta do Núcleo de Desenvolvimento Institucional sob o registro de nº SGP0001.

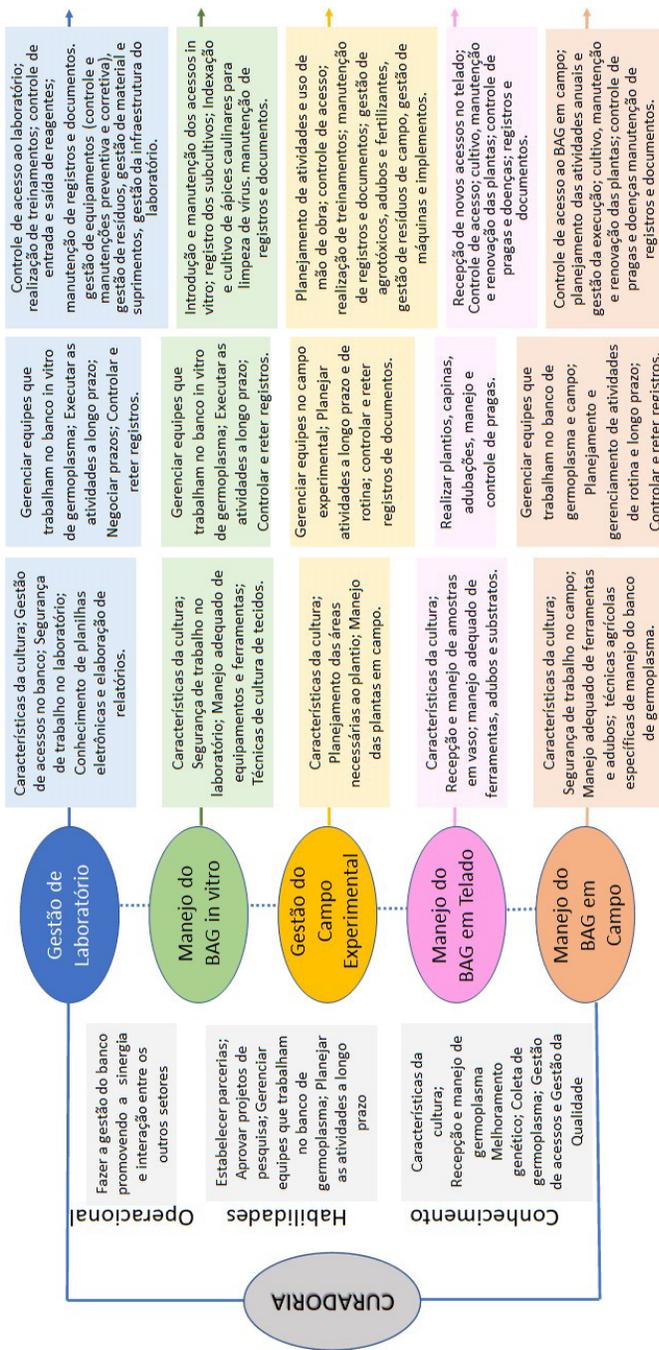


Figura 5. Matriz de competência para o funcionamento do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Sistema de Gestão da Qualidade

A Embrapa Mandioca e Fruticultura iniciou a implantação de Sistemas de Gestão da Qualidade em 2004 quando entrou no Projeto Qualilab, do Senai/Cetind da Bahia, com a participação de dois laboratórios (Laboratório de Nematologia e Microbiologia do Solo e Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas) visando à implantação da ABNT NBR ISO/IEC 17025 (Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração). Desde as primeiras iniciativas de implantação do Sistema de Gestão da Qualidade até os dias atuais, muitas ações foram desenvolvidas, as quais podemos destacar: treinamentos/capacitações em várias normas de Gestão da Qualidade, sensibilizações, implantação dos sentidos da qualidade, reforma e construção de instalações, aquisição e calibração de equipamentos, elaboração de procedimentos operacionais padrão, formação de auditores internos e realização de auditorias internas.

A coordenação do Sistema Embrapa de Qualidade na unidade Mandioca e Fruticultura é de responsabilidade da Unidade de Gestão da Qualidade (UGQ), cuja execução do processo cabe ao Núcleo de Desenvolvimento Institucional (NDI). No período de 2016 a 2019, fase de implementação dos requisitos do Qualiveg, ocorreram capacitações na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 para o NDI e SGL (Setor de Gestão de Laboratórios) e também foram realizadas auditorias internas, para a verificação da conformidade do BAG abacaxi com relação aos requisitos implementados. As auditorias foram conduzidas conforme a norma ABNT NBR ISO 19011 (Diretrizes para auditoria de sistemas de gestão da qualidade e/ou ambiental).

A estrutura do sistema de gestão da qualidade da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi incorporada ao sistema de gestão do BAG abacaxi. Os procedimentos referentes às atividades gerenciais/administrativas definidos pela UGQ foram adotados ou adaptados para atender às necessidades do BAG, como: controle de documentos, controle de registros, controle de equipamentos, aquisição de serviços e suprimentos, treinamento e supervisão de pessoal, sendo alguns desses processos detalhados a seguir.

Formação de Recursos Humanos e supervisão de colaboradores

As atividades de pesquisa em andamento no BAG abacaxi têm um forte envolvimento com Universidades Estaduais e Federais com a orientação de estudantes de iniciação científica, mestrado e doutorado, que se tornam durante esses trabalhos, colaboradores do BAG. Já foram geradas dissertações, teses e trabalhos de conclusão de curso (TCC) envolvendo acessos do BAG, seja com a abordagem de conservação ou prospecção de novos produtos.

Além dessa atividade de formação de recursos humanos, o Laboratório de Cultura de Tecidos tem como rotina o treinamento de todos os estudantes que ingressam para realizar atividades no seu recinto. A existência de um Plano Anual de Treinamentos garante a rotina e obrigatoriedade desse procedimento. Dentre os treinamentos contidos no Plano Anual de Treinamentos podemos destacar o treinamento sobre boas práticas laboratoriais, operação de equipamentos críticos, uso de reagentes e descarte de resíduos, uso de atas e formulários de laboratório, requisitos corporativos da Qualidade em bancos de germoplasma e plano de saúde e segurança. Os treinamentos são oferecidos duas vezes ao ano e o mesmo treinamento é realizado em turnos diferentes para poder contemplar todos os colaboradores que frequentam o laboratório.

A supervisão desses colaboradores, sejam estagiários ou bolsistas de pós-graduação, é feita mediante o controle presencial e das atas de laboratório, assim como a geração de dados brutos, periodicamente revisada. Essa supervisão é realizada tanto pela analista responsável do laboratório, como pelos pesquisadores envolvidos nos trabalhos em andamento e pela própria curadoria do BAG.

Adicionalmente, edições anuais do curso de Micropropagação de Plantas e do curso de Criopreservação de Plantas são realizadas no mesmo Laboratório. Ambos os cursos são importantes para a difusão de duas técnicas fundamentais para o manuseio do germoplasma: a produção de mudas sadias e estratégias eficientes de conservação de germoplasma, caso da criopreservação.

Registros

Considerando que são necessários vários tipos de registros para as atividades relacionadas à conservação de bancos de germoplasma formulários específicos são utilizados e atendem, tanto às atividades de campo, como as de laboratório. Dentre esses registros podem ser destacados os que são obtidos desde os procedimentos de coleta (registro de dados de passaporte), os que são realizados nas atividades de acompanhamento do BAG em campo e telado (registro de tratos culturais, adubações, plantios, etc.) até os que se referem às atividades realizadas no BAG in vitro (registro de preparo de soluções e meios de cultura, subcultivos de acessos, controles de temperatura, uso e manutenções de equipamentos críticos). Os formulários desses registros estão controlados na lista mestra de documentos e registros da UGQ da Unidade.

Além dos registros feitos em formulários próprios para cada atividade existem os registros de atividades em atas de campo ou laboratório. Cada colaborador é responsável pelo preenchimento de suas atividades com os acessos do banco em atas individuais. O preenchimento dessas atas segue orientações abordadas no treinamento conforme Plano Anual (item 1.8). As atas são supervisionadas pelos orientadores e preenchidas a caneta, além de conter informações completas das atividades de rotina e pesquisa relacionadas ao uso dos acessos do banco.

Parcerias Nacionais e Internacionais

As atividades, tanto de conservação, quanto de pesquisa em andamento no BAG abacaxi são realizadas em parceria com várias Instituições de Ensino e Pesquisa, tanto em nível nacional, quanto em nível internacional. Nas etapas de validação estão sendo realizadas parcerias com a iniciativa privada, como no caso dos abacaxis ornamentais ou dos produtos oriundos dos estudos com a fibra do abacaxi. No âmbito internacional, as colaborações se concentram nas atividades de conservação, principalmente na criopreservação do germoplasma de abacaxi. Diversas instituições estão envolvidas nas diferentes ações do BAG abacaxi, conforme Figura 6.



Figura 6. Instituições nacionais e internacionais envolvidas nas diferentes ações do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Cadastro no sistema SISGEN

Todas as atividades do BAG abacaxi se encontram devidamente registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), de acordo com a Lei da Biodiversidade nº 12.123, em vigor desde 17 de novembro de 2015. As atividades de pesquisa em andamento estão contempladas nos seguintes cadastros:

- a) Avaliação de abacaxizeiro ornamental (A76D50C).
- b) Caracterização, prospecção e conservação de germoplasma do gênero *Ananas* (ABE2250).
- c) Estudos voltados para fitossanidade do gênero *Ananas* (AF0BB50).
- d) Sistemas de produção e manejo fitotécnico para *Ananas* sp. (A88ABD5).
- e) Conservação, manejo e melhoramento genético para o gênero *Ananas* (A5BEE64). Este cadastro se refere ao passivo gerado durante a medida provisória, em vigência de 2000 a 2015.

Operacionalização do BAG abacaxi

Obtenção dos acessos: coleta, intercâmbio e doação de germoplasma

Coleta de plantas (POP: 014.2.4.02.3.010)

Para a coleta de acessos de abacaxizeiro, o coletor deve estar munido de documentação pertinente às leis vigentes (Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014) para espécies nativas. Uma das primeiras ações para a coleta é a definição, com precisão, das áreas que deverão ser exploradas. Uma fonte para possíveis áreas de ocorrência do gênero *Ananas* são os herbários ou dados de coletas anteriores.

Após a definição da área e a identificação da população a ser amostrada, deve-se percorrer toda a área e com base no tamanho, observar, principalmente, a variabilidade fenotípica existente entre as plantas. É muito importante que seja feito o georreferenciamento da área de coleta com o uso do GPS (latitude, longitude e altitude). Preencher os dados de passaporte na caderneta de campo e todas as características relacionadas à área (tipo de vegetação, bioma, tamanho da população, dados fenológicos das plantas, entre outras características). É importante fotografar toda a população e o ambiente ao entorno antes da coleta (identificar o número das fotos na caderneta de campo).

A coleta do material de interesse deve considerar uma amostragem mínima de 11 plantas, com preferência para os rebentões. Outras formas também podem ser coletadas e deve-se seguir essa ordem de prioridade dos tipos de muda: rebentos, filhotes, planta adulta em forma de talo ou coroa. A amostragem deve ser aleatória ou em zigue-zague (evitando plantas muito próximas) e de forma representativa dentro da população. As amostras deverão receber uma identificação em placas e uma de segurança nas folhas com marcador permanente conforme o número sequencial da caderneta de campo. Cada planta (repetição) do mesmo acesso recebe também uma letra sequencial, caso sejam oriundas da mesma população (Ex.: BGA-001a BGA-001b), identificando assim, o genótipo dentro do acesso, pois se tratando de uma

população natural as plantas manterão sua provável variabilidade genética. As amostras identificadas devem ser depositadas em caixas plásticas (tipo verdura) ou caixa de papelão reforçada, de forma organizada, de modo a evitar a perda das placas identificadoras. Deve-se evitar colocar as plantas em ambientes totalmente fechados, as caixas devem ter furos para entrada de ar. Plantas adultas ou rebentões grandes devem ser reduzidos com o corte de todas as folhas e raízes, deixando o talo com aproximadamente 15 cm a 20 cm de comprimento.

Deve ser realizado um monitoramento de pragas e doenças nas casas de vegetação que receberem as novas coletas, para garantir a qualidade do material genético.

Coleta de solo rizosférico

Um dos procedimentos de coleta para o Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi é a coleta do solo rizosférico, que se entende como as amostras de solo coletadas na camada de 0-20 cm no entorno de cada planta, considerando como área limítrofe a zona de projeção das folhas. Para a coleta do solo do rizoplano, deve ser realizada uma amostragem composta de raízes de cada uma das plantas coletadas, que passará posteriormente por um processo de homogeneização, a fim de se obter um sedimento resultante definido como solo do rizoplano, utilizado futuramente para isolamento de microrganismos. As amostras de solo deverão receber a mesma numeração de coleta das plantas associadas, armazenadas em caixas de isopor em sacos plásticos e enviadas à Embrapa Mandioca e Fruticultura. O código da amostra deve seguir o seguinte critério MI (Microbioma): BGA (Banco de Germoplasma de Abacaxi) e o número que se segue ao acesso no BAG (Ex.: MI-BGA 002).

Para as avaliações necessárias, as amostras de solo rizosférico devem ser divididas em subamostras de 300 g cada, destinadas às análises químicas e físicas das propriedades do solo, isolamento de microbiota funcional e análises moleculares, em laboratórios específicos para cada finalidade. As amostras destinadas às análises moleculares devem ser armazenadas adequadamente em baixa temperatura em ultracongelador (-80 °C), ou em congelador (-18 °C) quando houver indisponibilidade do primeiro.

Doações e intercâmbio de germoplasma

O intercâmbio de germoplasma deve seguir as normas do SISGEN e da Embrapa, que atendem a Lei da Biodiversidade nº 13.123, de 20 de maio de 2015, no que tange à documentação necessária em caso de envio de material. As doações podem ser presenciais ou por envio de transportadora. A entrada dos novos acessos no BAG deve seguir todos os cuidados já abordados no procedimento de coleta.

Recepção de amostras e plantio dos acessos

Após coleta, pelo menos 10 plantas de cada acesso deverão ser encaminhadas para a casa de vegetação ou telado e uma planta deverá ser encaminhada para o laboratório de cultura de tecidos vegetais para a introdução no BAG in vitro, como cópia de segurança.

Recepção em casa de vegetação

A recepção deve ser realizada em casa de vegetação com luminosidade de 50% ou em condição de telado com malha de 70%. As amostras devem receber nova identificação com número sequencial, fornecido pelo curador, considerando os acessos já introduzidos no banco. Esse mesmo código do acesso será mantido para o campo e todas as duplicatas de segurança: telado e in vitro. Cada planta (repetição) do mesmo acesso, em caso de coleta, receberá também uma letra sequencial, caso sejam oriundas da mesma população (Ex.: BGA-001a BGA-001b). Essa identificação das repetições dentro do mesmo acesso é importante, pois se tratando de uma população natural, as plantas manterão sua variabilidade genética e o acesso não será necessariamente um clone.

As plantas que podem estar em forma de talos, rebentos, filhotes e/ou coroas deverão ser plantadas em vasos plásticos de 15 a 30 cm de diâmetro, a depender do tamanho. Deve ser utilizado substrato comercial com propriedades que garantam boa drenagem e aeração. Os vasos devem ser mantidos em bancadas com irrigação frequente, que pode ser realizada por um funcionário designado com um cronograma de regas ou pode ser realizada por um sistema automático. O controle de pragas e doenças é imprescindível nessa etapa para garantir a qualidade do material genético que vai ao campo.

O procedimento de indexação para o complexo viral PMWaV (POP: 014.2.4.02.3.002), pode ser realizado no momento do estabelecimento dos acessos, se houver folhas novas nas plantas ou poderá ser feito posteriormente quando emergirem as primeiras folhas. Se o acesso for diagnosticado como livre de vírus será necessário garantir o isolamento das bancadas com relação à ocorrência de formigas e cochonilhas. Se não houver um telado antiáfideo, as bancadas podem ser protegidas por meio da aplicação de graxa automotiva na base dos pés da mesa com uma frequência quinzenal.

Recepção em laboratório de cultura de tecidos: conservação in vitro como duplicata de segurança (POP: 014.2.4.02.3.004)

A introdução da duplicata de segurança no Banco Ativo de Germoplasma in vitro é um procedimento sequencial com três etapas principais, sendo elas: estabelecimento de gemas in vitro e desenvolvimento de plantas; indexação das plantas e limpeza clonal, quando necessária; transferência de seis plantas saudáveis para sala de conservação, em condições de crescimento mínimo, para compor a duplicata do acesso no BAG in vitro. A Figura 7 resume a sequência de etapas que são realizadas, tanto para a introdução, quanto para a limpeza clonal em caso de acessos contaminados.

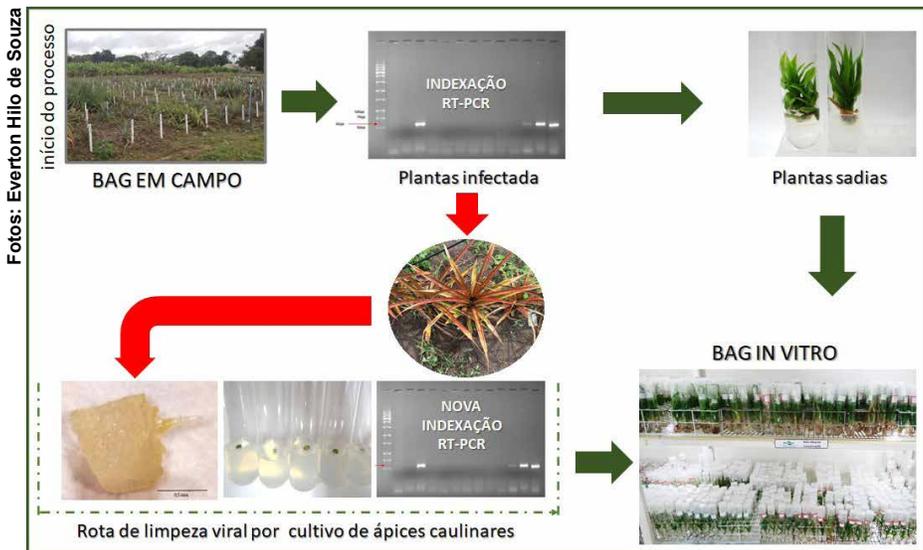


Figura 7. Rotina de atividades para a indexação, estabelecimento e limpeza clonal de acessos infectados do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi).

Estabelecimento de gemas *in vitro* e desenvolvimento de plantas (POP: 014.2.4.02.3.004)

Para o estabelecimento de gemas deve-se retirar uma planta de um acesso do solo, no BAG do campo ou telado. Cortar cerca de 80% do comprimento das folhas (Figura 8A). Remover as raízes visíveis e lavar a planta abundantemente em água corrente.

No laboratório deve-se excisar as folhas cuidadosamente, para expor o talo com as gemas, realizar cortes com bisturi para extrair as gemas do talo (Figura 8B), mantendo-as sobre uma fina lâmina de água deionizada em frascos previamente esterilizados. Transferir os frascos com gemas para câmara de fluxo laminar para o procedimento de desinfestação. Para desinfestação das gemas, tratá-las com solução de álcool 70% (v/v) por 5 minutos, hipoclorito de sódio na concentração aproximada de 1,25% (m/v) por 30 minutos, seguido por três lavagens com água deionizada estéril.

Após desinfestação remover, com auxílio de pinça e bisturi estéreis, o tecido circundante não organogênico, limpando cada gema individualmente (Figura 8C). Transferir a gema para meio de estabelecimento (MS sem reguladores vegetais) em tubo de ensaio na mesma orientação em que ela se encontra na planta *in vivo* (Figura 8D). Fechar o tubo com filme plástico e incubar em câmara de crescimento a 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16h e densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 45 dias (Souza et al., 2013). O controle de qualidade da etapa de estabelecimento de gemas se realiza por meio do registro da porcentagem de gemas contaminadas. O valor da porcentagem é um indicador do sucesso da etapa de desinfestação, sendo valores inferiores a 10% considerados adequados.

As gemas intumescidas, 45 dias após o estabelecimento, devem ser transferidas para meio de multiplicação (MS suplementado com $0,025 \text{ mg L}^{-2}$ de ácido nafatalenoacético e $0,5 \text{ mg L}^{-2}$ de benzilaminopurina) em câmara de fluxo laminar, subcultivadas periodicamente em intervalos de 45 dias e incubadas em câmara de crescimento a 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16h e densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 8E). Nos subcultivos as plantas desenvolvidas devem ser transportadas para a câmara de fluxo laminar, onde será realizada a remoção das porções oxidadas dos explantes em condições

assépticas. Plantas formadas devem ser seccionadas longitudinalmente e transferidas para meio de multiplicação fresco (Figura 8F).

Após a primeira transferência, sucessivos subcultivos devem ser realizados para atingir o número mínimo de 50 plantas, das quais 10 são separadas para limpeza clonal, em caso de acesso infectados, assim como, em caso de acessos saudáveis, são separadas 10 plantas para sua introdução no Banco de Germoplasma in vitro (Figura 8G). As demais plantas são mantidas para uso em ensaios experimentais.

Fotos: Everton Hilo de Souza

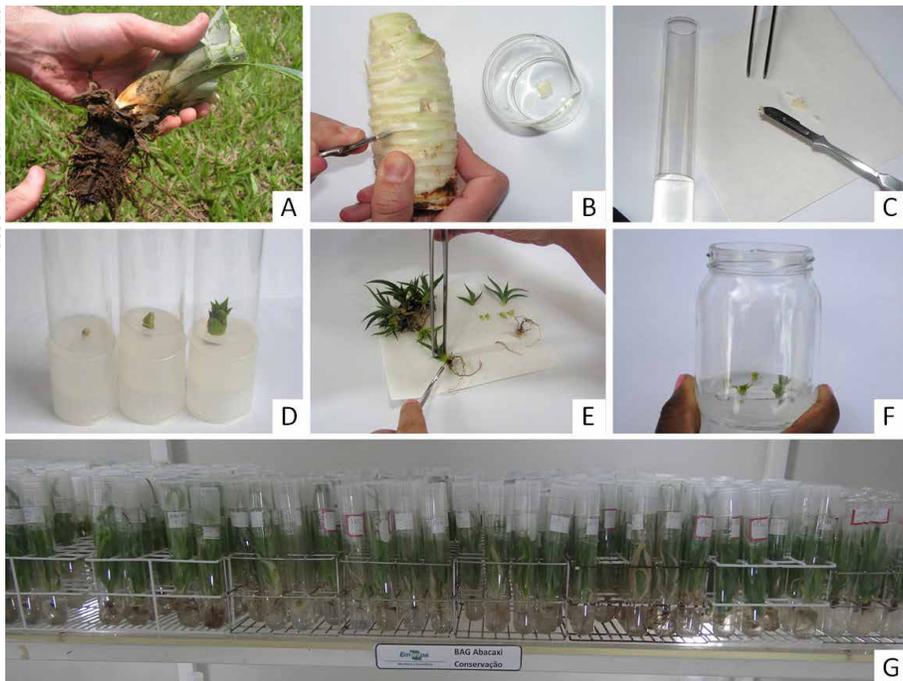


Figura 8. Sequência para o estabelecimento de plantas para compor o Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi in vitro. Planta retirada do solo com redução das folhas (A); Extração das gemas do talo (B); Redução e limpeza de cada gema individualmente (C); Estabelecimento das gemas em tubo de ensaio com meio de estabelecimento (D); Redução das folhas e limpeza das plantas para um meio de multiplicação fresco após 45 dias de estabelecimento (E); Plantas seccionadas longitudinalmente e transferidas para meio de multiplicação fresco (F) e Banco Ativo de Germoplasma in vitro conservado em tubos de ensaios (G).

Indexação das plantas e limpeza clonal

Indexação das plantas (POP 014.2.4.02.3.002)

A infecção causada pelo vírus associado à murcha do abacaxi (*Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* – PMWaV), transmitido pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes*, constitui-se em um dos maiores problemas para a cultura do abacaxizeiro e tem se mostrado igualmente importante para o Banco Ativo de Germoplasma. A planta infectada geralmente tem menor porte, apresenta folhas avermelhadas com pontas secas, poucas raízes, perda de turgescência dos tecidos foliares e partes suculentas do abacaxizeiro (Guerra et al., 2020). A planta definha progressivamente, muitas vezes, até a morte. Dessa forma, a indexação das plantas é um dos passos fundamentais para a identificação do vírus e a necessidade de limpeza clonal, em caso de acesso infectado. A indexação envolve o diagnóstico em relação aos três tipos virais associados à murcha, a saber, PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3.

A indexação consiste em extrair o RNA total de tecido foliar de abacaxizeiro por meio do método proposto por Gambino et al. (2008), sintetizar CDNA a partir do mRNA em reação mediada pela enzima M-MLV Reverse Transcriptase e utilizar o CDNA sintetizado como molde para reação de PCR utilizando *primers* específicos para cada cepa viral.

Extração de RNA

Todos os utensílios e soluções utilizadas na extração de RNA devem ser previamente esterilizados por autoclavagem, para inativação de RNAses. A água deionizada deve ser previamente tratada por 24h com dietilpirocarbonato (DEPC) na concentração 0,1% e esterilizada por autoclavagem. A extração de RNA por meio de método descrito por Gambino et al. (2008) consiste nas seguintes etapas:

- a) Macerar aproximadamente 1 mL de tecido foliar utilizando cadinho e pistilo, na presença de nitrogênio líquido.
- b) Adicionar 800 µL da solução tampão de extração, preaquecida em banho-maria a 65 °C. Agitar os tubos em vórtex logo em seguida.

- c) Tampão de extração: CTAB 2,0%, NaCl 2,0 mol L⁻¹, Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH 8,0, EDTA 25 mmol L⁻¹, PVP-40 2,5% e β-mercaptoetanol 2,0%.
- d) Incubar os microtubos de 2 mL em banho-maria a 65 °C por 20 minutos. Agitar o conteúdo por inversão a cada 5 minutos.
- e) Adicionar 800 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) nos 2 mL e homogeneizar vigorosamente.
- f) Centrifugar a 11.000 x g por 10 minutos a 4 °C.
- g) Coletar o sobrenadante e transferir para novos microtubos de 2 mL.
- h) Repetir as etapas 4 e 5.
- i) Coletar o sobrenadante e transferir para novos microtubos de 1,5 mL.
- j) Adicionar o mesmo volume do coletado de LiCl 3 mol L⁻¹.
- k) Incubar a mistura no gelo por 30 minutos.
- l) Centrifugar a 21.000 x g por 20 minutos a 4 °C. Enquanto ocorre a centrifugação, incubar o tampão SSTE em banho-maria a 65 °C.
- m) Tampão SSTE: Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 8,0, EDTA 1,0 mmol L⁻¹, SDS 1,0% e NaCl 1,0 mol L⁻¹.
- n) Descartar o sobrenadante.
- o) Ressuspender o precipitado em 500 µL de SSTE e aguardar 15 minutos a temperatura ambiente.
- p) Adicionar 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e homogeneizar.
- q) Centrifugar a 11.000 x g por 10 minutos a 4 °C.
- r) Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos de 1,5 mL.
- s) Precipitar o RNA com 70% do volume total de isopropanol gelado e centrifugar imediatamente a 21.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
- t) Lavar o precipitado com etanol 70% estéril, centrifugar a 10.000 x g por 10 minutos e descartar o sobrenadante.
- u) Deixar secar na estufa (37 °C) por 15 minutos e ressuspender em no máximo 50 µl de água deionizada estéril DEPC.

Eletroforese de RNA

Para controle de qualidade do RNA extraído por meio da metodologia exposta no item anterior é necessário realizar eletroforese em gel de agarose 1%, em cuba específica, utilizando tampão TAE, a 80V por 60 minutos. A revelação do gel é realizada em transiluminador. A boa qualidade do RNA será evidenciada pela presença, em cada faixa, de duas bandas bem definidas, correspondentes a rRNA 28S e rRNA 18S (Figura 9).

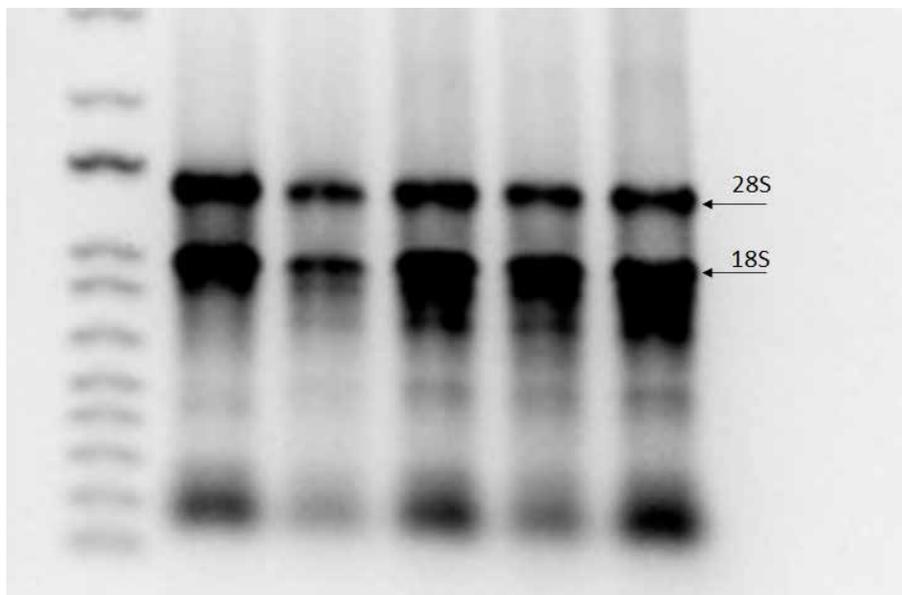


Foto: Helder Lima Carvalho

Figura 9. Padrão de comparação do produto de extração de RNA de acessos do banco de germoplasma de abacaxi em gel de agarose 1%, presença, em cada faixa, de duas bandas bem definidas, correspondentes a rRNA 28S e rRNA 18S.

Síntese de cDNA

- a) Pipetar para o microtubo de PCR de 50 μL de reação:
- 1,0 μL de dNTPs 10 mmol L^{-1} .
 - 1,0 μL de *primer* Randômico (Random Hexamer 66p).
 - 1,0 μL de *primer* PMWaV-1 R 10 μL .
 - 1,0 μL de *primer* PMWaV-2 R 10 μL .
 - 1,0 μL de *primer* PMWaV-3 R 10 μL .

- 4,0 μL de RNA molde.
 - 1,0 μL de água deionizada estéril.
- b) Incubar a mistura a 70 °C por 10 minutos no termociclador, seguido de 4 °C por 2 minutos. Pausar a reação a 4 °C e adicionar:
- 2,0 μL de Tampão M-MLV 10x.
 - 0,5 μL de RNase Out ®.
 - 6,5 μL de água deionizada estéril.
 - 1,0 μL de enzima M-MLV Reverse Transcriptase.
 - VOLUME TOTAL DA REAÇÃO: 20,0 μL .
- c) Para síntese do cDNA. Incubar a mistura final a 37 °C por 50 minutos no termociclador, seguidos por 10 minutos a 80 °C para inativação da enzima. Após esse período, programar o termociclador para ficar a 4 °C por tempo indeterminado.

Reação de PCR com a cDNA sintetizado

- a) Pipetar para novo microtubo de 50 μL de reação:
- 3,0 μL da mistura contendo cDNA recém-sintetizado.
 - 1,0 μL de *primer* F 10 nmol.
 - 1,0 μL de *primer* R 1 0 nmol.
 - 1,0 μL de dNTPs 2.5 mmol L⁻¹.
 - 2,5 μL de Tampão 10 x da enzima Taq Polimerase.
 - 1,5 μL de MgCl₂ 50 mmol L⁻¹.
 - 14,8 μL de água deionizada estéril.
 - 0,2 μL de Taq Polimerase 5U/ μL .
 - VOLUME TOTAL DA REAÇÃO: 25,0 μL .
- b) Para cada amostra, três tubos de reação devem ser preparados. Cada um deles deve conter a mistura de reagentes descrita no item 1, porém o primeiro deve ser preparado com *primers* específicos para PMWaV-1. O segundo com *primers* específicos para PMWaV-2 e o terceiro com *primers* específicos para PMWaV-3. Os três tubos de cada amostra podem ser acondicionados para reação no mesmo programa do termociclador mostrado no item 3.

- c) Realizar o PCR.
- d) Armazenar os tubos em freezer comum ou adicionar 2,0 µL de Loading Buffer® Invitrogen, aplicar todo o conteúdo da reação em gel de agarose 1,5% para revelação.

Eletroforese dos produtos de RT-PCR

Para revelação do resultado do RT-PCR, é realizada eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE, a 80V por pelo menos 2 horas e 30 minutos. Deve haver pelo menos um controle positivo e pelo menos um controle negativo para cada cepa viral pesquisada, antes das amostras. A revelação é realizada em transiluminador.

O controle de qualidade da indexação se realiza por meio da introdução de controles positivos e negativos obtidos a partir de plantas certificadas. Esses controles estão disponíveis nos géis de eletroforese preparados, sendo vistos nas fotografias de revelação. Conforme o resultado da indexação há duas atitudes possíveis a tomar. Plantas contaminadas com vírus devem ser encaminhadas para o procedimento de limpeza clonal. Plantas sadias devem ser transferidas para meio de conservação, obtendo-se assim, a duplicata de segurança do BAG in vitro.

Limpeza clonal

Utilizar plantas in vitro que tenham 45 dias desde o último subcultivo para proceder à retirada do ápice caulinar em câmara de fluxo laminar, juntamente com microscópio estereoscópico, papel branco estéril, papel milimetrado estéril, tubos de ensaio contendo meio de regeneração e ferramentas de trabalho (pinça, bisturi, azulejo, etc.). Realizar remoções sucessivas das folhas com auxílio de microscópio estereoscópico, até que o tamanho do explante atinja 0,5 mm a 1 mm. Para se certificar do tamanho do explante, utilizar papel milimetrado estéril.

Transferir pelo menos 10 ápices para tubos de ensaio (um ápice por tubo) contendo meio de regeneração com a base levemente mergulhada no meio nutritivo e o ápice voltado para cima. Após 120 a 180 dias, coletar folhas de cada planta proveniente do cultivo de ápices caulinares para reindexação. A partir do resultado da reindexação, proceder da seguinte maneira. Plantas

contaminadas devem passar novamente pelo procedimento de limpeza clonal, descrito acima. Plantas saudias devem ser transferidas para meio de conservação, obtendo-se assim a duplicata de segurança do BAG in vitro (Figura 7).

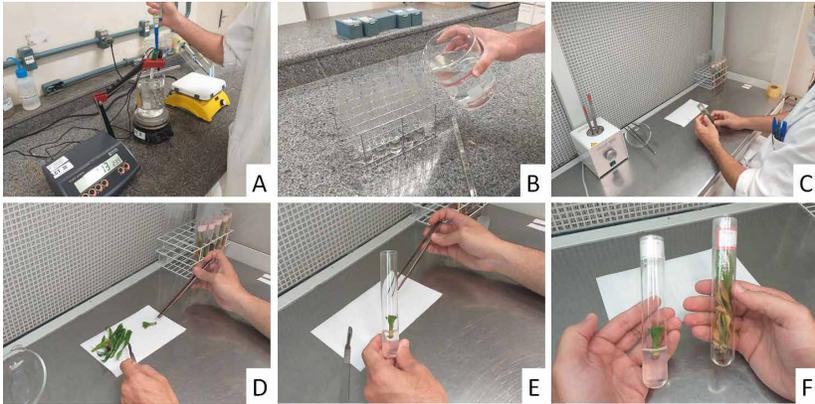
Transferência de plantas saudias para compor a duplicata de segurança in vitro (BAG in vitro)

Plantas saudias, com certificação de ausência de contaminação viral, são transferidas para meio de conservação (MS sem reguladores de crescimento), em tubos de ensaio individuais. Cada tubo de ensaio é identificado com etiqueta autoadesiva contendo informações sobre o número do acesso, data e responsável pelo estabelecimento. Seis plantas por acesso são introduzidas no BAG in vitro na sala de conservação, cujas condições de incubação são 20 ± 1 °C, fotoperíodo de 12h e densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas estantes reservadas para o BAG in vitro.

O controle de qualidade da conservação das duplicatas de segurança se verifica por meio do registro das datas de subcultivo, que são evidência do crescimento lento das plantas que compõem cada acesso e sua viabilidade. O controle fitossanitário do acesso é realizado na etapa de estabelecimento in vitro do material, quando é realizado o teste de indexação para detecção do vírus PMWaV. Se a planta estiver positiva (infectada) após sua introdução in vitro entra na rota de limpeza viral, como especificado no item 2.3.

Manutenção das plantas do BAG in vitro (POP: 014.2.4.02.3.005)

A manutenção e a conservação de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi in vitro consistem em manter as plantas dos acessos em condições de crescimento lento, preservando sua identidade genética e capacidade de regeneração por meio de subcultivos periódicos (Figura 10). As plantas devem ser mantidas em câmara de conservação a 20 ± 1 °C, fotoperíodo de 12h e densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. É importante que o registro da temperatura da câmara de conservação seja realizado diariamente. Ajustes nas condições ambientais só devem ser realizados por profissionais habilitados, quando houver desvios provocados por defeitos nos equipamentos ou para reposição imediata de lâmpadas ao fim de sua vida útil. Todos os ajustes realizados devem ser devidamente registrados, indicando o motivo e a responsabilidade.



Fotos: Everton Hilo de Souza

Figura 10. Procedimentos de manutenção das plantas do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi in vitro. Preparo do meio de cultura (A); Distribuição do meio de cultura em tubos de ensaio (B); Remoção da planta conservada de dentro do tubo de ensaio (C); Corte das raízes e remoção das folhas senescentes e corte de 80% das folhas verdes (D); Introdução da planta reduzida em novo meio de cultura (E); Comparação de uma planta subcultivada e uma conservada por 24 meses (F).

O acompanhamento da conservação se dá por meio de visita semanal à câmara de conservação, oportunidade na qual deve ser observado o crescimento das plantas e removidos tubos que estejam contaminados. No momento em que se constata a necessidade de subcultivo de uma planta, cujas folhas verdes tenham atingido o topo do tubo e que já tenham mais de 2/3 de folhas senescentes, deve-se realizar as seguintes etapas em câmara de fluxo laminar:

- a) Com auxílio de pinças e bisturis estéreis, extrair a planta conservada de dentro do tubo de ensaio. Em seguida, cortar as raízes, remover as folhas senescentes e podar cerca de 80% da extensão das folhas. Dessa maneira, obtêm-se um explante com medidas aproximadas de 2 cm, sendo $\frac{1}{4}$ de sua extensão formado por parte do talo.
- b) Com auxílio de pinças e bisturis estéreis, introduzir o explante em um tubo de ensaio individual com meio de conservação fresco.
- c) Identificar o tubo com as seguintes informações, número do acesso, data e o nome do operador.

Um trabalho realizado nesse BAG com plantas conservadas por 10 anos, mostrou que plantas de abacaxi nessas condições podem suportar um intervalo de 24 meses sem necessidade de subcultivar, mantendo sua viabilidade e sua estabilidade genética (Silva et al., 2016).

O controle de qualidade da conservação das duplicatas de segurança se verifica por meio do registro das datas de subcultivo, que são evidência do crescimento lento das plantas que compõem cada acesso, e do acompanhamento visual periódico do crescimento e da não contaminação do meio de cultura. Os resultados dos intervalos entre os subcultivos são registrados na ata de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos.

Aclimatização das plantas de abacaxi do BAG in vitro para retorno ao campo (POP:014.2.4.02.3.009)

A aclimatização de plantas de abacaxi, provenientes do BAG in vitro, consiste na retirada das plantas do ambiente in vitro e sua transferência e adaptação em ambiente externo, preservando sua capacidade de crescimento e desenvolvimento. O procedimento de transferência das plantas do meio de cultura para substrato em bandejas para o cultivo deve ocorrer em estufa, casa de vegetação, telado ou outro local protegido que permita a correta irrigação e controle de condições ambientais durante o período de aclimatização (Figura 11).



Figura 11. Procedimentos de aclimatização das plantas do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi in vitro. Plantas in vitro na etapa de enraizamento e alongamento (A-B); Redução das raízes (C); Lavagem das plantas e raízes para remoção do meio de cultura (D); Cultivo das plantas em bandejas com substrato comercial (E); Plantas aclimatizadas após 30 dias (F).

Preparo das bandejas de cultivo

As bandejas de cultivo devem ser preenchidas com substrato comercial que tenham como base casca de pinus, vermiculita de granulometria fina e húmus, em cada uma das células, e identificadas com o número do acesso. Usando uma mangueira com aspersor, irrigar a superfície da bandeja, deixando o substrato bastante úmido. Nesta etapa, é necessário ter atenção para que o conteúdo das células não seja revolvido pela força do jato de água. Utilizando um objeto cilíndrico de pequeno diâmetro (como uma barra de metal, lápis ou caneta), criar orifícios suficientes para uma planta em cada célula da bandeja de cultivo, com a profundidade desejada (1 cm a 2 cm).

Retirada e cultivo das plantas

Plantas de abacaxi de acessos mantidos em meio de enraizamento in vitro em sala de crescimento por pelo menos 30 dias (Figura 11A-B) devem ser transportadas, em bandejas, ainda dentro dos frascos fechados, até a casa de vegetação onde se encontram as bandejas de cultivo.

Então, realizar as seguintes etapas:

- a) Extrair a planta de dentro do frasco e remover o excesso de meio de cultura com água abundante, para evitar contaminações (Figura 11B).
- b) Cortar as raízes que excederem 1 cm de comprimento (Figura 11C).
- c) Lavar as raízes com água corrente em uma segunda bandeja (Figura 11D).
- d) Inserir a planta no sulco aberto, durante a etapa de preparo das bandejas, sustentando-a (Figura 11E). Nesta etapa, é necessário evitar que qualquer fragmento de substrato caia na roseta foliar já que isso causa a morte da planta.
- e) Repetir as etapas “a” a “c” até finalizar todas as células da bandeja.
- f) Irrigar brevemente as plantas por aspersão.

Irrigação e acompanhamento da aclimatização

Após o cultivo em substrato, as plantas devem ser irrigadas no mínimo duas vezes ao dia, por aspersão. É importante manter o substrato sempre bem hidratado com o cuidado de não enxarcar. Plantas eventualmente mortas ou contaminadas por fungos ou bactérias devem ser rapidamente removidas da bandeja, para impedir que outras plantas sejam afetadas.

Duplicata de segurança dos acessos em condições de telado (POP: 014.2.4.02.3.009)

A manutenção de uma planta de cada acesso de abacaxizeiros em condições de telado como duplicata de segurança do BAG é fundamental. As plantas devem ser colocadas sobre bancadas de cimento dentro do telado, utilizando substrato com boa aeração em vasos plásticos devidamente numerados, de 0,15 a 0,30 m de diâmetro, dispostos em ordem numérica (Figura 12A). Os acessos devem ser identificados com o código de identificação aplicado sob pressão em placas de alumínio, para que não haja risco de perda ou troca de identificação (Figura 12B). O código de identificação deve ser igual ao que consta no BAG em campo.

Fotos: Fernanda Vidigal Duarte Souza

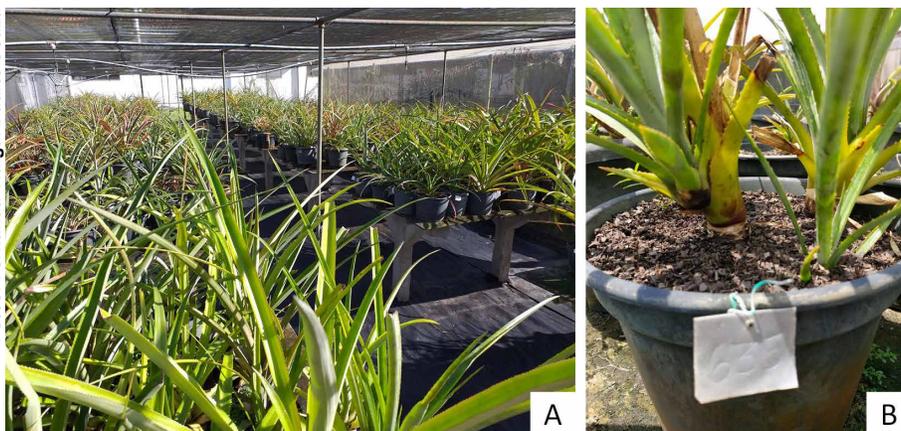


Figura 12. Cópia de segurança do BAG abacaxi em condições de telado (A); Detalhe das placas de alumínio utilizadas para identificação dos acessos (B).

Os registros referentes às cópias de segurança dos acessos devem ser realizados na ata de procedimentos do BAG em telado, sendo que devem ser registradas informações como: datas de florescimento; ocorrência de pragas, doenças ou alguma anormalidade observada; datas de transplante e renovação do acesso. Além disso, as informações sobre remessa, inclusão, perda e descarte de acessos devem ser registradas na ata de controle de acesso.

Procedimento para o cultivo das plantas

Devem ser usadas mudas do tipo filhote ou filhote rebentão que sejam oriundas de plantas sadias de cada acesso mantido no BAG em campo. Após a retirada da muda, as plantas, com identificação inicialmente realizada nas folhas com caneta de tinta permanente, são encaminhadas para o telado.

As plantas a serem inseridas no BAG em telado (cópia de segurança) devem ser oriundas de plantas livres do vírus da murcha do abacaxizeiro. Considerando essa condição da planta, será necessário garantir o isolamento das bancadas com relação à ocorrência de formigas. Se não houver um telado antiafídeo, as bancadas podem ser protegidas por meio da aplicação de graxa automotiva na base dos pés da mesa com uma frequência quinzenal.

Para o plantio, o substrato deve ocupar 3/4 do vaso e a muda ser depositada no seu centro. O operador deve segurar a muda com uma das mãos e completar o volume do substrato até preencher totalmente o vaso. Fazer uma pressão na base da muda para garantir que não se moverá no substrato.

Como os vasos devem ser identificados, reproduzir a mesma identificação que consta na folha da muda em placa de alumínio utilizando pressão. Os vasos devem ser furados na parte superior onde as placas deverão ser presas com arame galvanizado e estarem visíveis para identificação (Figura 12B).

Os vasos devem ser mantidos em bancadas com irrigação programada, que pode ser realizada por um funcionário designado com um cronograma de regas ou pela programação de um sistema automático. Nos primeiros 45 dias após o plantio, a rega deve ser diária. Para plantas já estabelecidas a rega deve ser realizada de três a quatro vezes por semana.

Procedimentos fitotécnicos para a manutenção das plantas

Os procedimentos fitotécnicos para a manutenção das plantas são basicamente a adubação no momento do plantio ou da renovação, usando-se um adubo de liberação lenta, como um fertilizante com 15% de nitrogênio, 9% de fósforo e 12% de potássio, assim como as adubações foliares a cada dois meses. O monitoramento para identificação de pragas e doenças é realizado inicialmente por meio de inspeção visual, semanalmente. Em caso da identificação de qualquer patógeno deverão ser tomadas as medidas recomendadas pelo fitopatologista e/ou entomologista especializado na cultura.

O florescimento dos acessos deve ocorrer de forma natural. Após o florescimento, maturação dos frutos e início de perfilhamento, quando as mudas estiverem em tamanho adequado para plantio (tipo filhote ou filhote rebentão) deve-se proceder o replantio do acesso, realizando-se a troca do substrato e o uso do adubo de liberação lenta, para garantir um crescimento adequado da nova planta.

O controle de qualidade das plantas conservadas é realizado considerando a sobrevivência de todos os acessos introduzidos de forma sadia (ausência de enfermidades) e sua posterior introdução no Banco Ativo de Germoplasma em campo e em suas duplicatas de segurança: telado e in vitro.

Plantio, conservação e manutenção das plantas do BAG em campo e em telado

O plantio e manutenção dos acessos de abacaxizeiros são realizados mediante manejo fitotécnico que engloba diversas atividades de rotina para uma conservação eficiente dos acessos, que vão desde coleta, renovação do BAG, limpeza da área (capinas), cobertura morta, adubações, irrigação, monitoramento e controle de pragas e doenças, além de atividades de indexação para monitoramento da murcha do abacaxizeiro e multiplicação dos acessos para atividades de caracterização (Figura 13).



Fotos: Everton Hilo de Souza

Figura 13. Plantio, manutenção e manejo fitotécnico dos acessos de abacaxizeiros conservados no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Coleta e retirada de mudas (filhotes, filhotes rebentão ou rebentão) (A); Plantio de mudas após coveamento e preparo do solo (B); Capina e limpeza da área (C); Distribuição da cobertura morta (D); Identificação dos acessos (E); Irrigação por gotejamento (F); Controle de pragas e doenças por pulverização (G); Aplicação de adubo foliar (H); Caracterização e monitoramento dos acessos conservados (I).

Após a coleta, doação ou intercâmbio de um novo acesso de abacaxi, as plantas recebem uma identificação com um código sequencial, fornecido pelo curador, considerando os acessos já introduzidos. Esse mesmo código do acesso é mantido para o campo e todas as duplicatas de segurança: em telado e in vitro. Os procedimentos de indexação e limpeza e, posteriormente, a introdução do acesso in vitro e em telado, devem ocorrer conforme orientação dos itens 2.2 a 2.7 desse documento.

O plantio dos acessos em campo é realizado em covas abertas manualmente com auxílio do enxadão a profundidade de 0,20 m. O espaçamento utilizado é em fileiras simples de 1 m x 0,4 m. As adubações de plantio e cobertura devem ser baseadas na análise química do solo. Para o BAG em telado, a adubação é conduzida na renovação do substrato, para todas as plantas, além de ser realizada via foliar, mensalmente. O manejo das plantas invasoras é realizado manualmente, para manter os acessos livres de concorrência com as plantas invasoras, com maior atenção para os seis primeiros meses após o plantio ou a renovação. As plantas invasoras próximas às plantas devem ser arrancadas manualmente, para não ferir as raízes dos abacaxizeiros.

O manejo de pragas e doenças é realizado por meio de monitoramento quinzenal, por técnico treinado, utilizando-se métodos de controle preconizados. O manejo da irrigação é realizado de forma complementar e visa manter a umidade no solo suficiente para o crescimento, frutificação e multiplicação dos acessos em campo, sendo que no período seco do ano (meses de setembro a março) a frequência é de duas vezes por semana. Para o BAG em telado a irrigação é por microaspersão, realizada de forma complementar com frequência diária. Os acessos em campo são renovados sempre que as mudas atingem o tamanho de 0,40 m a 0,50 m, para a manutenção do indivíduo dentro do acesso. A manutenção e a renovação dos acessos são realizadas após a frutificação e emissão de mudas pela planta. O rodízio da área do BAG abacaxi em campo é realizado a cada 10 anos, visando, principalmente o pousio e recuperação do solo. Para o BAG em telado a manutenção e renovação são realizadas somente se ocorrer perda de vigor no acesso, pode-se trocar o vaso ou o substrato, se verificada a necessidade, com posterior registro em ata de campo.

Caracterização dos acessos de abacaxi

A caracterização é uma atividade essencial no manejo de coleções de germoplasma, pois consiste em obter dados para descrever, identificar e diferenciar acessos dentro de espécies, classes ou categorias, por meio de descritores adequados (Querol, 1988; Vicente et al., 2005). A atividade de caracterização deve considerar, principalmente, caracteres botânicos de alta herdabilidade, facilmente visíveis ou mensuráveis e que se expressam consistentemente em todos os ambientes (Valls, 2007).

A caracterização e a avaliação bem conduzidas apresentam como vantagens a identificação de acessos duplicados, reduzindo o desperdício de tempo e recursos financeiros. Permite também estabelecer coleções nucleares (*core collections*), que, por definição, abrangem, com o mínimo de redundância, a diversidade genética reunida em uma espécie cultivada e nas espécies silvestres a ela relacionadas, além de permitir a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos, bem como da ocorrência ou não de variabilidade intrínseca entre acessos (Valls, 2007).

Uma série de descritores tem sido elaborados objetivando caracterizar e identificar acessos de abacaxizeiros, a exemplo dos descritores já elaborados (Giacometti, 1988; IBPGR, 1991; Santos, 1998). No caso de abacaxizeiros para fins ornamentais os descritores foram elaborados por Barros et al. (2005), Souza et al. (2012) e utilizados para o registro e proteção de cultivares, no Sistema Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os estudos de caracterização e avaliação de germoplasma permitem o conhecimento da variabilidade genética existente entre os acessos, formando uma importante base de dados que podem subsidiar o melhoramento genético com diversas finalidades, seja para melhorar a produção e a qualidade das frutas, na identificação de atributos funcionais, biomoléculas, produção de fibras, microrganismos associados, ou mesmo para sua utilização como plantas ornamentais.

Para a caracterização dos acessos são utilizados os descritores quantitativos e qualitativos apresentados nas Tabelas 1 e 2. Os ensaios são realizados por dois ciclos reprodutivos e conduzidos em condições que asseguram o desenvolvimento normal das plantas. São utilizadas três repetições (plantas) por acesso. Vale destacar que a caracterização morfológica deve ser realizada no início do florescimento, quando ocorrer o fechamento da última flor e no fruto maduro.

Tabela 1. Descritores quantitativos utilizados na caracterização de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Nº	Descritor	Medida
01	Altura da planta: medida do solo até a ponta da folha mais alta na posição natural da planta, sem elevar as folhas.	Metro
02	Número de folhas.	Número
03	Diâmetro da copa: medida de uma ponta a outra da copa.	Metro

continua...

Tabela 1. Continuação.

Nº	Descritor	Medida
04	Comprimento da folha mais longa: medida a partir da inserção no talo até a ponta da folha, no momento da iniciação floral.	Metro
05	Largura máxima da folha: medida de uma margem a outra da folha na região mais larga.	Metro
06	Comprimento da inflorescência: no seu maior tamanho com todas as flores ainda fechadas.	Metro
07	Diâmetro da inflorescência: no seu maior tamanho com todas as flores ainda fechadas.	Metro
08	Comprimento do sincarpo: medido após o fechamento da última flor.	Metro
09	Diâmetro do sincarpo: medido na região mediana do sincarpo após o fechamento da última flor.	Metro
10	Comprimento da coroa: após o fechamento da última flor.	Metro
11	Comprimento do pedúnculo: após o fechamento da última flor.	Metro
12	Diâmetro do pedúnculo: medido na altura média, após o fechamento da última flor.	Metro
13	Comprimento da pétala: realizado na antese floral.	Metro
14	Comprimento do estame: realizado na antese floral.	Metro
15	Comprimento do estilete: realizado na antese floral.	Metro
16	Comprimento do frutílo: medido da base até a parte superior do frutílo com o fruto no ponto de maturação para consumo.	Metro
17	Largura do eixo: medido na região mediana com o fruto aberto transversalmente no ponto de maturação para consumo.	Metro
18	Comprimento das brácteas: medido após o fechamento da última flor.	Metro
19	Largura do eixo: medido na região mediana com o fruto aberto transversalmente no ponto de maturação para consumo.	Metro
20	Número de rebentões: contabilizado após colheita do fruto.	Número
21	Número de filhotes rebentão: contabilizado após colheita do fruto.	Número
22	Número de filhotes: contabilizado após colheita do fruto.	Número

Fonte: Adaptado de IBPGR (1991) e Souza et al. (2012).

Tabela 2. Descritores qualitativos utilizados na caracterização de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Nº	Descritor	Nota
01	Hábito da planta: observação tomada com relação ao seu ângulo de inserção e pendência das folhas.	(1) Aberto; (2) Ereto; (3) Decumbente; (4) Caulescente.
02	Variegação das folhas: observado na folha mais longa, listras ou pontuações de cores diferentes nas folhas.	(1) Sem variegação; (2) Variegadas com margens verdes; (3) Variegadas com margens brancas; (4) Variegadas com margens vermelhas.
03	Cor das folhas: observado na parte mediana da folha mais longa.	(1) Verde-claro; (2) Verde-escuro; (3) Antocianina.
04	Presença de antocianina nas folhas: observado na parte mediana da folha mais longa.	(1) Pouco; (2) Média; (3) Muita.
05	Densidade de tricomas: observada na parte mediana da folha mais longa.	(1) Ausente; (2) Muito esparsa; (3) Média; (4) Densa.
06	Piping: observado na parte mediana da folha mais longa. Caracteriza-se pela presença de epiderme inferior dobrada sobre a margem da folha ao longo da superfície superior, apresentando uma faixa estreita prateada.	(1) Ausente; (2) Presente.
07	Estolão: ramificação na base do caule ou raízes.	(1) Ausente; (2) Presente.
08	Espinescência: presença de espinhos nas folhas.	(1) Ausente; (2) Presente.
09	Posição dos espinhos na margem da folha: observado na parte mediana da folha mais longa.	(1) Somente na base; (2) Somente no ápice; (3) Na base e no ápice; (4) Ao longo da margem.
10	Cor dos espinhos: observada na folha mais longa.	(1) Igual da lâmina foliar; (2) Diferente da lâmina foliar.

continua...

Tabela 2. Continuação.

Nº	Descritor	Nota
11	Cor da bráctea do pedúnculo: bráctea mais próxima à inflorescência.	(1) Verde-claro; (2) Verde-escuro; (3) Rosado-claro; (4) Rosado-escuro; (5) Vermelho-claro; (6) Vermelho-escuro; (7) Roxo-claro; (8) Roxo-escuro.
12	Coloração do sincarpo imaturo: após o fechamento da última flor.	(1) Branco creme; (2) Verde-claro; (3) Verde-escuro; (4) Amarelo; (5) Alaranjado; (6) Rosado-claro; (7) Rosado-escuro; (8) Vermelho-claro; (9) Vermelho-escuro; (10) Roxo-claro; (11) Roxo-escuro; (12) Marrom a preto; (13) Vinho.
13	Coloração do sincarpo aos 30 dias: após o fechamento da última flor.	(1) Branco creme; (2) Verde-claro; (3) Verde-escuro; (4) Amarelo; (5) Alaranjado; (6) Rosado-claro; (7) Rosado-escuro; (8) Vermelho-claro; (9) Vermelho-escuro; (10) Roxo-claro; (11) Roxo-escuro; (12) Marrom a preto; (13) Vinho.
14	Forma do sincarpo: após o fechamento da última flor.	(1) Trapezoidal com base larga; (2) Cilíndrica; (3) Ovoide; (4) Cônica; (6) Globosa.

continua...

Tabela 2. Continuação.

Nº	Descritor	Nota
15	Forma do pedúnculo: após o fechamento da última flor.	(1) Ereto; (2) Pouco sinuoso; (3) Muito sinuoso.
16	Bráctea na base da coroa: após o fechamento da última flor.	(1) Ausente; (2) Presente.
17	Cor da bráctea na base da coroa: após o fechamento da última flor.	(1) Branco creme; (2) Verde-claro; (3) Verde-escuro; (4) Amarelo; (5) Alaranjado; (6) Rosado-claro; (7) Rosado-escuro; (8) Vermelho-claro; (9) Vermelho-escuro; (10) Roxo-claro; (11) Roxo-escuro; (12) Marrom a preto; (13) Vinho.
18	Intensidade da coloração do ápice: após o fechamento da última flor.	(1) Baixa; (2) Média; (3) Alta.
19	Ápice do frutinho: avaliado no ponto de maturação para consumo.	(1) Cavado; (2) Plano; (3) Proeminente; (4) Muito proeminente.
20	Cor da polpa: avaliada no ponto de maturação para consumo.	(1) Branca; (2) Amarela; (3) Esbranquiçada; (4) Amarela-claro; (5) Amarela média; (6) Laranja amarelada; (7) Laranja; (8) Avermelhada; (9) Outra.
21	Uniformidade da cor da polpa: avaliada com o fruto no ponto de maturação para consumo.	(1) Uniforme ou ligeiramente; (2) Irregular; (3) Moderadamente irregular; (4) Fortemente irregular.

continua...

Tabela 2. Continuação.

Nº	Descritor	Nota
22	Densidade da polpa do fruto	(1) Baixa; (2) Média; (3) Alta.
23	Firmeza da polpa: realizada com o auxílio de um penetrômetro, no meio do fruto no ponto de maturação para consumo sem casca.	(1) Macia; (2) Média; (3) Alta.
24	Quantidade de fibra: observada em frutos no ponto de maturação para consumo. O fruto é descascado, cortado ao meio longitudinalmente e mastigado.	(1) Baixa; (2) Média; (3) Alta.
25	Aroma da polpa: avaliado com o fruto no ponto de maturação para consumo.	(1) Fraco; (2) Médio; (3) Forte.
26	Suculência da polpa: considerado o conteúdo de suco obtivo por prensagem, em relação ao peso total do fruto no ponto de maturação para consumo.	(1) Baixa; (2) Média; (3) Alta.
27	Acidez da polpa: calculada a acidez titulável de uma amostra de suco obtida do terço médio do fruto no ponto de maturação para consumo.	(1) Baixa; (2) Média; (3) Alta.
28	Doçura da polpa: indicada em °Brix, calculada com o auxílio de um refratômetro, corresponde ao conteúdo de sólidos solúveis de uma amostra de suco obtida do terço médio do fruto no ponto de maturação para consumo.	(1) Baixa; (2) Média; (3) Alta.

Fonte: Adaptado de IBPGR (1991) e Souza et al. (2012).

Saúde e segurança

A saúde e segurança para funcionários que trabalham com o banco, e também das dependências onde o banco está localizado, são itens exigidos para a conformidade do BAG de abacaxi com as normas de qualidade do Qualiveg.

O programa de controle médico e saúde ocupacional pode ser encontrado em um documento básico, técnico, normativo e protocolar (Programa de Controle

Médico de Saúde Ocupacional – PCMSO) aplicável a todas as Unidades da Embrapa e fundamentado em um conjunto de normas regulamentadoras aprovadas pela Portaria 3.214, de 8 de junho de 1978, do Ministério do Trabalho.

No PCMSO da Embrapa Mandioca e Fruticultura estão incluídos protocolos de saúde de algumas especialidades, que permitem a avaliação do risco de adoecimento dos empregados em relação a doenças crônicas degenerativas de incidência na população em geral. Esse documento se encontra disponível no Setor de Gestão de Pessoas (SGP) da Unidade.

Controle de acesso às dependências do BAG

O controle do acesso às dependências da Embrapa Mandioca e Fruticultura se realiza por meio de regras, recomendações e práticas já estabelecidos. Esse controle se justifica pela necessidade de minimizar ameaças à segurança das pessoas, à segurança do trabalho, à segurança da informação, e de proteger a empresa contra riscos ao patrimônio e à sua sustentabilidade, minimizando exposição da empresa a problemas de ordem trabalhista e possibilitando o cumprimento das normas de qualidade exigidas pelo Qualiveg. Existem práticas na Unidade aplicáveis aos empregados, colaboradores e visitantes, que padroniza os procedimentos para entrada, saída e circulação de pessoas e veículos nas áreas da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Em relação às dependências onde há acessos do BAG de abacaxi há outros controles conforme detalhado a seguir.

BAG em campo (matriz)

A segurança em relação às plantas do BAG que estão em campo se dá pela restrição da entrada na Embrapa Mandioca e Fruticultura, cujo controle é realizado por empresa de segurança contratada pela Unidade e pela proibição de pessoas fora do quadro de funcionários de circular sem convite e sem identificação por meio de crachás. A instalação de cerca no perímetro do BAG de abacaxi foi descartada por dificultar sobremaneira os tratos culturais para a manutenção das plantas.

BAG em telado

O telado onde se encontram as plantas do BAG é uma estrutura fechada com acesso por uma porta. A porta é mantida trancada e o acesso (entrada e saída) é restrito e controlado utilizando-se um caderno de registro de acesso.

BAG in vitro

Os acessos do BAG mantidos in vitro localizam-se no Laboratório de Cultura de Tecidos, o qual tem um controle digital com biometria na porta de entrada e um caderno para registro de visitantes e pessoas que não fazem parte da equipe que executa as atividades no laboratório. Dentro do laboratório, o BAG in vitro encontra-se em uma sala mantida trancada, sendo o acesso restrito a pessoas cadastradas e autorizadas, tais como: curador, analista e assistente responsáveis e, eventualmente, estagiário que desenvolva atividades a partir do BAG.

Agradecimento

Agradecemos aos órgãos de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelos inúmeros projetos aprovados.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 17034:2017**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

_____. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 3. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

BARROS, L. M.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, F. V. D.; FAVERO, A. P.; MENDES, R. A.; BUSO, G. S. C.; TORRES, A. C. Descriptors to characterize and evaluate the ornamental species of *Ananas* in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 524, 2005.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Aprova as Normas Regulamentadoras – NR. Portaria n. 3.214, de 08 de junho de 1978. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 jun. 1978.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. **POP - 014.2.4.02.3.002 Revisão 00 – MAR/2017**: Procedimento diagnóstico para indexação de abacaxizeiro em relação ao vírus da murcha. Procedimento Operacional Padrão, Documento interno, 2017.

_____. **POP - 014.2.4.02.3.004 Revisão 00 – NOV/2017**: Procedimento de introdução da duplicata de segurança no banco de germoplasma in vitro de abacaxizeiro. Procedimento Operacional Padrão, Documento interno, 2017.

_____. **POP - 014.2.4.02.3.005 Revisão 00 – NOV/2017**: Procedimento de manutenção e conservação de acessos do banco de germoplasma in vitro de abacaxizeiro. Procedimento Operacional Padrão, Documento interno, 2017.

_____. **POP - 014.2.4.02.3.009 Revisão 00 – MAI/2018**: Procedimento de aclimatização de plantas de abacaxi em caso de resgate para retorno ao campo. Procedimento Operacional Padrão, Documento interno, 2018.

_____. **POP - 014.2.4.02.3.010 Revisão 00 – JAN/2019**: Coleta de germoplasma de abacaxizeiros em populações naturais ou áreas de cultivo tradicional com variedades locais. Procedimento Operacional Padrão, Documento interno, 2019.

_____. **POP - 014.2.4.02.3.011 Revisão 00 – JAN/2019**: Recepção de amostras e plantio de abacaxizeiros após coleta, doação ou intercâmbio de germoplasma. Procedimento Operacional Padrão, Documento interno, 2019.

GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analysis**, Oxford, v. 19, p. 520-525, 2008.

GIACOMETTI, D. C. Descritores para caracterização e avaliação de germoplasma. *In*: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1, 1988, Jaboticabal. **Anais...**, Jaboticabal: FCAV, p. 129-134, 1988.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. (cont. updated). **Encyclopaedia of Bromeliads**, Version 4. Disponível em: [http://bromeliad.nl/encyclopedia/University Botanic Gardens, Utrecht](http://bromeliad.nl/encyclopedia/University%20Botanic%20Gardens,%20Utrecht). Acesso em: 2 jul. 2019.

GUERRA, P. A.; SOUZA, E. H.; ANDRADE, E. C.; MAX, D. A. S.; OLIVEIRA, R. S.; SOUZA, F. V. D. Comparison of shoot tip culture and cryotherapy for eradication of ampeloviruses associated with Pineapple mealybug wilt in wild varieties. **Cellular & Developmental Biology Plant**, v. online, p. 1-15, 2020.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Descriptors for pineapple**. Rome: IBPGR, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL.

DOQ-CGCRE-034 - Revisão 00 – SET/2012: Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos. 2012. 48p. Documento de caráter orientativo. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/DOQ-Cgcre-34_00_traducao_guia%20de%20boas%20praticas%20CRB_OECD.pdf. Acesso em: 22 jul. 2021.

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado**: aproximación técnica y socioeconómica. Lima, Peru: Industrialgráfica, 1988.

SANTOS, C. W. F. **Caracterização e avaliação de germoplasma de abacaxi**. 1998. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

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 conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Heidelberg, v, 127, p. 123-133, 2016.

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; PELACANI, C. R.; JESUS, J. S.; SOUZA, C. P. F.; SOUZA, A. B. P.; SOUZA, F. V. D. Validation of conservation of pineapple germplasm for ten years based on field morphological characterization. **Genetic resources and crop evolution**, v. online, p. 1-11, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10722-021-01116-5>

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Heidelberg, v. 59, n. 7, p. 1357-1376, 2012.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. *In*: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. *In*: NASS, L. L. (Org.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa, 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. Turin. **Proceedings...**, Turin: [s.n.], 2005. p. 121-128.



Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 017113