PROCISUR

IICA

# DIALOGO XLV

## CONSERVACION DE GERMOPLASMA VEGETAL

ICA
ROCISUR
IALOGO-45

PROGRAMA COOPERATIVO PARA EL DESARROLLO TECNOLOGICO AGROPECUARIO DEL CONO SUR

PROGRAMA COOPERATIVO PARA EL DESARROLLO TECNOLÓGICO AGROPECUARIO DEL CONO SUR
PROCISUR

IICA
BIBLIOTECA VENEZUELA
26 MAY 1997
RECIBIDO

# DIALOGO XLV

## CONSERVACION DE GERMOPLASMA VEGETAL

**EDITOR:** *Dr. Juan P. Puignau*
**COEDITORA:** *Dra. Rozane da Cunha*

IICA
Montevideo, Uruguay
1996

IICA
PROCISUR
Diálogo 45

IV-009430

CDCC1900

Consevación de germoplasma vegetal. --
ed. por Juan P. Puignau. -- Montevideo : IICA-PROCISUR, 1996.
166 p. (Diálogo - IICA-PROCISUR; 45)

ISBN 92-9039-291 6

Contiene trabajos presentados en: Curso sobre conservación de germoplasma vegetal (Brasilia, Brasil : 19-30 Set. 1994).

/CONSERVACION DEL GERMOPLASMA/ /RECURSOS GENETICOS/ /RECURSOS VEGETALES/

AGRIS F30 CDD 581.15

*Las ideas y planteamientos contenidos en los artículos firmados son propios del autor y no representan necesariamente el criterio del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.*

Este DIALOGO reproduce los trabajos del Curso sobre **Conservación de Germoplasma Vegetal** realizado en CENARGEN / EMBRAPA, Brasilia, Brasil, del 19 al 30 de setiembre de 1994.

Este Curso contó con la coordinación de la Dra. Rozane da Cunha, en el marco de las actividades del Subprograma Recursos Genéticos del PROCISUR, cuya Coordinadora Internacional es la Dra. Clara Goedert.

# Presentación

*Los recursos genéticos constituyen, sin duda, la base del desarrollo agrícola de los países, por lo que es muy importante su recolección, evaluación, caracterización, conservación y uso sostenible.*

*Desde los puntos de vista metodológicos y políticos, no se puede pensar en manejar la conservación y uso de los recursos genéticos, sin antes tomar conciencia de su importancia y establecer las capacitaciones necesarias, para el desempeño de las actividades de investigación y manejo de esos recursos, que son fundamentales para la producción de alimentos.*

*El Subprograma de Recursos Genéticos del PROCISUR, considerando que hay en casi todos los niveles y especialidades científicas y técnicas de los países, una elevada escasez de personal bien capacitado en el área de manejo, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos, definió en su documento marco como máxima prioridad: "promover y apoyar la formación y perfeccionamiento de los recursos humanos".*

*El Curso realizado en CENARGEN/EMBRAPA, Brasil y del que ahora se publican las conferencias, es uno de los esfuerzos que se están haciendo en el sentido de ampliar el conocimiento y el número de personal capacitado e involucrado en el área de recursos genéticos.*

**Clara Goedert**
*Coordinadora Internacional del*
*Subprograma Recursos Genéticos*

# Indice


- Presentación, por C. Goedert ..... I
- Conservação da diversidade biológica, por B. F. de Souza Dias ..... 1
- Conservação de germoplasma vegetal "ex situ", por A. C. Candeira Valois ..... 7
- Princípios para conservação e uso de recursos genéticos, por E. A. Vilela Morales e A. C. Candeira Valois ..... 13
- Princípios genéticos para recursos genéticos, por E. A. Vilela Morales e A. C. Candeira Valois ..... 35
- Princípios de documentação para recursos genéticos vegetais, por E. Vilela Morales, J. Schmitt Monteiro, R. A. Mendes, J. N. Lemos Fonseca e R. Godoy ..... 49
- Conservação de germoplasma - semente no CENARGEN e Interface com os BAGs, por F. R. Ferreira ..... 69
- Aspectos práticos da coleta de germoplasma, por R. Fontes Vieira ..... 75
- Manejo da coleção de germoplasma - semente, por A. Rodrigues de Miranda ..... 85
- Formação e estrutura das sementes, por R. de Carvalho Cristo Martins ..... 93
- Fatores que afetam a qualidade das sementes, por F. Popinigis ..... 99
- Controle de qualidade fisiológica de sementes - germinação. Dormência e vigor, por R. Carmona. ..... 105
- Controle de qualidade sanitária do germoplasma - semente, por M. Gomes Rodrigues Faiad ..... 113
- Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias, por M. T. S. Eira ..... 119
- Métodos alternativos para conservação de germoplasma - semente, por R. da Cunha ..... 123
- Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal, por R. A. Mendes e M. de Goes ..... 129
- Conservação de germoplasma *in vitro* - Criopreservação, por M. de Goes e R. A. Mendes ..... 139
- Genebank management, por J. Toll.. ..... 143
- Curadores e curadorias no CENARGEN, por A. C. Guedes ..... 151
- Medidas legislativas no controle de doenças de plantas. Quarentena vegetal, por J. N. Lemos Fonseca ..... 155
- Lista de participantes ..... 161
- Lista de instructores ..... 163
- Nota del editor, por J. P. Puignau ..... 165

# Conservação da diversidade biológica

por Braulio F. de Souza Dias *

## O QUE É DIVERSIDADE BIOLÓGICA?

Biodiversidade refere-se à variedade de vida no planeta terra, incluindo: a variedade genética dentro das populações e espécies; a variedade de espécies da flora, da fauna e de micro-organismos; a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas; e a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos. Biodiversidade refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes categorias biológicas quanto à abundância relativa (equitabilidade) dessas categorias; e inclui variabilidade ao nível local (alfa diversidade), complementaridade biológica entre habitats (beta diversidade) e variabilidade entre paisagens (gama diversidade).

Biodiversidade, ou Diversidade Biológica, é uma das propriedades fundamentais da natureza, responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas, e fonte de imenso potencial de uso econômico. A biodiversidade é, também, a base para a estratégica indústria da biotecnologia. As funções ecológicas desempenhadas pela biodiversidade são ainda pouco compreendidas, muito embora considere-se que ela seja responsável pelos processos naturais e produtos fornecidos pelos ecossistemas e espécies que sustentam outras formas de vida e modificam a biosfera, tornando-a apropriada e segura para a vida.

A Convenção sobre Diversidade Biológica define:

- Diversidade biológica como "a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas".
- Ecossistema como "um complexo dinâmico de comunidades vegetais, animais, e de microorganismos e o seu meio inorgânico que interagem como uma unidade funcional".
- Espécie domesticada ou cultivada significa "espécie em cujo processo de evolução influiu o ser humano para atender suas necessidades".
- Habitat significa "o lugar ou tipo de local onde um organismo ou população ocorre naturalmente".
- Material genético significa "todo material de origem vegetal, animal, microbiana ou outra que contenha unidades funcionais de hereditariedade".
- Recursos biológicos compreende "recursos genéticos, organismos ou partes destes, população ou qualquer outro componente biótico de ecossistemas, de real ou potencial utilidade ou valor para a humanidade".-
- Recursos genéticos significa"material genético de valor real ou potencial".

## O QUE É CONSERVAÇÃO?

O Novo Dicionário da Língua Portuguesa, mais conhecido como Dicionário Aurélio, assim define: "Conservar é resguardar de dano, decadência, deterioração e prejuízo; é preservar e manter, é

* *Biólogo/Ph.D. em Zoologia; Coordenador Geral de Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal; Professor Adjunto do Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília; Pesquisador Titular da Divisão de Estudos Ecológicos do Cerrado da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.*

continuar a ter, é reter, é não se desfazer de; é defender e salvaguardar, é permanecer, ficar, continuar".

Robert Goodland em seu Glossário de Ecologia Brasileira definiu conservação, no contexto ecológico, como sendo "a proteção de recursos naturais renováveis e seu manejamento para utilização sustentada e de rendimento ótimo".

A Convenção sobre Diversidade Biológica define:

- Conservação "in situ" "como a conservação de ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus meios naturais e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos meios onde tenham desenvolvido suas propriedades características".
- Área protegida como "uma área definida geograficamente que é destinada, ou regulamentada, e administrada para alcançar objetivos específicos de conservação".
- Utilização sustentável como "a utilização de componentes da diversidade biológica de modo e em ritmo tais que não levem, no longo prazo, à diminuição da diversidade biológica, mantendo assim seu potencial para atender as necessidades e aspirações das gerações presentes e futuras".
- Conservação "ex situ" como "a conservação de componentes da diversidade biológica fora de seus habitats naturais".

## PORQUE CONSERVAR A DIVERSIDADE BIOLÓGICA?

Por três razões principais:

- Primeiro porque se acredita que a diversidade biológica seja uma das propriedades fundamentais da natureza, responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas.
- Segundo porque se acredita que a diversidade biológica representa um imenso potencial de uso econômico, em especial através da biotecnologia.
- Terceiro porque se acredita que a diversidade biológica esteja se deteriorando, inclusive com aumento da taxa de extinção de espécies, devido ao impacto das atividades antrópicas.

## QUAIS SÃO OS DETERMINANTES DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA?

- Produtividade (energia, água e nutrientes).
- Regime de perturbação (cósmica, tectônica, climática, biológica, antrópica).
- Fatores sócio-econômicos (usos da terra e urbanização/industrialização).

## A QUEM PERTENCE A DIVERSIDADE BIOLÓGICA?

As sociedades tradicionais/tribais consideravam e consideram os recursos biológicos como **propriedade coletiva**, de uso exclusivo de determinada comunidade e sujeito a regras rígidas de exploração.

O Direito Romano, base dos sistemas legais atuais dos países ocidentais, estabeleceu uma dicotomia básica entre plantas e animais:

- Os animais silvestres, por serem móveis, são considerados **res nullius**, ou seja objetos sem dono, que podem ser livremente apropriados por quem capturá-los.
- As plantas e os animais domésticos, por estarem presos à terra, são considerados como parte da propriedade imóvel (as terras) onde se localizam, sujeitando-se, portanto, ao regime de **propriedade privada**, consagrado nos códigos civis.

Esta dicotomia do Direito Romano foi incorporada, por exemplo, nas Ordenanças Filipinas, que regeram os países iberoamericanos durante o período colonial e, no caso do Brasil, durante o período imperial e da república velha. Posteriormente, estes preceitos foram incorporados nos códigos civis destes países (por exemplo o Código Civil brasileiro de 1916) e seus reflexos aparecem posteriormente nos códigos de caça e pesca, proteção à fauna, florestais e ambientais.

Em muitos países, os **direitos da propriedade privada são limitados** pela Constituição. A Constituição brasileira por exemplo, estabelece que a **função social da propriedade** é um dos princípios básicos da atividade econômica, e prevê que no caso da propriedade rural a função social é cumprida quando a propriedade atende, simultaneamente, segundo critérios e graus de exigência estabelecidos em lei, os seguintes requisitos (Artigo 186):

I. Aproveitando racional e adequado.

II. Utilização adequada dos recursos naturais disponíveis e preservação do meio ambiente.

III. Observância das disposições que regulam as relações de trabalho.

IV. Exploração que favoreça o bem-estar dos proprietários e dos trabalhadores.

Com base no princípio da função social, muitos países, como o Brasil, estabeleceram restrições ao uso da terra em propriedades rurais, privadas ou públicas, visando a proteção da vegetação, especialmente florestal. O Código Florestal Brasileiro (Lei 4.771), por exemplo, estabelece Áreas de Proteção Permanente e Reservas Florestais Legais, obrigando os proprietários a preservar e utilizar de forma sustentável, respectivamente, as florestas assim caracterizadas.

Alguns países caracterizam componentes da diversidade biológica como **propriedade do estado**, usando termos/conceitos como: bem público, domínio público, patrimônio nacional, patrimônio da união, riqueza nacional e soberania nacional. A legislação brasileira, por exemplo, assim caracteriza os seguintes componentes da diversidade biológica como bens do estado:

- O recursos naturais da Plataforma Continental e da Zona Econômica Exclusiva (Art. 20, Constituição Federal e Convenção sobre Direito do Mar).
- Os animais de quaisquer espécies, em qualquer fase de seu desenvolvimento e que vivem naturalmente fora do cativeiro, constituindo a fauna silvestre, bem como seus ninhos, abrigos e criadouros naturais são propriedade do Estado (Art. 1º, Lei 5.197).
- A Floresta Amazônica Brasileira, a Mata Atlântica, a Serra do Mar, o Pantanal Mato-Grossense e a Zona Costeira são patrimônio nacional, e sua utilização far-se-á, na forma da lei, dentro de condições que assegurem preservação do meio ambiente, inclusive quanto ao uso dos recursos naturais (Art. 225, Constituição Federal).

A Convenção sobre Diversidade Biológica reconhece o direito soberano das nações sobre a diversidade biológica, incluindo os recursos genéticos, encontrada nos territórios sob sua jurisdição.

Mais recentemente, observa-se algumas iniciativas internacionais visando estabelecer o regime de **propriedade internacional** ou **bem da humanidade**, como nos seguintes casos:

- Recursos Genéticos (International Undertaking for Plant Genetic Resources/FAO).

Infelizmente, tanto o regime de **res nullius** como o de **propriedade coletiva/bem do estado**, nas sociedades modernas, leva ao desperdício e ao uso não sustentável: **the tragedy of the Commons**.

## QUAIS SÃO OS INSTRUMENTOS DA CONSERVAÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA?

A Constituição Federal de 1988 (Capítulo VI/Artigo 225) e a Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6.938 de 1981/Artigos 2, 4 e 9) estabeleceram os seguintes **Instrumentos** para se alcançar os objetivos e condições estipuladas:

a) Padrões de Qualidade Ambiental (PNMA/Artigo 9/ item I e Artigo 4/item III).

b) Avaliação de Impactos Ambientais (PNMA/Artigo 9/item III).

c) Licenciamento e a Revisão (Controle) de Atividades efetiva ou potencialmente Poluidoras (PNMA/Artigo 9/item IV e Artigo 2/item V).

d) Incentivos à Produção e Instalação de Equipamentos e à Criação ou Absorção de Tecnologia, voltados para a Melhoria da Qualidade Ambiental, e ao Estudo e à Pesquisa de Tecnologias orientadas para o Uso Racional e Proteção dos Recursos Ambientais (PNMA/Artigo 9/item V; Artigo 2/item VI e Artigo 4/item IV).

e) Planejamento (racionalização) e fiscalização do Uso dos Recursos Ambientais (normas relativas ao uso e manejo dos recursos ambientais) (utilização racional) (PNMA/Artigo 2/itens II e III e Artigo 4/ itens III e VI).

f) Zoneamento Ambiental (e Zoneamento das Atividades potencial ou efetivamente Poluidoras) (definição de áreas prioritárias de ação governamental) (PNMA/Artigo 9/item II e Artigo 2/ item IX e Artigo 2/item V e Artigo 4/item 2).

g) Criação de Espaços Territoriais especialmente Protegidos (Unidades de Conservação) pelo Poder Público Federal, Estadual e Municipal, (preservação de áreas representativas dos ecossistemas) tais como ... (PNMA/Artigo 9/item VI e Artigo 2/item IV e Artigo 2/item IX e Artigo 4/item 2).

h) Imposição, ao Poluidor e ao Predador, da Obrigação de Recuperar e/ou Indenizar os Danos Causados e, ao Usuário, da Contribuição pela Utilização de Recursos Ambientais com fins Econômicos (Penalidade Disciplinares ou Compensatórias ao Não-Cumprimento das medidas necessárias à Preservação ou Correção da Degradação Ambiental) e (Recuperação de Áreas Degradadas) (PNMA/Artigo 4/item VII e Artigo 9/item IX e Artigo 2/item VIII.

i) Sistema Nacional de Informações sobre o Meio Ambiente (SINIMA) e Garantia da Prestação de Informações relativas ao Meio Ambiente, obrigando-se o Poder Público a produzí-las, quando inexistentes (PNMA/Artigo 9/itens VII e XI).

j) Relatório de Qualidade de Meio Ambiente (RQMA) (acompanhamento do estado da qualidade ambiental), a ser divulgado anualmente pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)(PNMA/Artigo9/item X e Artigo 2/item VII).

k) Educação Ambiental em todos os níveis de ensimo, inclusive a educação da comunidade objetivando capacitá-la para participação ativa na defesa do meio ambiente (difusão de tecnologias de manejo do meio ambiente, divulgação de dados e informações ambientais e formação de uma consciência pública sobre a necessidade de preservação da qualidade ambiental e do equilíbrio ecológico) (PNMA/Artigo 2/item X e Artigo 4/item V).

l) Cadastros Técnicos Federais de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental e de Atividades Potencialmente Poluidoras e/ou Utilizadoras dos Recursos Ambientais (PNMA/Artigo 9/itens VIII e XII).

## Unidades de Conservação e a Constituição Federal de 1988 e a Política Nacional do Meio Ambiente

A Constituição Federal de 1988 estabelece que a República Federativa do Brasil constitui-se em Estado Democrático de Direito, tendo como Fundamentos e Valores Supremos a Dignidade da Pessoa Humana, o Bem-Estar, o Desenvolvimento, a Justiça, a Segurança, a Cidadania, a Soberania, a Igualdade, a Libertade, o Pluralismo Político e os Valores Sociais do Trabalho e da Livre Iniciativa (CF/1988/Preâmbulo e Artigo 1º). E estipula que os Objetivos Fundamentais da República Federativa do Brasil são: construir uma Sociedade Livre, Justa e Solidária; garantir o Desenvolvimento Nacional; erradicar a Pobreza e a Marginalização e reduzir preconceitos de origem, raça, sexo, cor, idade e quaisquer outras formas de Discriminação (CF/ 1988/Artigo 3o). A Ordem Social (Título III/CF 1988) tem como objetivo o Bem-Estar Social e a Justiça Social (Artigo 193).

A Constituição Federal de 1988 estabelece que compete ao Governo, entre outros (Artigos 21 a 24):

a) Cuidar da Saúde Pública e promover o Saneamento Básico; combater a Pobreza &

Marginalização e promover a Defesa contra Calamidades Públicas.

b) Planejar a Ordenação do Território e o Desenvolvimento Econômico e Social; fomentar a Produção Agropecuária.

c) Proteger o Meio Ambiente e Paisagens Naturais Notáveis, preservar as Florestas, a Fauna e a Flora, e combater a Poluição.

d) Estabelecer condições de uso de recursos hídricos e exercício da garimpagem.

e) Legislar sobre águas, energia, recursos minerais, atividades nucleares, defesa do solo e dos recursos naturais, e conservação da natureza.

Em relação ao Meio Ambiente a Constituição Federal de 1988 (CF/Capítulo VI/Artigo 225) e a Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA/Lei 6.938 de 1981/ Artigos 2 e 4) estabelecem como objetivos maiores:

a) A proteção da Vida (PNMA).

b) A promoção da Sadia Qualidade (Dignidade) de Vida (CF e PNMA).

c) A promoção do Desenvolvimento Sócio-Econômico (PNMA).

d) A Defesa da Segurança Nacional (PNMA).

Para alcançar esses objetivos maiores, a Constituição Federal de 1988 (Capítulo VI/Artigo 225) e a Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6.938 de 1981/Artigos 2 e 4) estabelecem como condição necessária a manutenção:

a) Do Equilíbrio Ecológico (CF e PNMA).

b) Da Qualidade Ambiental (PNMA).

c) Da Sustentabilidade do Meio Ambiente/ Disponibilidade Permanente dos Recursos Ambientais (PNMA e CF: "defendê-lo e preservá-lo (o Meio Ambiente) para as presentes e futuras gerações").

d) Do Uso Comum (Coletivo) do Meio Ambiente (CF e PNMA).

Ao Governo Federal cumpre, com referência ao meio ambiente:

a) Defender e preservar, de forma ecologicamente equilibrada, o meio ambiente, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, para as presentes e futuras gerações (Constituição Federal/1988/Artigo 225).

b) Compatibilizar o desenvolvimento econômico-social com a proteção (preservação da qualidade) do meio ambiente e do equilíbrio ecológico, mantendo para tanto a fiscalização permanente dos recursos ambientais (Política Nacional do Meio Ambiente/ Lei 6.938/1981/Artigo 4o/item I/ Decreto 99.274/ 1990/Artigo 1o/item I).

c) Preservar, melhorar e recuperar a qualidade ambiental propícia à vida, visando assegurar, no País, condições ao desenvolvimento sócio-econômico, aos interesses da segurança nacional e à proteção da dignidade da vida humana (Política Nacional do Meio Ambiente/Lei 6.938/1981/Artigo 2o).

d) Assegurar e proteger o meio ambiente, enquanto patrimônio público, visando a manutenção do equilíbrio ecológico e o uso coletivo, entendendo-se por Meio Ambiente o conjunto de condições, leis, influências e interações de ordem física, química e biológica, que permite, abriga e rege a vida em todas as suas formas (Política Nacional do Meio Ambiente/Lei 6.938/1981/Artigo 2o/item I/ Artigo 3o/item I);

A Constituição Federal de 1988 (Capítulo VI/Artigo 225) e a Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6.938 de 1981/Artigos 2, 4 e 9) estabeleceram os **instrumentos** para se alcançar os objetivos e condições estipuladas.

Concluindo, a criação e manejo de Unidades de Conservação [espaços territoriais especialmente protegidos = áreas protegidas] é <u>um</u> dos instrumentos

de gestão ambiental previstos na Constituição Federal de 1988, na Política Nacional do Meio Ambiente (1981), na Convenção sobre Diversidade Biológica (1994), na Convenção para a Proteção da Flor da Fauna e das Belezas Cênicas Naturais dos Países da América (1948), no Código Florestal (Lei 4.771 de 1965) e no Código de Proteção à Fauna (Lei 5.197 de 1967). Enquanto instrumento da Política Nacional do Meio Ambiente, e de acordo com a Constituição Federal de 1988, as Unidades de ConservaÇão devem contribuir para o Equilíbrio Ecológico, a Qualidade Ambiental a Sustentabilidade do Meio Ambiente/Disponibilidade Permanente dos Recursos Ambientais e o Uso Comum (Coletivo) do Meio Ambiente, visando a proteção da Vida, a promoção da Sadia Qualidade (Dignidade) de Vida, a promoção do Desenvolvimento Sócio-Econômico, e a Defesa da Segurança Nacional, objetivos maiores estipulados pela Constituição Federal de 1988 e pela Política Nacional do Meio Ambiente.

## COMO FUNCIONA A ABORDAGEM CENTRADA EM ESPÉCIES?

- Restrições e proibições à coleta/captura.
- Restrições e proibições ao comércio internacional.
- Categorização e Listagens.
- Planos e programas de recuperação.
- Integração "in situ" e "ex situ".

## COMO FUNCIONA A ABORDAGEM CENTRADA EM ECOSSITEMAS?

- Estabelecimento e manejo de Unidades de Conservação públicas.
- Zoneamento Ecológico-econômico.
- Critérios Biogeográficos.
- Fragmentação e Biogeografia Insular.

# Conservação de germoplasma vegetal "ex situ"

por Afonso Celso Candeira Valois *

## INTRODUÇÃO

De uma maneira geral a conservação de germoplasma "ex situ" está inserida em um conjunto de importantes atividades que compõem o manejo e uso de recursos genéticos. Essas ações e esforços são assim considerados: a) prospecção e coleta; b) introdução, intercâmbio e quarentena; c) conservação "in situ" e "ex situ"; d) caracterização e avaliação e; e) documentação e informação. Todas essas atividades visam a utilização de germoplasma em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras áreas de pesquisas afins.

A conservação "ex situ" de germoplasma vegetal, entendida como sendo a manutenção do germoplasma fora do ambiente original e da comunidade à qual pertence, principalmente por ação antrópica, é a base para o bom uso do germoplasma, pois, é do sucesso dessa atividade que se vai assegurar a utilização dos acessos conservados em termos vantajosos. Essas coleções, conservadas sob várias formas e advindas do correto processo de enriquecimento, se constituem na base para a caracterização, avaliação, documentação e informação, visando ao emprego pelos usuários.

O presente trabalho apresenta uma visão geral do processo de conservação de germoplasma vegetal "ex situ", com ênfase na importância dessa atividade para o manejo e uso de recursos fitogenéticos.

* *Pesquisador da EMBRAPA/CENARGEN, Brasilia, DF, Brasil.*

## BIODIVERSIDADE, RECURSOS GENÉTICOS E CONSERVAÇÃO "EX SITU" DE GERMOPLASMA VEGETAL

A principal fonte do germoplasma a ser conservado é a biodiversidade, onde encontram-se os recursos genéticos de interesse, A biodiversidade ou diversidade biológica leva em consideração as espécies de plantas, animais e microorganismos e os ecossistemas aos quais pertencem, enquanto que os recursos genéticos envolvem a variabilidade de espécies de interesse econômico atual e potencial. Os recursos genéticos se constituem na integração entre a biodiversidade e o desenvolvimento.

O germoplasma, que compõe as coleções de recursos genéticos, é a base física do cabedal genético e reúne o conjunto de materiais hereditários de uma espécie. Na sua conservação são utilizadas amostras ou acessos que possuam representatividade genética da população original ou mesmo para representar um indivíduo para o caso de clone, por exemplo, onde são considerados o tamanho efetivo populacional e a freqüência de alelos. Na formação dos acessos para conservação deve haver o cuidado para que não sejam guardadas amostras com problemas de representatividade genética que descaracterizam os genótipos objeto do processo de conservação, com destaque para os seguintes condicionantes que causam a oscilação genética:

a) Efeito de afunilamento, que é a drástica redução do tamanho da amostra.

b) Efeito fundador, que acontece, quando a amostra original é feita a partir de pequeno número de indivíduos.

c) Efeito do pequeno tamanho da amostra, que ocorre quando o tamanho do acesso permanece pequeno ao longo de várias gerações.

As principais origens do germoplasma para conservação "ex situ" são as populações silvestres, linhagens preliminares e avançadas, cultivares primitivas e elites, raças ou ecótipos e materiais propagados vegetativamente. O conhecimento prévio da biologia reprodutiva das espécies dessas origens é de fundamental importância para a composição e tamanho do acesso a ser conservado. Assim, é importante a determinação se a espécie é autógama, intermediária ou se compõe uma população panmítica (alógama). Com isso será possível formar o acesso ideal para conservação "ex situ". Considerando a conservação de germoplasma-semente, tem sido apontado um número entre 1.500 a 2.000 sementes para amostras de populações autógamas e geneticamente homogêneas, ao passo que para plantas alógamas, embora se conheça a necessidade da utilização de número maior de sementes, ainda existe carência de pesquisas para compor um acesso representativo.

## CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA VEGETAL

Na conservação de germoplasma "ex situ" as amostras representativas ou acessos são constituídos por plantas, sementes, estacas, pólen, embriões, tecidos, células e DNA ou fragmentos.

Levando em consideração as espécies vegetais e a conservação na forma de sementes é importante determinar a longevidade quando essas são submetidas a baixas umidades e temperaturas subzero. Assim, três situações são apresentadas:

a) Sementes ortodoxas, que podem ser conservadas por longos períodos em condições de baixo grau de umidade (4 a 6%) e com temperaturas abaixo de zero, ao redor de -18° C (ex.: arroz e milho).

b) Sementes recalcitrantes, são aquelas que não suportam o armazenamento quando dessecadas para baixos teores de umidade, em níveis de temperatura subzero (ex.: seringueira e guaraná);e

c) Sementes denominadas de intermediárias, que só suportam baixas temperaturas quando dessecadas para um nível não inferior a 10 por cento de umidade (ex.: café e citros) ou que embora secas não suportam temperatura subzero (ex.: cumaru).

De acordo com essas características de sementes existem vários tipos de conservação de germoplasma vegetal "ex situ", com destaque para os seguintes:

a) Coleção de Base (COLBASE), que destina-se à conservação de acessos de germoplasma-semente a longo prazo (100 anos ou mais), com grau de umidade entre 4-6 por cento e temperatura variando de -18 a -20°C, ou mesmo em criopreservação a -196°C. Apesar de não se prestar para atender às rotinas de intercâmbio, permite que acessos sejam liberados para a substituição de amostras em outras coleções, ou mesmo para os procedimentos de regeneração que devem ser efetuados quando o poder germinativo estiver reduzido em torno de 85 por cento em relação ao inicialmente utilizado.

b) Coleção Ativa (COLATIVA), que conserva acessos a médio prazo (30 anos), em ambientes com temperatura acima de 0°C e abaixo de 15°C, e umidade relativa do ar em torno de 30 a 45 por cento. O germoplasma é mantido para demanda atual para cessão a programas afins e para a multiplicação, regeneração, caracterização ou avaliação.

c) Coleção de Trabalho, é mantida por curto prazo e geralmente está ligada a um programa de melhoramento genético.

d) Coleção a Campo, é mantida para aquelas espécies com sementes recalcitrantes, que não podem ser frigorificadas ou para aquelas de propagação vegetativa. Os acessos são conservados em bancos ativos de germoplasma.

e) Coleção "in vitro", que corresponde à conservação de células, órgãos e tecidos em meio-de-cultura de crescimento mínimo, tendo a vantagem de poder ser utilizado um grande número de acessos em

pequeno espaço físico, embora possa apresentar a descaracterização de amostras pelo aparecimento de variação somacional.

f) Coleção en criopreservação, que mantém o germoplasma conservado a -196°C (temperatura do nitrogênio líquido), praticamente paralisando a atividade metabólica dos acessos. Presta-se para o armazenamento de sementes, pólen e embriões, principalmente para aqueias espécies que produzem sementes recalcitrantes.

g) Coleção Nuclear, que visa estimular a utilização do germoplasma. Trata-se de uma coleção que corresponde a 10 por cento da coleção original, mas, com cerca de 80 por cento da representatividade genética de uma espécie e de seus parentes silvestres, com um mínimo de repetitividade. É capaz de substituir as COLATIVAS. O modelo da Coleção Nuclear pode ser empregado para uma eficaz ligação entre a conservação "in situ" e "ex situ".

h) Banco Genômico, que corresponde à crio-preservação de células, DNA e de seus fragmentos.

## CONSERVAÇÃO E DOMESTICAÇÃO

Em termos mundiais é bem pequeno o número de produtos agrícolas que entra com maior representatividade na dieta alimentar das populações. Apesar de existir um potencial expressivo de recursos genéticos oferecidos pela biodiversidade, a agricultura tradicional está na dependência do germoplasma de apenas 15 produtos com destaque para arroz, trigo, milho, cevada e sorgo, que abrangem cerca de 50 por cento de todo o alimento produzido no mundo, o que de certo modo representa uma ameaça para a segurança alimentar da humanidade.

Isso conduz a necessidade de que novos produtos entrem na cadeia alimentar, principalmente as espécies autóctones, que só no Brasil representam cerca de 55 mil espécies de plantas superiores. Nesse pais, algo em torno de 80 por cento dos principais produtos de origem vegetal consumidos são exóticos, o que reforça a necessidade do fortalecimento da aplicação dos processos de conservação e domesticação para a eficiente e eficaz utilização do germoplasma autóctone.

Nesse contexto, a conservação de germoplasma vegetal "ex situ" tem o grande compromisso com a humanidade de participar do conjunto de atividades técnicas direcionadas ao manejo e uso de recursos genéticos, visando aumentar a oferta de produtos a serem demandados para o consumo humano.

A domesticação é um processo continuo e deve considerar o recurso genético desde as condições "in situ", passando pelo adequado manejo na conservação "ex situ", observando os aspectos agronômico, industrial e sócio-econômico, dentre outros. Um dos grandes resultados alcançados pela domesticação de plantas ocorreu com o dendê (*Elaeis guineensis*), que após cerca de 80 anos de manejo e uso do germoplasma passou da produção de 300 kg de óleo por hectare para um rendimento superior a 4.000 kg/ha.

## LIMITAÇÕES DA CONSERVAÇÃO "EX SITU" DE GERMOPLASMA VEGETAL

De acordo com o tipo de coleção de acessos de germoplasma, são observadas limitações de ordem técnica e econômica que conduzem á necessidade do encontro de soluções alternativas. Ao nível mundial existem cerca de 3.200.000 acessos de plantas conservados nos mais variados tipos, cuja estratégia e tática de conservação devem ser levadas em conta visando a maximização da utilização.

Dentre as alterações de ordem técnica e econômica que ocorrem no processo de conservação "ex situ", estão as seguintes:

a) Instabilidade genética que pode ocorrer em sementes conservadas por longo e médio período, na COLBASE e COLATIVAS, respectivamente.

b) Variação somacional na conservação "in vitro", que se por um lado pode ser útil para a seleção de genótipos superiores, por outro descaracteriza os acessos originalmente armazenados.

Além desses impedimentos que podem ser apresentados pelos tipos citados de coleções, é a conservação a campo que apresenta o maior número de limitações, com destaque para os seguintes:

a) Ocupação de áreas extensas por períodos longos:

b) Necessidade da disponibilidade de recursos humanos, financeiros e materiais para a implantação, condução e manutenção.

c) Necessidade de duplicação das coleções para evitar riscos advindos de fatores bióticos e abióticos.

d) Longos períodos para as amostras expressarem suas características genéticas.

e) Colocação dos acessos de germoplasma em ambientes não compatíveis com a normal expressão de suas características fenotípicas.

Como alternativas para a superação de algumas dessas barreiras, podem ser citadas as seguintes:

a) Identificação de características utilitárias do germoplasma na fase de "seedlings" ou ao nível celular.

b) Conservação as populações representativas sob procedimentos "in situ", em bancos genômicos, as amostras populacionais correspondentes.

c) Uso da coleção nuclear na integração entre a coleção "in situ" e "ex situ".

Ainda dentro do correto manejo do germoplasma para evitar o aparecimento de condicionantes, merece destaque a regeneração de acessos da COLBASE e COLATIVA, bem como, a própria regeneração de plantas originárias do processo de criopreservação. No primeiro caso, considerando se a espécie é autógama ou alógama, deve-se utilizar o método mais adequado de regeneração com os seguintes cuidados: a) usar o tamanho ideal da amostra de sementes para evitar a endogamia, perda de genes e oscilação genética; b) evitar a contaminação dos acessos por grão de pólen oriundo de outras origens; c) não efetuar o plantio dos acessos em condições ecológicas onde estes não estejam adaptados; e d) armazenar a quantidade ideal de sementes com qualidade, para evitar alterações genéticas danosas quando do uso do germoplasma. Para a formação do acesso regenerado o ideal é que sejam tomadas amostras de sementes advindas do controle do número de gametas masculinos e femininos, podendo ainda, ser usado o controle de apenas do número de gametas femininos, de modo que cada genótipo contribua com o mesmo número de sementes. O importante é que se leve em consideração o tamanho efetivo, que em sua essência depende do número de indivíduos que contribui igualmente para formar a próxima geração, considerando, ainda, a freqüência de alelos.

Quanto à regeneração de plantas oriundas da criopreservação, trata-se de um proceso ainda carente de pesquisas, apesar de que alguns resultados promissores já tenham sido obtidos para determinadas espécies.

## CURADORIA, DOCUMENTAÇÃO E INFORMAÇÃO

A organização do processo de conservação de germoplasma vegetal "ex situ" inclui o estabelecimento de um bom sistema de curadoria, documentação e informação visando a tornar os acessos disponíveis para uso.

A curadoria de germoplasma deve estar preparada para atender demandas de recursos genético e ser composta por profissionais responsáveis por germoplasma de produto ou grupo de produtos, preferencialmente melhoristas, pertencentes a instituições especializadas. Pode ser organizada de modo a ter uma gerência centralizada em conjunto com curadores e curadores adjuntos, além de possuir curadores de bancos ativos de germoplasma localizados nas áreas de estabelecimento das respectivas coleções. As ações de curadoria relacionadas com a conservação "ex situ", de uma maneira geral inclui os seguintes aspectos:

a) Levantamento da origem evolução, processo de domesticação e distribuição das espécies de

interesse, além da estimação da diversidade genética potencial oferecida pelo conjunto gênico, bem como, a variabilidade genética disponível das espécies de interesse.

b) Definição de parâmetros, procedimentos e metodologias para a conservação de germoplasma, quanto à amostragem para a multiplicação inicial, armazenamento e regeneração dos acessos; estabilidade genética dos acessos conservados; influência de proteínas, lipídios e prolina na longevidade dos acessos conservados; técnicas alternativas de conservação "ex situ"; além da definição de coleções nucleares como estratégia para estimular a utilização do germoplasma.

A documentação e a informação são fatores atuantes do sistema de curadoria para o manejo e uso de recursos genéticos, sendo que para o caso específico da conservação "ex situ" apresentam as seguintes atividades técnicas:

a) Estabelecer sistemas integrados de informação de recursos genéticos com base de dados sobre a origem e características dos acessos, tecnologias disponíveis, pesquisas, especialistas e referências bibliográficas relacionadas con recursos genéticos.

b) Transferência de tecnologia, elaboração e publicação de inventários e catálogos de germoplasma treinamento de pessoal, reuniões técnicas e interação com setores públicos e privados para o fortalecimento institucional.

## LITERATURA CONSULTADA

LLERAS, E & CORADIN, L. 1985. Palmeras nativas como oleaginosas: situación actual y perspectivas para América Latina. In: Seminário-Taller sobre oleaginosas promisoras. Informe. Bogotá. p. 92-143.

NASS, L.L.; PELLICANO, I.J. & VALOIS, A.C.C. 1993. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. Brazil J. Genetics, v. 16, n. 4, p. 983-988.

VALOIS, A.C.C. Recursos genéticos de palmeiras. In: Anais do Primeiro Simpósio Internacional sobre Palmeiras Ornamentais. Jaboticabal. 1993. Inédito.

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C. & COSTA, I.R.S. 1992. Core collections for genebanks with limited resources. In: IBPGR. International Workshop on Core Collections of Plant Germplasm. Brasília. 20p. Inédito.

--------; VALOIS, A.C.C. 1994. Princípios de recursos genéticos: proposta para uma sistemática. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 56 p. Inédito.

--------; CÉSAR, J. & VALOIS, A.C.C. 1994. Recursos genéticos autóctones, enfoque sistêmico para seu uso no desenvolvimento sustentável. EMBRAPA-CENARGEN, 37p. Inédito.

# Princípios para conservação e uso de recursos genéticos

por Eduardo A. Vilela Morales e Afonso C. Candeira Valois *

## INTRODUÇÃO

Embora a conservação da diversidade genética tenha sido uma preocupação mundial durante as últimas décadas, os elevados níveis de erosão genética que vem ocorrendo, na natureza e nos bancos de germoplasma e ao mesmo tempo o potencial oferecido pelas modernas tecnologias apresentam um cenário com potencial de oferecer retornos sócio-econômicos para a sociedade, porém com uma série de barreiras que necessitam ser superadás para tanto conservar adequadamente, como utilizar a variação genética existente.

Ainda, com o objetivo de estabelecer ações pro-ativas para recursos genéticos, pode-se afirmar que entre os aspectos mais importantes a considerar na organização de coleções de germoplasma, os seguintes apresentam destaque: 1) as coleções devem possuir o máximo da diversidade genética existente (Breese, 1989); 2) os procedimentos de coleta e de conservação de germoplasma devem ser estruturados sob um enfoque genético-ecológico (Breese, 1989); e 3) as amostras populacionais utilizadas para coleta e regeneração do germoplasma devem ser estabelecidas considerando-se o tamanho efetivo populacional e a freqüência alelica (Vencosvky, 1986).

Assim, no planejamento para organizar coleções de germoplasma e sistemas de recursos genéticos é importante considerar relevante o enfoque sistémico a ser considerado no estabelecimento de prioridades (Vilela-Morales **et al.**, 1992). Este enfoque deve considerar tanto as prioridades para conservação de germoplasma, em geral muito defendidas pelos conservacionistas, ambientalistas e curadores de germoplasma, mas também prioridades relacionadas com o uso do germoplasma, geralmente propostas pelos usuários, com destaque para os geneticistas e melhoristas. Assim enquanto os melhoristas tem utilizado o germoplasma para organizar suas coleções de trabalho, com níveis de variação genética adequados para solucionar aspectos pontuais da pesquisa e geralmente constituída por um reduzido número de acessos de importância reconhecida (mutantes, linhagens, estoques genéticos, cultivares, elite, etc.), os conservacionistas e curadores de germoplasma tem defendido a organização de coleções de germoplasma com o máximo de diversidade genética.

Na prática, os melhoristas considerem que os recursos genéticos são estratégicos e devem ser apoiados prioritariamente, mas continuam mantendo e somente utilizando suas coleções de trabalho (Nass **et al.**, 1992). Pior ainda, esta situação é tão acentuada que embora apoiando o papel estratégico do germoplasma muitos melhoristas reconhecem ter pouco interesse pelo material disponível nos bancos de germoplasma (Peeters, 1984; Smith & Duvick, 1989). De fato, a utilização do germoplasma nos programas de melhoramento, têm apresentado valores baixos em nível mundial, em torno de 2 por cento, e geralmente relacionados com uma mínima porção do genoma (Gill, 1989; Salhuana, 1985). Embora estes valores tenham aumentado até 8 por cento para o caso da pesquisa com olerícolas em Taiwan (Tay, 1988), tem sido afirmado, e provavelmente também seja opinião de muitos administradores, que o baixo nível de utilização do germoplasma não justifica os elevados

* *Pesquisadores da EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, DF, Brasil.*

custos operacionais apresentados pelos bancos de germoplasma e principalmente o enfraquecimento que provocam nos magros orçamentos destinados aos programas de pesquisa agrícola nacionais (Lantican, 1988).

Apesar desta situação, a literatura identifica não somente o potencial utilitário oferecido pelo germoplasma, mas uma clara demanda por variabilidade genética para fundamentar atividades científico-tecnológicas e programas de desenvolvimento Duvick, 1984; Nass **et al.**, 1992; e Vilela-Morales **et al.**, 1992). Entretanto, existe uma aparentemente inadequação entre os recursos oferecidos pelas coleções de germoplasma e a demanda gerada pelos usuários, principalmente em relação aos seguintes aspectos:

- Falta de informação sobre fatores bióticos e abióticos que afetam o germoplasma.
- Baixo nível de informações sobre o germoplasma mantido nas coleções, principalmente em relação a características utilitárias.
- Custos elevados e dificuldade institucional para proceder a caracterização e avaliação do germoplasma.
- Dificuldade para obter o germoplasma devido a distância, entraves burocráticos ou procedimentos de quarentena inadequados.

De fato, os programas de recursos genéticos não devem ser ações isoladas e reativas, mas ao contrario devem ser estruturados para torna-los pro-ativos e intimamente integrados com os programas científicos e tecnológicos de interesse nacional, principalmente com aqueles relacionados com o melhoramento genético e a conservação ambiental. Esta situação está claramente identificada com uma forte demanda por coleções estruturadas de germoplasma, onde seja possível de forma rápida e organizada recuperar caracteres qualitativos e quantitativos.

Assim, embora um sistema de recursos genéticos deve considerar estratégico a disponibilidade de uma coleção de germoplasma com o máximo da variação genética existente, é também importante que mantenha uma coleção atrativa para os usuários, conseqüentemente possuindo os seguintes requisitos:

1. Manter os acessos de forma estruturada, em agrupamentos compatíveis para atender a demanda gerada pela pesquisa e tecnologia.
2. Conservar os acessos caracterizados e avaliados.
3. Possuir agrupamentos para características de adaptação ambiental.
4. Manter estoques genéticos, mutantes e linhagens de interesse.
5. Possuir tamanho mínimo como estratégia para estimular sua utilização.
6. Manter características utilitárias que permitam substituir ou complementar as coleções de trabalho e ao mesmo tempo estimular os usuários a considera-la como estrutura integrante de suas atividades.

## CONSERVAÇÃO X PRESERVAÇÃO

A variação genética pode ser mantida sob diferentes sistemas e metodologias. Jenkins (1988) considera como "elemento de diversidade" qualquer estrutura desde uma população até um ecossistema. Todavia, entre as metodologias com mais destaque para recursos genéticos estão as **reservas genéticas** para conservação da diversidade genética "in situ" e as **coleções de germoplasma** para conservação da variabilidade genética "ex situ".

Embora os termos **conservação** e **preservação** venham sendo bastante utilizados por diferentes instituições é importante que sejam bem diferenciados. Frankel & Soule (1981) tem proposto: **conservação** para indicar políticas e programas para manutenção a longo prazo de comunidades sob condições potenciais para uma continua evolução, e **preservação** para indicar a manutenção de indivíduos ou grupos sem o efeito da evolução.

A reunião "World Conservation Strategy", promovida pela International Union for the Conservation of

Nature and Natural Resources - IUCN (FAO, 1984), definiu conservação como sendo: o manejo da biosfera pelo homem de maneira a produzir o maior benefício sustentável para as gerações presentes enquanto é mantido seu potencial para atender as necessidades e aspirações das gerações futuras, através de ações positivas que incluem preservação, manutenção, utilização sustentável, restauração e melhoramento do ambiente natural.

Recentemente, a Convenção sobre Diversidade Biológica (UNEP, 1992) estabeleceu: a) **conservação** "in situ", como sendo a conservação de ecossistemas e "habitats" naturais e a manutenção e recuperação de população viáveis de espécies em seus meios naturais e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas nos meios onde tenham desenvolvido suas propriedades características; e b) **conservação** "ex situ", como sendo a conservação de componentes da diversidade biológica fora de seus "habitats" naturais.

A FAO (1984), tem considerado **preservação** como sendo um aspecto da **conservação** pelo qual amostras de populações de recursos genéticos são mantidas através de processos isolados de manutenção em ambientes livres da ação humana que possa provocar mudanças genéticas. O processo de conservação pode ser "in situ" quando parte ou toda a população original é mantida em seu meio ambiente natural ou "ex situ" quando amostras destas populações são mantidas sob condições controladas, como por exemplo de criopreservação. Posteriormente, a FAO (Henson, 1992; Kemp, **et al.** 1992), adotou o termo conservação de recursos genéticos em ambientes diferentes daqueles onde ocorrem naturalmente (**"off site"**), e conservação "in situ", como um método de conservação dentro do ambiente de ocorrência natural (**"in site"**).

O IBPGR (1991), também utiliza o termo **conservação** para ambas as situações: conservação "in situ" como a manutenção continuada de uma população na comunidade à qual pertence e dentro do ambiente a que está adaptada, e conservação "ex situ", como a manutenção de espécies em habitats diferentes daqueles aos quais estão adaptadas. Hoyt (1991) considera que somente as espécies silvestres podem ser candidatas para conservação "in situ", uma vez que somente elas vivem em comunidades naturais. Todavia, a conservação "on farm" é uma alternativa que viabiliza a conservação de espécies animais dentro de seu "habitat" natural, embora sejam submetidas a práticas de manejo.

Patemiani e Goodman (1977) tem identificado barreiras muito expressivas que dificultam a conservação de germoplasma, como: a) requerimentos elevados de instalações, equipamentos e mão de obra para manter as coleções; b) tamanho inadequado das amostras populacionais para minimizar o efeito da endogamia, perda de genes, oscilação genética e contaminação causada pela migração de alelos; c) perda de acessos com baixo nível de adaptação; e d) quantidade de amostras em número inadequados para atender a demanda da pesquisa. Como conseqüência desta situação e com a objetivo de estabelecer um número menor de acessos na coleção, estes autores recomendam que seja utilizada, como metodologia alternativa, o estabelecimento e manutenção de **compostos** ou **populações sintéticas**, organizadas pela reunião de acessos diferentes mas com uma ou mais características comuns.

Esta alternativa é importante ao levar-se em conta as dificuldades inerentes à manutenção de coleções de germoplasma e às vantagens de agrupar acessos com características semelhantes. Embora os compostos possam ser utilizados como formas alternativas para diminuir o número de acessos na coleção, Frankel (1970), Marshall & Brown (1975) e Brown (1989a), recomendam a conservação separada dos acessos como uma metodologia eficiente para manter a variação genética, uma vez que esta prática diminue alterações expressivas nas freqüências alelicas e a perda das informações sobre a origem de cada acesso, que não poder ser evitada nas populações sintéticas.

Em relação aos critérios para estabelecer prioridades para conservação da diversidade genética autóctone, são de especial interesse as linhas

consideradas por Mariante (1992b) na conservação de germoplasma animal:

1) A proposta de Brooke & Ryder que sugere cinco categorias fundamentadas no número e grau de decréscimo populacional: a) com risco; b) vulnerável; c) raro; d) sem perigo; e e) não determinado.

2) A proposta de Maijala, que considera os conceitos definidos pela International Union for the Conservation of Nature (IUCN), sobre o grau de risco de extinção das espécies silvestres:

   - Extinta ("extinct"), quando não encontrada em estado silvestre nos últimos 50 anos.
   - Com risco ("endangered"), quando apresenta risco de extinção se os fatores causais continuam a operar.
   - Vulnerável ("vulnerable"), quando a espécie apresenta forte tendência de tornar-se "com risco" em futuro próximo se os fatores causais continuam a operar.
   - Rara ("rare"), quando apresenta população pequena e com tendência a mudar para "com risco".
   - Indeterminada ("indeterminate"), quando se sabe que pode ser classificada como "com risco", vulnerável ou rara", mas não existe suficiente informação.
   - Não conhecida ("insuficiently known"), quando existem suspeitas de correr risco, mas sem possibilidade de ser adequadamente classificada por falta de informação.
   - Fora de perigo ("out of danger"), para situações "sem risco", mas que inicialmente foram catalogadas como "com risco" ou "vulnerável".

3) Os critérios sugeridos por Bodo, sobre o grau de risco de extinção das espécies de animais domésticos:

   - Extinta, quando não há possibilidade de restaurar a população.
   - Crítica ou estado crítico, quando a população está próxima a extinção (nesta situação o primeiro passo é aumentar o tamanho da população embora a variabilidade genética seja drasticamente reduzida).
   - Com risco, quando uma raça está com risco eminente de extinção por possuir um tamanho populacional inadequado para prevenir perdas genéticas no futuro.
   - Insegura ou estado inseguro, quando o número de animais está diminuindo.
   - Vulnerável, quando raça está sendo submetida a situações de desvantagem para sua existência.
   - Estado normal, quando a população não esta com perigo de extinção, pode-se reproduzir sem perdas genéticas e não ocorrem aparentes alterações no tamanho da população.

De maneira geral, a conservação de germoplasma de animais, vegetais e microrganismos pode ser justificada por raciocínio semelhante àquele utilizado por Simon (1984) para o germoplasma animal:

- Manter amostras de germoplasma como populações de reserva para sobrepassar possíveis limites de seleção apresentados pelos programas de melhoramento genético e pelas condições ambientais.
- Manter a variabilidade genética e a flexibilidade existentes para demandas futuras ainda desconhecidas.
- Manter a variabilidade genética existe e necessária para a produção sob condições desfavoráveis.
- Permitir um melhor conhecimento de todos os aspectos da biologia animal (evolução, domesticação e seleção).
- Manter linhagens, variedades e raças domésticas e silvestres, como uma expressão da herança cultural, educacional e emocional da humanidade.

Pode-se afirmar que a conservação de recursos genéticos são ações pro-ativas estabelecidas para resgatar e manter disponível uma das formas do potencial utilitário oferecido pela biodiversidade, sua

diversidade genética. Todavia, a conservação da biodiversidade requer uma abordagem holistica, conseqüentemente um elevado nível de conhecimento para um grande número de disciplinas e em uma escala nunca antes vista (CGIAR, 1992b). Sua importância esta associada à disponibilidade de tecnologia modernas para otimizar a utilização de características genéticas desejáveis, por exemplo o uso de microorganismos para produzir insumos de forma mais eficiente ou a utilização de características desejáveis, como tolerância à salinidade, frio, calor, patógenos e pragas, etc., através de obtenção organismos transgênicos.

## BANCOS E COLEÇÕES DE GERMOPLASMA

Enquanto na conservação da diversidade genética são utilizadas as comunidades e suas populações, na conservação da variabilidade genética devem ser utilizadas amostras populacionais representativas ou acessos. Embora estas amostras possam ser constituídas por diferentes estruturas orgânicas, como: plantas, animais, sementes, esporos, cepas, estirpes, estacas, pólen, sêmen, óvulos, embriões, tecidos e células, complementadas pela conservação de DNA ou seus fragmentos, sua organização e representatividade deve ser estabelecida levando-se em conta os princípios relacionados com o tamanho efetivo populacional e a freqüência alelica a ser considerada.

Dentro das coleções relacionadas com a conservação da diversidade genética, o IBPGR (1991) consider: a) **Coleção de Germoplasma**, para indicar a coleção que mantém genotipos, genes ou alelos de uma espécie em particular, obtidos em fontes ou locais ecogeográficos diferentes, organizados em estruturas adequadas para promover sua conservação e utilizados como fonte de material genético para os trabalhos do melhoramento genético; e b) **Coleção de recursos genéticos vegetais**, para indicar uma coleção que mantém acessos da espécie de interesse e das espécies silvestres relacionadas.

A denominação **Banco de genes** tem sido adotada pelo IBPGR (1991) para indicar a estrutura ou local do sistema de recursos genéticos onde os **genotipos** são conservados. Esta denominação difere de **Banco genómico**, que tem sido utilizada para designar a estrutura física dedicada à conservação de DNA e seus fragmentos (Puga **et al.**, 1991), embora possa ser considerada como uma forma alternativa para a expressão **Banco de germoplasma**, aplicada à estrutura física onde as coleções de germoplasma são conservadas na forma de células, sementes ou plantas (Puga **et al.**, 1991). Nos bancos de germoplasma, além dos procedimentos de conservação e preservação da variabilidade genética dos acessos, são realizados procedimentos de multiplicação inicial, regeneração e de multiplicação para aumentar o número de amostras disponíveis.

No estabelecimento de uma sistemática para conservação do germoplasma é fundamental considerar as seguintes estruturas:

### Coleção de base (COLBASE)

a. Dedicada a conservar e preferencialmente preservar o germoplasma através do uso de procedimentos para conservação a longo prazo e a utilização de processos de frigorificação, com umidade relativa entre 4 e 6 por cento e temperatura entre -18 e -20°C, ou de criopreservação, com temperatura a -196°C.

b. Sua estrutura está definida para liberar amostras de germoplasma para realizar os procedimentos de multiplicação inicial ou de regeneração. Adicionalmente, esta coleção não deve ser utilizada para atender rotinas de intercâmbio mas somente para suprir com amostras consistentes as coleções dedicadas ao atendimento dos procedimentos de intercâmbios por ocasião em que seja verificada a descaracterização genética dos acessos.

c. Constitue a principal fonte de variabilidade genética para a espécie de interesse, por incluir tanto os acessos de interesse científico, tecnológico, sócio-econômico e cultural de interesse para a demanda atual, como também aqueles outros que embora não apresentem características de uso imediato

poderão ser considerados valiosos no futuro. Conseqüentemente, deve ser considerada como uma estrutura estratégica e de "segurança nacional".

d. Embora apresente diferentes graus de **redundância genética**, desde duplicação de parte da informação genética até completa duplicação de acessos, a eliminação de acessos somente deve ser realizada quando o estado de duplicação tiver sido confirmado através de procedimentos de caracterização e avaliação. O valor do germoplasma mantido na COLBASE é tão importante, que mesmo em situações extremas, como na perda de sua viabilidade, seu descarte não é recomendável, sendo preferível manter algumas amostras à espera do desenvolvimento de novas técnicas que permitam o resgate e a utilização integral ou parcial de seu material hereditário, como são os procedimentos biotecnológicos utilizados para comparar seqüências gênicas de organismos preservados ou de fósseis (Giannasi, 1992).

**Coleção ativa (COLATIVA)**

a. Conserva amostras de acessos de germoplasma utilizando procedimentos para conservação a médio prazo, com temperaturas acima de zero e abaixo de 15°C e umidade relativa entre 3 e 7 por cento.

b. Mantém germoplasma com demanda atual, em multiplicação inicial, regeneração, caracterização ou avaliação. Embora seu número de acessos possa aproximarse daqueles mantidos na COLBASE, a variação genética conservada sempre será menor que a mantida naquela outra coleção.

c. Os procedimentos de incorporação e descarte de acessos são executados continuamente, tornando variável a quantidade de acessos disponíveis na coleção. O descarte somente é procedido quando os acessos a descartar já estão incluídos na COLBASE.

d. A estrutura física que conserva a COLATIVA tem sido denominada **Banco Ativo de Germoplasma** (BAG).

Na conservação de germoplasma na forma de sementes deve-se prestar atenção a suas características fisiológicas que afetam sua longevidade quando submetidas a níveis baixos de umidade e a temperaturas abaixo de zero (IBPGR, 1991), como: a) **sementes ortodoxas**, que permitem frigorificação por longos períodos sob condições de baixa umidade e com temperaturas abaixo de zero, em torno de -18°C; e b) **sementes recalcitrantes**, que não suportam condições de armazenamento sob baixas temperaturas, devendo serem conservadas a campo, "in vivo", junto com o germoplasma clonal ou de progênies.

Embora o custo para implantação da COLBASE seja elevado, os procedimentos definidos para conservação a longo prazo permitem manter a integridade genética dos acessos sob conservação, além de oferecer custos operacionais finais menores que aquelas coleções que mantém procedimentos com níveis intensos de multiplicação ou regeneração dos acessos. Todavia, embora o germoplasma mantido na COLBASE seja regenerado a períodos mais espaçados, a descaracterização dos acessos ocorre de forma mais lenta que nas COLATIVAS, onde o germoplasma é submetido multiplicações mais freqüentes e, conseqüentemente, necessitam de verificações periódicas mais freqüentes de suas características genéticas.

Para o caso de acessos de propagação vegetativa, como frutíferas, seringueira, cacau, forrageiras, etc., é recomendável que seja estudado o estabelecida uma sistemática para manter a COLATIVA no campo junta à **Coleção de Trabalho** do melhorista, programa ou instituição, enquanto que a COLBASE poderá ser dedicada a manter os acessos sob procedimentos "in vitro", como cultura de meristemas e embriões ou crioperservação de células, embriões ou tecidos.

Embora as coleções de germoplasma possam estar localizadas junto às **Coleções de trabalho** dos melhoristas ou dos programas de ciência e tecnologia, nunca devem ser confundidas com aquelas. De fato, as coleções de trabalho geralmente são de uso e responsabilidade de pesquisadores ou dos programas e as amostras por elas distribuídas estão

dimensionadas para dar suporte ao estabelecimento ou condução de experimentos. No caso destas coleções serem descontinuadas, amostras de seus acessos devem ser enviados para a COLBASE. As coleções de transcender aos interesses específicos de uma instituição as amostras por elas distribuídas geralmente devem ser submetidas a procedimentos de multiplicação antes de permitir sua plena utilização.

A COLBASE somente deve ser utilizada como fonte de acessos para a COLATIVA e esta por sua vez como fonte imediata para as coleções de trabalho. Esta estratégia permitirá que seja mantida uma baixa intensidade de regeneração da COLBASE e possivelmente baixos níveis de alterações genéticas nos acessos nela conservados, uma vez que estas alterações, provocadas pela seleção natural ou a oscilação genética, ocorrem com mais intensidade nas coleções onde o germplasma é regenerado com maior freqüência, como é o caso das COLATIVAS e principalmente das Coleções de Trabalho.

Todo acessos conservado na COLBASE na forma de sementes deve ser submetido a procedimentos de regeneração quando sua viabilidade estiver abaixo de 85 por cento do valor mínimo esperado (IBPGR, 1976), ou estabelecido para a espécie e para procedimentos de multiplicação, com metodologias semelhantes aos de regeneração, quando houver necessidade de aumentar o número de amostras disponíveis. Situação semelhante deve ser adotada para os acessos conservados na COLATIVA. Do ponto de vista estratégico é recomendável estabelecer uma COLBASE nacional para cada gênero ou grupo de gêneros afins e nela conservar amostras de todos os acessos mantidos nas diferentes coleções existentes no país. Ao mesmo tempo, toda COLBASE, observando-se os mesmos procedimentos, deve ser duplicada em pelo menos uma outra instituição ou localidade. É recomendável também, que todo o germoplasma que integra o sistema nacional de recursos genéticos seja considerado **material estratégico** de interesse para a sociedade atual e para as futuras gerações, devendo por isto ser considerado **Patrimônio Nacional**.

Torna-se desejável que todo acesso obtido através de procedimentos de coleta ou intercâmbio seja sistematicamente incluído na COLBASE, somente deixando-se na COLATIVA amostras de acessos com interesse para uso atual ou potencial. É também importante que a cessão de amostras do germoplasma em processo de incorporação somente seja procedida após a obtenção do número de amostras necessárias para sua inclusão na COLBASE, previamente definido para a espécie. Com o objetivo de atender situações incomuns e evitar atrasos nos programas de atividades, acessos ainda não incorporados à COLBASE, desde que liberados pela inspeção sanitária, poderão ser cedidos desde que seja estabelecido com o usuário um compromisso de multiplicação inicial e o envio do número de amostras para permitir sua inclusão na COLBASE.

**Coleção nuclear (CORE)**

O uso do germoplasma poderá ser dificultado quando os acessos desejados estão na COLBASE, não se dispõe de uma quantidade extra de amostras e o germoplasma desejado somente estará disponível quando submetido a um processo prévio de multiplicação. Este entrave poderá ser superado através do estabelecimento de uma **Coleção Nuclear** ou **"Core Collection" (CORE)**, organizada tanto para melhor representar a variabilidade genética disponível, como para estimular a utilização do germoplasma. De fato, a estrutura desta coleção poderá permitir a representação de 70-80 por cento da variação genética da coleção em torno de 10 por cento dos seus acessos (Brown, 1989a, b). Em relação à representação dos alelos presentes nas populações, Brown (1989a) considera quatro situações: 1) alelos comuns localizados; 2) alelos raros localizados; 3) alelos comuns dispersos; e 4) alelos raros dispersos. Este autor, considerando os acessos como amostras populacionais, recomenda para as três primeiras situações, fundamentando-se na distribuição dos **"alelos neutros"**, que sua representação na CORE seja feita através da alocação de 10 por cento do total de acessos da coleção, embora contendo pelo menos 3.000 acessos por espécie. Este autor considera que na representação dos alelos comuns, cada acesso

poder ser considerado como iuma amostra ao acaso da população, inclusive com a possibilidade dos alelos raros estar presentes.

Ao comparar-se os coriceitos da CORE com a COLATIVA, a primeira apresenta pelo menos três pontos mais favoráveis, como são: 1) níveis menores de duplicação e redurıdância genética que as COLATIVAs; 2) níveis mais expressivos de acessos com inıformações sobre identificação ou passaporte, e de caracterização e avaliação que as COLATIVAs e conseqüentemente maiores chances do germoplasma ser utilizado. Por outro lado, embora seja organizada uma CORE contiriua claro o papel estratégico da COLBASE como repositório maior da variabilidade genética existente. Todavia, em uma situação de total crise institucional que impossibilite a conservação de coleções de germoplasma, pelo menos a CORE deveria ser conservada.

Todavia, embora o conceito da CORE possa ser utilizado para representar a variabilidade genética existente na coleção original de maior expressão no país, a possibilidade de permitir a inclusão da variabilidade genética de outras coleções nacionais e das coleções de trabalho constitue sua melhor característica. Por outro lado, a sistemática de considerar fundamental levar em conta não somente a diversidade genética da espécie de interesse mas também aquela relacionada com as espécies silvestre do gênero, somada ao papel estratégico dos "genepools", permite que de fato CORE apresente potencial para atender não somente as demandas dos atuais programas de pesquisa, mas provavelmente também para aquelas outras a serem estabelecidos no futuro. Todavia, caso a especificidade ou o nível de variabilidade genética desejada não seja encontrado na CORE, todos os outros acessos utilizados na sua definição e que constituem a "coleção reserva" conservados na COLBASE, devem ser analisados. Para produtos ou culturas comuns a uma região continental ou exóticos, ainda que o conceito da CORE venha sendo dirigido a representar a diversidade genética existente nas coleções nacionais, recomenda-se que sua estrutura final considere também a variabilidade genética disponível em nível internacional, ainda que mantida em agrupamentos separados.

**Jardins botânicos e zoológicos**

Estruturas de grande utilidade para conservação de germoplasma são os **jardins botânicos e zoológicos**. Embora Frankel & Soule (1981) considerem que "se bem os jardins botânicos e zoológicos possam preservar, somente as reservas naturais podem conservar", deve-se apontar que o baixo nível de amostragem genética da população onde os acessos foram obtidos, como uma possível fonte para descaracterização genética do acesso como elemento representativo da população. Todavia, considerando-se a dimensão do trabalho para conservar a diversidade genética existente, este esforço é louvável e deve continuar a ser estimulado.

**Reservas genéticas**

Reserva genética é a denominação aplicada ao local, no ambiente natural, onde são conservadas populações ou comunidades com características genéticas de interesse, submetidas aos processos evolutivos naturais. Lleras (1991) considera que as reservas genéticas, poderão apresentar variações estruturais provocadas pelos procedimentos de manejo a que são submetidas, como pode ser observado nos seguintes tipos: a) com pouco ou nenhum manejo, para populações de espécies mantidas dentro de unidades de conservação ambiental e com baixos níveis de distúrbio; b) com manejo moderado, para populações de espécies mantidas junto à comunidades humanas, mas com baixos níveis de alterão, como são as "**reservas extrativistas**"; c) manejo intermediário, para as populações de espécies mantidas sob uso extensivo e onde a interferência humana é necessária para manter o equilíbrio, como são as pastagens naturais utilizadas por animais domesticados; e d) manejo intensivo, para populações de espécies domesticadas ou semi-domesticadas nas quais o homem é responsável tanto pela estrutura populacional, como pela sobrevivência, como são as raças nativas de muitas culturas.

**Integração institucional**

O planejamento da captura, conservação e preservação da diversidade genética autóctone,

principalmente para países com expressiva biodiversidade, deve detalhar todas as etapas a serem vencidas, desde a identificação do valor potencial do germoplasma e os procedimentos de coleta mais adequados até os procedimentos para sua caracterização, avaliação, conservação e disponibilidade de amostras. o levantamento do valor sócio-econômico-cultural deve ser iniciado através de estudos etnobiológicos relacionados com o conhecimento popular e avaliação a que deve ser submetido o germoplasma.

Especial atenção deve ser dada ao germoplasma arbóreo de espécies alógamas, uma vez que os procedimentos inerentes para conservação do seu germoplasma apresentam uma elevada demanda por recursos humanos, materiais e financeiros, como conseqüência dos procedimentos de amostragem estabelecidos para conservação do germoplasma "in vivo" e a utilização de amostras com manutendo separadamente as progenies obtidas nas diferentes **plantas matrizes**. Assim, a **conservação "In vivo"** da amostra populacional de uma espécie arbórea alógama, constituída por 2.500-5.000 sementes, com 50 sementes obtidas em cada uma das 50 a 100 plantas matrizes da população, demandará uma área de entre 6,5 ha e 50 ha um espaçamento proposto, respectivamente de 5x5 m ou 10x10m. Cuidados especiais devem ser prestados em relação ao espaçamento a ser utilizado, que deve tender para o tipo de ambiente oferecido pela natureza e essencial para que cada indivíduo da amostra possa expressar suas características genéticas da forma adequada. De fato, quando o espaçamento e as condições ambientais são favoráveis, as amostras poderão expressar plenamente suas características genéticas e conseqüentemente todos os indivíduos produzir sementes em quantidades suficientes para organizar novas amostras com características semelhantes aquelas encontradas na população original.

Nesta situação, se a espécie cuja diversidade genética esta sendo amostrada apresenta entre 100 a 200 populações, o total de área necessária poderá elevar-se para 700 a 10.000 hectares. Pior ainda, se o objetivo é coletar a diversidade genética potencial que ocorre nos diferentes "genepools" e as espécies apresentam uma distribuição populacional semelhante à encontrada na espécie de interesse, provavelmente serão necessários milhares de hectares adicionais. De fato, este tipo de procedimento torna o empreendimento impraticável, pela área necessária, pelo os fatores de custo e benefício.

Por outro lado, os acessos obtidos por coleta podem de imediato ser submetidos a procedimentos de conservação "ex situ", sob frigorificação, cultura de meristemas, criopreservação ou alta densidade. Todavia, é importante deixar claro que somente situações emergenciais justificam que o germoplasma seja coletado e de imediato seja submetido a procedimentos de conservação a longo prazo, uma vez que a caracterização e avaliação de seu potencial) sócio-econômico ou cultural é um dos aspectos mais importantes a ser considerado. Por outro lado, a disponibilidade de tecnologias modernas poderá apontar alternativas mais eficientes para a conservação do germoplasma coletado, como é a conservação de células para representar todos os indivíduos amostrados ou até as progenies dos indivíduos amostrados no caso anterior. Entretanto, o estabelecimento de um sistema institucional integrado para manter as coleções de germoplasma de forma distribuída entre as diferentes instituições, poderá constituir uma opção viável e eficiente. Ao mesmo tempo, a conservação "in situ" constitue uma forma alternativa para conservar a diversidade genética de espécies silvestres, permitindo ainda que estas sejam estudadas no contexto do seu ambiente natural (CGIAR, 1992).

Todavia, embora esteja ocorrendo uma forte demanda por conservação "in situ" existe uma barreira muito expressiva, difícil de ser superada pelo esforço de uma única instituição, que está relacionada com a necessidade de ser implementada uma ação institucional integrada e a conseqüente a disponibilidade de níveis desejáveis de recursos humanos, financeiros e de estruturas física localizadas em áreas com níveis expressivos de diversidade genética. Ainda neste aspecto, deve-se também levar em conta que em geral as **reservas naturais** raramente tem sido selecionadas com o principal objetivo de conservar a variação genética das espécies (CGIAR, 1992a).

Parques, reservas, refúgios, santuários e outras estruturas dedicadas à conservação ambiental, embora pertencendo a instituições diferentes, quando localizados em áreas com expressivos níveis de diversidade podem ser considerados como estruturas físicas naturais e desejáveis para estabelecer os procedimentos para conservação "in situ" de do germoplasma de espécies de interesse atual ou potencial. Sua utilização pode ser viabilizada através do estabelecimento de **reservas genéticas** dentro das áreas de conservação sempre evitando que sejam provocadas alterações significantes no ambiente principal que esta sendo conservado. Somente esta soma de esforços poderá ser o mecanismo adequado para conseguir-se as bases para estabelecer reservas genéticas: 1) conservar "in situ" o germoplasma autoctone, com manutenção de organismos vivos em seus "habitats" originais (CGIAR, 1992b); 2) estabelecer áreas para a conservação de espécies silvestres com potencial ou daquelas outras relacionadas com produtos ou culturas de interesse atual (Lleras, 1991); 3) fortalecer os recursos disponíveis: técnico-científicos, materiais e financeiros.

Levando em conta os diferentes aspectos que devem ser definidos para proceder-se a conservação do diversidade genética, o CGIAR (1992b) considera que as estratégias apontam para uma abordagem integrada de conservação através do uso combinado de diferentes procedimentos, tais como conservação "ex situ" em "bancos de genes" ("in vivo", sementes, pólen, tecidos de DNA) e conservação "in situ". O CGIAR considera ainda que a combinação dos métodos depende das características biológicas do "genepool", da infra-estrutura técnica e dos recursos humanos disponíveis, do número de acessos e do local geográfico, entre outros fatores.

### Core como ponte entre a conservação "in situ" e "ex situ"

Entre as diretrizes a serem adotadas para fundamentar a conservação da diversidade genética autóctone, aquela relacionada com a adoção de procedimentos "in situ" e "ex situ" )de forma complementar deve ser considerada proritária. Neste enfoque, a combinação expressa pela interação **reserva genética-coleção nuclear** constitue uma das melhores alternativas não somente para conservar o germoplasma, mas, também para tornar disponível a porção representativa de sua diversidade genética. Nesta combinação o relacionamento entre a coleção nuclear e a reserva genética constitue uma ponte entre os procedimentos de conservação "in situ" e "ex situ". Conseqüentemente, os procedimentos a serem adotados devem promover a conservação "ex situ" de 70-80 por cento da diversidade genética das reservas genéticas, estimada através de procedimentos de caracterização e avaliação "in loco", em uma coleção nuclear formada por 10-15 por cento das populações sob conservação "in situ".

## ORGANIZAÇÃO DA COLEÇÃO NUCLEAR

Os critérios para organizar uma CORE tem sido estabelecidos por Brown (1989a, b). Embora o conceito da CORE tenha sido definido para representar 70-80 por cento da variabilidade genética presente na coleção original a ser utilizada como fonte de variabilidade genética, sua principal virtude reside no potencial de não somente representar esta variabilidade mas principalmente tentar representar o máximo da diversidade genética disponível nos diferentes "genepools" e a variabilidade genética existente nas coleções de trabalho. Ainda em relação à coleção original a ser utilizada, é recomendável utilizar a COLBASE, uma vez que suas amostras de germoplasma deverão apresentar menos alterações genéticas que aquelas mantidas em COLATIVAs.

Na organização da CORE torna-se essencial que através de uma ação previa sejam definidos cuidadosamente os princípios que deverão nortear os procedimentos a serem adotados. Entre estes, podem ser considerados aqueles propostos pelo CGIAR (1991): 1) obter metodologias rápidas para determinar a distribuição da diversidade genética sobre áreas geográficas e populações; 2) obter técnicas de amostragem adequadas para capturar o potencial genético dos "genepools" com o mínimo de repetição; 3) estabelecer sistemas de documentação e informação para aspectos genético-ecológicos da distribuição da

diversidade genética; e 4) definir o potencial de uso do germoplasma.

Sequencialmente a estes aspectos e com objetivo de estimular os níveis de utilização do germoplasma, Salhuan (1985) tem recomendado que sejam pesquisados alguns aspectos relacionados com demandas dos melhoristas, como: 1) origem do material, de maneira a estabelecer grupos heteróticos; 2) capacidade combinatória geral dos acessos; 3) capacidade de adaptação ambiental do germoplasma; 4) características utilitárias como resistência a doenças e pragas.

É recomendável que o estabelecimento de uma CORE seja sempre uma ação pro-ativa, principalmente porque nas ações reativas os efeitos da erosão genética poderão dificultar que seja obtida uma estrutura com os níveis de variabilidade genética desejáveis. Todavia, é provável que a eficiência a ser obtida seja diretamente relacionada com o nível de integração utilizado, que deve levar em conta não somente os aspectos institucionais e multidisciplinares mas também os enfoques e pontos de vista multiprofissionais.

De maneira que a organização da CORE resulte em uma estrutura adequada para representar genotipos, genes e alelos, torna-se necessário realizar sequencialmente as seguintes atividades: 1) organizar as informações disponíveis; 2) tentar estimar a variação genética existente na coleção original com o propósito de verificar sua representatividade, níveis de duplicação e redundância, e potencial para atender a demanda dos programas de ciência e tecnologia; 3) definir os estratos necessários para atender a demanda atual e potencial dos usuários; 4) distribuir os acessos da coleção original através dos estratos; 5) validar a CORE através do uso de procedimentos dirigidos a obter situações em que os níveis de diferenças sejam mais acentuados entre estratos que entre os acessos dentro de cada estrato; e 6) caracterizar e avaliar a CORE em diferentes ambientes. Caso não exista uma coleção original adequada, a primeira tarefa será organiza-la, inclusive complementando os dados de identificação e de características genéticas dos acessos, procedendo coletas complementares de germoplasma e, caracterizando e avaliando os acessos.

Como o principal objetivo da CORE esta dirigido a estabelecer uma coleção de germoplasma com alta representatividade da diversidade genética existente, com baixos níveis de duplicação e redundância genética e com uma dimensão adequada para estimular seu uso, é importante considerar como fontes de germoplasma a coleção original de maior expressão, as coleções regionais, as coleções de trabalho mais expressivas e os estoques genéticos disponíveis. Assim, deve ser dada ênfase a três aspectos: a) nível de representatividade da diversidade genética disponível nos diferentes ecossistemas e "genepools"; b) disponibilidade de material de importância reconhecida pelo usuário, como cultivares primitivas ou modernas com alta performance, linhagens, mutantes e estoques genéticos; e c) o número de acessos na coleção original, coleções regionais e coleções de trabalho.

Embora seja necessário conservar toda COLBASE como material estratégico, não é recomendável organizar uma CORE se não existe um programa nacional expressivo para utilizar o germoplasma ou se as fontes de germoplasma estão incluídas em uma das seguintes situações: 1) a coleção original não tem um nível aceitável de representação da diversidade genética disponível; 2) o germoplasma disponível não apresenta características utilitárias de interesse para os programas de ciência ou tecnologia; 3) o tamanho da coleção original não é grande, por exemplo entre 100 e 1.000 acessos; e 4) o germoplasma da coleção original esta bastante caracterizado e avaliado.

Ao levar-se em conta que a CORE tem um componente utilitário muito expressivo, recomenda-se que sua estratificação considere a organização de tantos agrupamentos quanto necessários para atender às demandas definidas previamente pelos curadores e usuários do germoplasma. É provável que um maior número de estratos seja mais eficiente, pois, dependendo da qualidade da CORE, é possível que exista um relacionamento direto entre seu nível de estratificação e seu grau de utilização. As informações sobre origem, distribuição geográfica e características genéticas dos acessos, como a expressão de fenotipos diferentes em ambientes também diferentes, permitem orientar a distribuição dos acessos da coleção original

através dos estratos adotados, embora tomando-se sempre o cuidado de evitar-se que sejam organizados agrupamentos com menos de 10 acessos. Neste ponto e antes de proceder-se a alocação final dos acessos para cada estrato, os agrupamentos adotados poderão ser validados através de estudos de agrupamentos e de analise multivariado.

Na definição do número de agrupamentos a serem adotados podem ser consideradas diversas diretrizes, entre as quais tem destaque as seguintes:

1) Devem ser organizados estratos com caracteres genéticos para adaptação ambiental constituídos por ecotipos cultivados, como cultivares primitivas ou "landraces", e em ecotipos ou raças de populações de silvestres. Embora possam ser organizados por regiões geopolíticas, estados e municípios, deve-se preferir organiza-los em nível de biomas e ecossistemas.

2) Devem ser organizados estratos com caracteres genéticos utilitários constituídos por haploides, poliploides, mutantes e estoques genéticos.

3) Devem ser organizados estratos para germoplasma elite, constituídos por acessos com características genéticas utilitárias e altamente desejados pelos agricultores e melhoristas, como as "landraces" e cultivares ou linhagens que obrigatoriamente fazem parte ou são desejáveis para toda coleção de trabalho.

4) Devem ser organizados estratos para germoplasma com características superiores para as atividades de melhoramento genético, constituídos por linhagens preliminares, linhagens avançadas e outros tipos, preferencialmente classificados como sub-agrupamentos dos estratos definidos para os ambientes.

Cuidado especial deve ser tomado em relação ao tamanho final da CORE, que deve ficar em torno de 10 a 15 por cento daquele encontrado na coleção original. A mesma intensidade de preocupação deve ser considerada na escolha dos critérios e metodologias para alocação dos acessos nos estratos. Para características utilitárias ou de adaptação ambiental, potencialmente duplicadas ou com altos níveis de redundância, recomenda-se que o critério de alocação seja aleatório. Para acessos com características superiores ou essenciais para as atividades de melhoramento genético, pode-se considerar a escolha sistemática dos acessos seja feita através da livre escolha por parte dos usuários.

No caso da alocação dos acessos ser aleatória, Brown (1989a, b) aponta que podem ser consideradas três situações: 1) alocação constante, que implica na adoção do mesmo número de acessos para cada estrato; 2) alocação proporcional, que considera números diferentes de acessos para cada estrato, em proporção direta com a disponibilidade inicial apresentada pelo estrato; e 3) alocação logarítmica, que orienta a alocação dos acessos em relação direta com o logarítmo do número de acessos que originalmente foram distribuídos pelos estratos. Assim, em uma situação onde os estratos iniciais estão constituídos por quantidades muito diferentes de acessos podem ser observadas as seguintes situações: a) uma alocação constante favorece a representação dos estratos com menor número de acessos; b) uma alocação proporcional favorece a representação dos estratos com maior número de acessos; e c) uma alocação logarítmica diminue as diferenças provocadas por estratos com quantidades muito diferentes de acessos. Na organização da CORE, a representação da diversidade genética deve realizada utilizando-se o critério da alocação aletória e constitue a porção mais expressiva da CORE. De forma complementar, mas observando-se o tamanho final a ser estabelecido são organizados e adicionados os estratos com caracteres superiores ou altamente específicos para as atividades de melhoramento genético.

## UTILIZAÇÃO DO GERMOPLASMA

### Enfoque sistémico

Kresovich & McFerson (1992) consideram que um manejo efetivo da diversidade genética de plantas deve incorporar o desenvolvimento agrícola como um elemento crítico a ser levado em conta no programa de conservação a ser adotado. Consideram ainda, que os

avanços na produção renovável de alimentos ou no uso direto ou indireto de outras partes da planta, devem ser reconhecidos como essenciais para a cultura humana e conseqüentemente compatíveis com os esforços realizados para conservar com os recursos biológicos considerados básicos para a agricultura.

Todavia, é bastante preocupante o baixo nível de utilização dos recursos genéticos nos programas de melhoramento genético. Valores globais apresentam níveis de 2 por cento, geralmente restritos a uma porção mínima do genoma (Salhuana, 1985; Gill, 1989). Todavia, demandas pontuais apresentam valores mais elevados, até 8,11 por cento para o germoplasma de hortaliças em Taiwan (Tay, 1988). Todavia, a UNESCO, citada pelo CGIAR (1992b), aponta o USDA afirmando que aumentos de 1 por cento na produtividade agrícola obtida através do uso de germoplasma, correspondê a ganhos de um bilhão de dólares para o país.

A melhoria dos níveis de utilização do germoplasma está relacionada não apenas com o estabelecimento de diferenças entre os acessos, mas, principalmente com a determinação do seu potencial sócio-econômico-cultural. Neste aspecto, Beuseline & Steiner (1992) consideram que uma utilização eficiente do potencial genético mantido nas coleções de germoplasma requer conhecimento detalhado dos acessos. Embora seja desejável que todo o germoplasma disponível seja caracterizado e avaliado, os esforços devem ser dirigidos para prioridades fundamentadas em objetivos bem definidos. Conseqüentemente, nas condições dos países em desenvolvimento, com deficiências crônicas de recursos humanos, financeiros e materiais, a programação de atividades deve levar em consideração pelo menos os seguintes aspectos: a) integração institucional com cooperação e complementação de atividades; b) fortalecimento de rotinas institucionais; e c) direcionamento dos esforços da pesquisa, experimentação e validação para estimular o uso do germoplasma.

Aparentemente uma estratégia adequada para promover aumentos desejáveis nos níveis de utilização de germoplasma está relacionada com uma estreita aproximação entre as equipes de recursos genéticos e de melhoramento genético. O principal objetivo deve ser dirigido a realizar trabalhos conjuntos e proativos, com metas e ações bem definidas. Esta interação permitirá ainda o fortalecimento e implementação de ações conjuntas dirigidas à obtenção de **linhagem preliminares** ou **pre-breeding lines**, indispensáveis para a consecução de avanços expressivos nos programas de melhoramento genético, principalmente quando se conta com o potencial da diversidade genética e a disponibilidade de modernas biotecnologias.

## Pesquisa e tecnologia

Na definição e implementação de prioridades para obtenção, conservação, estudo e aproveitamento do potencial apresentado pela diversidade genética é importante definir claramente o que se quer obter. Neste aspecto, o CGIAR (1992c) considera que embora bastante pesquisa tenha sido realizada em recursos genéticos, ainda existem muitas perguntas sem respostas, inclusive para os produtos ou culturas mais expressivos, como: onde estão os recursos genéticos mais importantes?. Como podem ser identificados os recursos genéticos?. Quais são os melhores métodos de conservação?. Como podem ser intercambiados com segurança?. Como pode ser estimado seu valor?. Junto com estes aspectos, existem outros ainda não elucidados, como: quais são os melhores métodos para estimar a diversidade genética existente?. Quais são os procedimentos mais adequados para amostragem da variação genética?

Por outro lado, uma política efetiva para recursos genéticos deve levar em conta o modelo de **"conservação integrada da variação genética"**, proposto por Falk (1990), e fundamentado em três pontos: 1) definição da entidade biológica a ser considerada, inclusive seu nível de organização biológica; 2) identificação dos fatores de pressão e de risco a que esta entidade é submetida; e 3) definição da sistemática, estruturas e recursos a serem utilizados. Assim, na definição os enfoques apresentados por Lacy, citado por Falk (1990), que considera a fundamentação das ações sobre bases científicas a condição essencial para uma efetiva política de recursos genéticos.

Levando-se em conta o grau de degradação a que está sendo submetida a biodiversidade nos diferentes biomas, existe um risco acentuado de perdas irrecuperáveis de recursos biológicos inclusive de recursos que se utilizados talvez poderiam ser catalogados como úteis ou estratégicos. Por esta razão é oportuno estimular o levantamento, estudo e conhecimento da diversidade genética e ao mesmo tempo promover de forma pro-ativa o desenvolvimento e validação de tecnologias alternativas para efetivar sua conservação, principalmente para o caso das espécies com riscos acentuados de erosão genética e até de extinção. Neste aspecto, o CGIAR (1992c) lembra que cada avanço da pesquisa no campo da conservação e uso dos recursos genéticos vegetais é uma vitória na luta contra a perda da biodiversidade, o recurso mais valioso para sobrevivência da humanidade.

Em relação aos recursos genéticos autóctonos, freqüentemente com níveis acentuados de erosão genética, pode-se facilmente imaginar que qualquer que seja a política de ciência e tecnologia a ser adotada, dificilmente poderão ser resolvidas as diferentes situações emergênciais que seguramente existem. Assim, embora não sejam implementados todos os segmentos de do programa científico-tecnológico integrado, pelo menos duas tecnologias propostas por Mattick (1992) para conservar a variação genética deveriam ser consideradas com prioridade: a) criopreservação de células, e b) criopreservação de DNA ou seus fragmentos. Levando em conta que as células possuem integralmente as fontes da hereditariedade é imprescindível que sua obtenção obedeça os procedimentos estabelecidos para amostrar as características genéticas das populações. Ao mesmo tempo, embora a conservação de DNA e seus fragmentos não conserve toda a estrutura genética do organismo, o material genético conservado poderá apresentar um valor incalculável para os procedimentos de melhoramento genético que utilizam biotecnologias.

Existe um número expressivo de tecnologias modernas aplicáveis a recursos genéticos, embora na sua maioria estejam direcionadas para atender o germoplasma dos produtos ou culturas utilizadas pelos países localizados em regiões de clima temperado. De fato, a disponibilidade de modernas tecnologias para atender o manejo dos recursos genéticos das regiões tropicais e subtropicais ainda parece ser bastante precária. No intuito de ordenar e organizar as atividades de pesquisa e tecnologia para recursos genéticos, deve-se considerar que o principal objetivo de um sistema de recursos genéticos não deve estar unicamente direcionado para conservar germoplasma, mas deve também apresentar um forte componente para estimular sua utilização. Todavia, antes de ser iniciado um programa de ciência e tecnologia para recursos genéticos, deve-se verificar a possibilidade de obter tecnologias já definidas para outros sistemas, que após validadas poderão ser implementadas como rotinas institucionais.

Em relação às áreas de pesquisa que necessitam de uma atenção especial, o CGIAR (1992c) considera as seguintes: a) **padrões de diversidade genética**, para permitir selecionar os melhores locais para conservação de reservas e para o desenvolvimento de estratégias efetivas para coletar germoplasma; b) **métodos para conservação de sementes** e "in vitro", para conservar com segurança os recursos genéticos já disponíveis nos bancos de genese para estender a potencial da conservação "ex situ" para um número maior de culturas ou produtos; c) **quando e como multiplicar e regenerar germoplasma**, para erradicar doenças, prevenir a degradação e tornar o germoplasma mais acessível para os usuários; e d) **métodos para detecção de doenças** para tornar mais fácil e seguro o intercâmbio internacional do germoplasma.

Os enfoques tecnológicos a serem cobertos envolvem diversas linhas de ação que vão desde o levantamento da diversidade genética, a conservação "in situ" de populações em suas comunidades, até a conservação "ex situ" e utilização do germoplasma. Vilela-Morales (1991) e Giacometti (1992) consideram que um programa de pesquisa para recursos genéticos deve considerar, entre outros, os seguintes estudos: a) biologia evolutiva e ecologia, como instrumentos para melhor entender a estrutura populacional e a formação das espécies; b) etnobiologia, para conhecer

o relacionamento entre o homem, o germoplasma e o meio-ambiente; c) biologia econômica, para levantar o potencial utilitário do germoplasma; d) filogenia e estrutura genéticas das populações, como meio para definir centros de diversidade, centros de domesticação e "genepools"; e e) sistemas para conservação de germoplasma.

Por outro lado, o crescente desenvolvimento de técnicas biotecnológicas parece ser o instrumento moderno mais eficaz para manipular a variação genética. Pela dimensão do esforço a ser realizado, parece que principalmente os países que dispõem e utilizam procedimentos biotecnológicos poderão oferecer a curto e médio prazos benefícios sócio-econômico-culturais para a sociedade. Técnicas biotecnológicas como isoenzimas, RFLP e RAPDs, poderão permitir caracterizar e avaliar o germoplasma com maior rapidez e eficiência e ao mesmo tempo participar da transferência e uso de caracteres ou genes de importância sócio-econômica.

Em relação à utilização de biotecnologias como procedimentos de recursos genéticos, as seguintes biotecnologias vem sendo freqüentemente nos sistemas de recursos genéticos:

1) Procedimentos "in vitro", como: a) conservação de germoplasma através de culturas de células, DNA e fragmentos de DNA; b) criopreservação do germoplasma utilizando: tecidos, sementes, pólen, gemas, embriões, sêmen e ovócitos; c) coleta de germoplasma; d) quarentena de germoplasma; e e) propagação de germoplasma.

2) Caracterização, avaliação e "screening" ou "varredura" laboratorial, utilizando procedimentos bioquímicos e marcadores genéticos, com o objetivo de identificar genes ou características genéticas potenciais.

3) Mapeamento genético do germoplasma, como fundamento para caracteriza-lo e promover sua e utilização em procedimentos de biologia molecular.

4) Preservação de DNA para manter, de forma segura, genes ou caracteres raros ou com expressivo valor sócio-econômico.

5) Utilização de procedimentos de biologia molecular como estratégia para estimular a utilização da variação genética no estabelecimento de linhagens preliminares ("pre-breeding lines") e organismos transgênicos.

Ainda em relação a disponibilidade de biotecnologias, o IPGRI (1993) considera que as seguintes serão utilizadas com mais freqüência nos próximos anos: a) coleta de germoplasma "in vitro"; b) conservação de germoplasma utilizando cultura de tecidos baixo nível de espécies utilizando procedimentos com marcadores genéticos; d) avaliação da diversidade genética em espécies, populações e acessos utilizando técnicas moleculares como o RFLP ou RAPD; e) identificação de genes ou alelos utilitários em populações segregantes utilizando técnicas moleculares, como o PCR; f) indexação de doenças utilizando transferência de genes entre espécies; e h) conservação de DNA como opção segura para conservar genes utilitários ou material genético extremamente raro.

Por outro lado, deve ser estimulada a **domesticação de espécies** como estratégia fundamental para utilizar o potencial sócio-econômico e cultural oferecido pelos recursos genéticos autóctones. Situação típica do baixo nível de conhecimento do potencial oferecido pela biodiversidade pode ser observado nas palmeiras amazônicas, onde, embora reunidas em 232 espécies e 37 gêneros descritos, apenas a pupunha (*Bactris gasipaes*), se encontra em um estado mais avançado de domesticação, inclusive somente ocorrendo sob condições de cultivo. Uma visão mais ampla da importância da domesticação pode ainda ser observado com o dendê (*Elaeis guineensis*), que após de 80 anos de quantidade superior a 5.000 kg/ha/ano (Lleras & Coradin, 1985).

Em termos gerais, a domesticação é um processo continuo e duradouro realizado com o objetivo de adaptar organismos aos condicionantes bióticos e abióticos de cada região. Um exemplo bastante elucidativo é a seringueira (*Hevea brasiliensis*), cujo processo da domesticação foi iniciado em 1872 com o envio de aproximadamente 70.000 sementes do Baixo Amazonas para o exterior. Nesta cultura, embora o

primeiro plantio racional na Região Amazônica tenha sido efetuado em 1928, em *Fordlandia-Para*, até os dias atuais existe a necessidade de continuar a busca de adaptação das populações à interação genótipo x ambiente, como mecanismo para diminuir a ação de condicionantes biológicos, como o fungo *Microcyclusç ulei.*

Sugere-se que o critério para escolha das espécies que primeiramente deverão ser submetidas aos procedimentos de domesticação seja dirigido para aquelas que apresentam características superiores de adaptação ambiental e precocidade, potencial para boa produtividade, produtos com elevado valor sócio-econômico ou cultural e que potencialmente disponham de valores expressivos de diversidade genética. Assim, dentro de um quadro de integração institucional os procedimentos de domesticação devem ser estabelecidos levando em conta os seguintes fatores: a) o conhecimento etnobiológico existente, b) a distribuição da diversidade genética e dos "genepools", c) a disponibilidade de procedimentos para capturar o máximo da diversidade genética dos "**genepools**" com o mínimo de amostras, d) a disponibilidade de procedimentos para manter e utilizar a variação genética capturada, e) a definição e estabelecimento de práticas culturais adequadas, f) a definição e estabelecimento de processos e métodos para melhoramento genético, inclusive utilizando expressivamente tecnologias modernas, e g) a definição de mecanismos ou procedimentos para seu aproveitamento agrícola e/ou industrial.

**Linhas de projetos e ações**

Com o objetivo de oferecer alternativas para a organização de projetos para recursos genéticos e ao mesmo tempo fortalecer as ações com curadoria, é recomendável levar em conta os seguintes pontos:

1) Critérios para organizar projetos

a. Deve-se considerar a conservação e uso do germoplasma como os objetivos mais importantes a serem considerados em um sistema de recursos genéticos, conseqüentemente é fundamental que sejam estabelecidos procedimentos que permitam identificar e estimar a diversidade genética existente; obter amostras representativas de populações; conservar a variabilidade genética existente; caracterizar e avaliar o germoplasma com a finalidade de estimar seu potencial utilitário; e manter disponíveis amostras representativas da variação genética.

b. Deve-se estimular que o enfoque das coleções relacionadas com a conservação da variabilidade genética seja dirigido para recursos genéticos e "genepools", de maneira a considerar-se todas as espécies relacionadas com a espécie de interesse e não unicamente os acessos daquela espécie.

c. Deve-se priorizar o suporte a grandes rotinas institucionais, facilmente identificadas por apresentar uma demanda elevada por procedimentos eficientes e eficazes para conservação, intercâmbio, documentação e informação e geralmente por se constituir em pontos de estrangulamento, além de ser repetitivas, tediosas e pouco reconhecidas.

d. Deve-se estabelecer níveis de prioridade dos projetos levando-se em conta a demanda dos usuários e o potencial sócio-econômico-cultural oferecido pelo germoplasma.

e. Deve-se priorizar a aprovação e estabelecimento de projetos que apresentam níveis expressivos de enfoque sistêmico, integração institucional e sequenciamento organizado de atividades.

2) Atividades de pesquisa ou ações de curadoria

Embora a organização dos projetos possa ser estruturada para atender rotinas institucionais ou demanda dos usuários, as linhas de ação a serem consideradas devem estar intimamente relacionados com os seguintes grandes alinhamentos:

a) Na conservação "in situ":

- Levantar e definir áreas ecogeográficas de concentração da diversidade genética, validando as informações através de visitas aos locais e

correlacionando-as com as características ambientais.

- Estimar os níveis potenciais de diversidade genética, endemismos e distribuição dos "genepools".
- Estimar áreas de pressão antrópica e os níveis prováveis de erosão genética.

Priorizar espécies e produtos promissores.

- Selecionar e priorizar áreas para o estabelecimento de reservas genéticas.
- Definir parâmetros, procedimentos e metodologias relacionados com as seguintes áreas de estudo:
  - Etnobiologia
  - Ecologia e fitogeografia
  - Biologia reprodutiva
  - Taxonômia
  - Genética e amostragem da variação genética.

b) Na conservação "ex situ":

- Levantar a origem, evolução, processos de domesticação e distribuição da(s) espécie(s) de interesse.
- Estimar a diversidade genética potencial oferecida pelos "genepools" da(s) espécie(s) de interesse.
- Estimar a variabilidade genética disponível, para a(s) espécie(s) de interesse.
- Definir parâmetros, procedimentos e metodologias relacionados com as seguintes áreas de estudo:
  - Metodologias para coletar amostras populacionais geneticamente representativas.
  - Metodologias de amostragem para manter ea integridade da estrutura genética dos acessos submetidos a procedimentos de multiplicação inicial, regeneração e de intercâmbio do germoplasma.
  - Estabelecimento de regras para a cessão, intercâmbio, inspeção sanitária, quarentena, direitos intelectuais e propriedade do germoplasma.
  - Definir coleções nucleares ou "core collections", como estratégia para estimular a conservação e uso do germoplasma.
  - Estudar e implementar estratégias para difusão e transferência de tecnologias, inclusive fortalecendo a elaboração e publicação de inventários e catálogos de germoplasma; o treinamento e reuniões técnicas, a interação com universidades, empresas públicas e privadas e a promoção do fortalecimento institucional.

c) Na documentação e informação:

- Definir, estabelecer, fortalecer e operar sistemas integrados de informações de recursos genéticos, em rede e com os seguintes componentes:
- Base de dados sobre biodiversidade e seus componentes, diversidade genética, "genepools", recursos genéticos e germoplasma, com informações de identificação ou passaporte, caracterização, avaliação, inventário ou estoque, monitoramento do estado de conservação e potencialidade.
- Base de dados sobre tecnologias, pesquisas e especialistas relacionados com recursos genéticos.
- Base de dados sobre os aspectos utilitários do germoplasma e das estruturas genéticas.
- Base de dados bibliográficos sobre recursos genéticos e tecnologias pertinentes.
- Definir bases geográficos e de sensoriamento remoto, como mecanismos para reconhecer e monitorar locais com diversidade genética de interesse.

- Definir sistemas especialistas, utilizando inteligência artificial, como mecanismo para melhor aproveitar o conhecimento disponível em atividades de monitoramento e automação de rotinas.

## LITERATURA CITADA E CONSULTADA


ABLER, B.S.B.; EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W. 1991. Izoenzymatic: Identification of quantitative trait loci in crosses of elite maize inbreds. Crop Science. v. 31, p. 267-274.

ADAMS, R.P.; ADAMS, J.E. 1992 (eds.). Conservation of Plant Genes. DNA Banking and "in vitro" Biotechnologg. Londo: Academic Press, Inc. 345 p.

ALLARD, R.W. 1970. Population structure and sampling methods. In: Frankel, O.H.; Bennett, E. Genetic Resources in plants - Their exploration and conservation. London: Blackwell, p. 97-107.

ANDERSEN, W.R. & FAIRBANKS, D.J. 1990. Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. Diversity. 6 (34): 51-53.

BENNETT, E. 1970. Tactics o Plant Exploration. In: Frankel, O.H.; Bennett, E. Genetic Resources in plants - Their exploration and conservation. London: Blackwell, p. 117-179.

BEUSELINCK, P.R.; STEINER, J.J. 1992. A proposed framework for identifying, and utilizing germplasm resources. Field Crops Research. v. 29, p. 261-272.

BREESE, E.L. 1989. Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: The scientific background. Rome: IBPGR, 69 p.

BREESE, L. 1989. Multiplication and regeneration of germplasm. In: Stalker, H.T.; Chapman, C. (eds.). Scientific Management of Germplasm Characterization: Evaluation and Enhacement. Rome: IBPGR-North Carolina State University. (IBPGR Training Courses: Lecture Series. 2. p 17-21.

BROWN, A.H.D. 1989a. The case for core collections. In: Frankel, O.; Marshall, D.R.; Williams, J.T. (eds.). The use of plant genetic resources. Cambridge: Cambridge University Press, p. 136-156.

--------. 1989b. Core collections: a practical approach to genetic resources managements. Genome, v. 31, p. 818-824.

CHANGHSIN, WU. 1992. In-situ preservation: Suggestion of conservation of animal genétic resources in Asia region. In: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 120-130.

CGIAR. 1991. Report of the third external review of the International Borad for Plant Genetic Rosources (IBPGR). Rome, The Consultative Group on International Agricultural Research Technical Advisory Commitee/ Food and Agriculture Organization of the United Nations. 85 p.

--------. 1992a. Plant genetic resources - the key to survival. CGIAR FACT SHEET 1. 2 p.

--------. 1992b. Conservation estrategies - towards an integrated approach. CGIAR FACT SHEET 4. 2 p.

--------. 1992c. Plant genetic resources - research today to benefit tomorrow. CGIAR FACT SHEET 7. 2 p.

CLARK, N. & JUMA, C. 1991. Biotechnology for sustainable development. Policy options for developing countries. Nairobi. African Centre for Technology Studies. 117 p.

CORDEIRO, C.M.T.; VILELA-MORALES, E.A.; FERREIRA, P.; ROCHA, D.M.S.; COSTA, I.R.S.; VALOIS, A.C.C.; SILVA, S. 1992. Towards a Brazilian core collection for cassava. In: IBPGR. International Workshop on Core Collections of Plant Germplasm. Brasilia: 19 p. Inédito.

CROSSA, J.; JEWELL, D.C.; DEUTSCH, J.A.; TABA, S. 1992. Gene action and the bottleneck effect in relation to sample size for maintenance of cross pollinated populations. Fiel Crops Research. v. 29. p. 225-239.

--------; HERNANDEZ, C.M.; BRETTING, P.; EBERHART, S.A.; TABA, S. 1993. Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections. Theor Appl. Genet. V. 86. p. 673-678.

DODDS, J.H. & WATANABE, K. 1990. Biotechnological tools for plant genetic resources management. Diversity, 6 (3 & 4): 26-28.

DUVICK, D.N. 1984. Genetic diversity in major crops on the farm and in reserve. Econ. Bot., 38: 161-178.

EHRLICH, P.R. & WILSON, E.O. 1991. Biodiversity studies: Science and policy. Science, 253: 758-762.

EMBRAPA. 1993. Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia. Plano Diretor do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN. Brasília: 42p.

ESQUINAS ALCAZAR, J.T. & BOMBIN, L.M. 1991. Situación actual de la discusión sobre el uso de los recursos genéticos. In: Políticas de propiedad industrial de inventos biotecnológicos y uso de germoplasma en América Latina y el Caribe. San José. IICA. p. 73-85.

FALK, D.A. 1990. Integrated strategies for conserving plan genetic diversity. Ann. Missouri Bot. Gard. v. 77, p. 38-47.

FAO. 1984. Animal genetic resources information. Rome: FAO, 56 p.

--------. 1990. Manual of establishment and operation of animal gene banks. Rome: FAO, 67 p.

FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. 1986. Plant Genetic Resources: an introduction to their conservation and use. Edward Arnold. London, 146 p.

FRANKEL, O.H. 1970. Genetic conservation in perspective. In: Frankel, O.H.; Bennet, E. Genetic resources in plants - Their exploration and conservation. Blackwell, Oxford, Edinburgh. p. 469-489. (IBP Handbook No. 11).

--------; BENNETT, E. 1970. Genetic Resources in plants - Their exploration and conservation. London: Blackwell. 554 p.

-------- & SOULE, M.E. Conservation and Evolution. Cambridge: Cambridge University Press. 1981. 327 p.

--------. 1982. Genetics Resources and the Plant Breeder Introduction. In: Singh, R.B. & Chomchalow, N. (eds.). Genetics resources and the plant breeder. Bangkok. International Board for Plant Genetic Resources. p. 1-2.

---------. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: Arber, W.K.; Llimenses, K.; Peacock, W.J. & Starlinger, P. 1984. Genetic Manipulation: Impact on Man and Society. Cambridge. p. 161-170.

GIACOMETTI, D.C.; GOEDERT, C.O. 1989. Brazil's National genetic resources and biotechnology center preserves and develops valuable germplasm. Washington: Diversity. v. 5, n. 4, p. 8-11.

--------. 1992. The management of genetic resources as a component of biological diversity. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 11p.

GIANNASI, D.E. 1992. Feasibility of obtaining comparative gene sequence data from preserved and fossil materials. In: Adams, R.P.; Adams, J.E. Conservation of Plant Genes. DNA banking and "in vitro" biotechnology. San Diego, California: Academic Press, Inc., 75-98.

GILL, K.S. 1989. Role of plant genetic resource collections in research and breeding. In: Brown, A.H.D., Frankel, O.H., Marshall, D.R. and Williams, J.T. (eds.), The use of Plant Genetic Resources. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 3-16.

GOODMAN, M.M.; BIRD, R.M. 1977. The races of maize. IV. Tentative grouping of 219 Latin American races. Economic Botany. v. 31. p. 204-221.

HAHN, S.K.; TERRY, E.R.; LEUSCHNER, K. 1980. Breeding cassava for resistance to cassava mosaic disease. Euphytica, 29 (3): 673-683.

HARLAN, J.R. and WET, J.M.J. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. Taxon. 20, 509-517.

--------. 1984. Evaluation of wild relatives of crop plants. In: sources: Conservation and Evaluation. IBPGR.

HAWKES, J.G. 1976. Handbook for field collectors. Seed crops. Rome: FAO. 33p.

--------. 1982. Gene banking strategies for botanic gardens. Opera Bot. 113: 15-17.

HENSON, E.L. 1992. "In situ" conservation of livestock and poultry. Rome: FAO, 112 p. (FAO Animal Production and Health Paper 99).

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Ames: Iowa State University Press, p. 392-396.

HODGKIN, T.; DEBOUCK, D.B. 1992. Molecular Genetics in the use of wild species for crop Improvement. In: Adams, R.P.; Adams, J.E. Conservation of Plant Genes. DNA banking and "in vitro" biotechnology. San Diego, California: Academic Press, Inc., p. 153-181.

HOYT, E. 1988. Conserving the wild relatives of crops. Rome: International board for plant genetic resources - IUCN - WWF. 45 p.

HUAMAN C.Z.; ARBIZU A.C. 1981. Taxonomia. In: Curso Internacional. Colección, Evaluación, Conservación y Utilización de Recursos Genéticos. Lima: Universidad Nacional Agraria "La Molina" - Centro de Informática para la Investigación Agrícola. 84 p.

IBPGR. 1976. Report of IBPGR working group on engineering, design and cost aspects of long-term seed storage facilities. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 19 p.

--------. 1991. Elsevier's dictionary of plant genetic resources. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 187 p.

--------. 1992. The FAO/IBPGR Expert Consultation on Genebank Standards (26-29 May, 1992). Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 18 p. Inédito.

--------. 1993. Diversity for development. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 62 p.

IUBC. 1980. International code of the nomenclatura for cultivated plants. Bonn: International Union of the Biological Sciences - International Comission for the nomenclature of cultivated plants, 31 p.

JENKINS, R.E. 1988. Information management for the conservation of Washington: National Academy Press, p. 231-239.

KEMP, R.H.; NAMKOONG, G.; WADSWORTH, F.H. 1992. Conservation of genetic resources in tropical forest management. Principles and concepts. Rome: 105 p. (FAO Forestry Paper 107).

KEYSTONE CENTER. 1988. The Keystone International Dialogue on Plant Genetic Resources. Keystone: Keystone Center. 33 p.

--------. 1990. Keystone Madras Dialogue. Washington: Genetic Resources Communication Systems, Inc. 30 p.

KOBAYASHI, M. & SAKAMOTO, S. 1988. Utilization of exotic germplasm in sweet potato breeding. **In**: Suzuki, S. (ed.). 1988. Crop Genetic Resources of East Asia. Tsukuba, International Board for Plant Genetic Resources, Proceedings..., 286 p.

KRESOVICH, S.; McFERSON, J.R. 1972. Assessment and management of plant genetic diversity: considerations of intra-and interspecific variation. Field Crops Research. v. 29. p. 185-204.

LANTICAN, R.M. 1988. Recent developments in plant genetic resources conservation work in Southeast Asia. **In**: Suzuki, S. (ed). 1988. Crop Genetic Resources of East Asia. Proceedings Resources, 286 p.

LLERAS, E. 1991. Conservation of Genetic Resources **In situ**. Diversity. v. 7, n.1-2 p. 72-74.

--------; CORADIN, L. 1985. Palmeras nativas como oleaginosas: situación actual y perspectivas para América Latina. **In**: Seminario-Taller sobre Oleaginosas promisoras. Informe, Bogotá. p. 92-143.

MARIANTE, A. da S. 1992a. Identification of breeds/ populations in danger of extinction. **In**: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 6-14.

--------. 1992. Levels of risk and factors affecting breed loss. **In**: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 15-33.

--------. 1992 c. Ex-situ preservation. **In**: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 104-119.

MARSHALL, D.R.; BROWN, A.H.D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. **In**: Frankel, O.H.; Hawkes, J.G. Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge: Cambridge University Press. p. 53-80.

MATTICK, J.S.; ABLETT, E.M.; EDMONSON, D.L. 1992. The gene library preservation and analysis of genetic diversity in Australasia. **In**: Adams, R.P.; Adams, J.E. Conservation of Plant Genes. DNA banking and **In vitro** biotechnology. San Diego, California: Academic Press, Inc., 15-35.

McNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.; MITTERMEIER, R.A. & WERNER, T.B. 1990. Conserving the world's biological diversity -Gland, Switzerland, Washington: IUCN/WRI/CI/WWF-US/World Bank. 193 p.

MONTEIRO, J.S. 1984. Sistema de Informações de Recursos Genéticos - Projeto Lógico. Brasília: EMBRAPA/DMQ, 152 p.

NASS, L.L.; PELLICANO, I.J. & VALOIS, A.C.C. 1993. Utilization of genetic resources for maize and syubean breeding in Brazil. Brazil J. Genetics. v. 16, n.4., p. 983-988.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M.M. 1977. Races of maize in Brazil and adjacent areas. Mexico: CYMMIT, 95 p.

--------. An evaluation of the genetic diversity in the varieties currently utilized. **In**: Report for the Latin American Plant Breeding Research Forum - Latin America's Plant Resources: Abundant Food Supplies for the future. Caracas. Pioneer H-Bred International, Inc. p: 45-53.

--------. 1989. Diversidade genética em plantas cultivadas. **In**: Encontro sobre Recursos Geneticos. Anais..., Jaboticabal, UNESP/FCAV-EMBRAPA/CENARGEN. p. 75-77.

PEETERS, J.P. & WILLIAMS, J.T. 1984. Towards better use of genebanks with special reference to information. Plant Genetic Resources Newletter, v. 60, p. 22-32.

-------- & MARTINELLI, J.A. 1989. Hierarchical cluster analysis as a tool to manage variation in germplasm collections. Theor. Appl. Genet. 78, 42-48.

PERRY, M.C. and McINTOSH, M.S. 1991. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection. I. Morphological traits. Crop Sci., 31: 1350-1355.

--------; McINTOSH, M.S. and STONER, A.K. 1991. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection. II. Allozyme frequencies. Crop Sci., 31: 1356-1360.

RAMALHO, M.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.B. 1990. Genética na agropecuária. Lavras: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. 359 p.

ROCA, W.M.; CHAVEZ, R.; MARTIN, M.L.; ARIAS, D.L.; MAFLA, G. and REYES, R. 1989. "In vitro" methods of germplasm conservation. Genome 31: 813-817.

RUSSELL, P.J. 1988. Genetics. 2a.ed. Glenview. Scott, Foresman and Company. 913 p.

SALHUANA, W. 1985. Strategies for increasing the use of germplasm. In: Pioneer H-Bred Internationai, Inc. Report of the Latin American Plan Breeding Research Forum - Latin America's Plant Resources: Abundant Food Supplies for the Future. Caracas. p. 141-172.

SHANDS, H.L. 1990. Plant genetic resources conservation: the role of the gene bank in delivering useful genetic materials to the research scientist. Journal of Heredity. 81: 7-10.

SILVA, J. 1988. Programa Nacionai de Pesquisa em Recursos Genéticos. In: Encontro sobre recursos genéticos, 1, 1988, Anais. Jaboticabal: UNESP-FCAV. p. 15-22.

SIMON, D.L. 1984. Conservation of animal genetic resources: a review. Livestock Production Science, v.11, n.1, p. 23-36.

SIMPSON, C.E. 1990. Introgression of early maturity into Arachis hypogeae L. In: American Peanut Research and Education Society, Inc. Proceding..., Stone Mountains. p. 49.

SINGH, R.B. 1982. Crop Genetic Resources and their utilization in Southeast Asia: An Overview. In: Singh, R.B. & Chomchalow, N. (eds.). Genetics resources and the plant breeder. Bangkok. International Board for Plant Genetic Resources - Southeast Asian Programme. p. 3-34.

SINGH, R.K. & SINGH, M. 1982. The use of grain legume germplasm in India. In: Singh, R.B. & Chomchalow, N. (eds.). Genetics resources and the plant breeder. Bangkok. International Board for Plant Genetic Resources. p. 42-57.

SMITH, O.S. 1971. Brodening the base of genetic variability in plants. J. Hered. 62: 265-276.

SMITH, J.S.C.; DUVICK, D.N. 1989. Germplasm collections and the private plant breeder. In: Brown, A.H.D., Frankel, O.H., Marshall, D.R.; Williams, J.T. (eds.). The use of plant genetic resources. Cambridge: Cambridge University Press, p.3-16.

-------- & SMITH, O.S. 1991. Restriction fragment length polymorphisms can differentite among U.S. maize hybrids. Crop Sci. 31: 893-899.

SPAGNOLETTI ZEULI, P.L. and QUALSET, C.O. 1987. Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. Crop. Sci. 27: 235-241.

TAY, C. 1988. Present status management and utilization of tropical vegetable genetic resources at AVRDC. In: Suzuki, S. (ed). 1988. Crop genetic resources of east Asia. Tsukuba: International Board for Plant Genetic Resources, Proceedings..., 286 p.

The U.S. 1991. National Plant Germplasm System, Washington: National Academy Press, 171 p. il. (National Academy of Sciences. Managing Global Genetic Resources).

TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A. and WILLIAMS, J.G. K. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. In: 1992. Applications of RAPD technology to plant breeding. p. 3-8.

UNEP. 1992. Convention on Biological Diversity. Rio de Janeiro: United Nations Environment Programme (UNEP), 24 p. (Na. 92-7807).

VENCOVSKY, R. 1978. Herança quantitativa. In: Paterniani, E. (ed.). Melhoramento e produção de milho no Brasil. Fundação Cargill. Piracicaba: ESALQ-USP. p: 122-201.

--------. 1986. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 15 p.

VILELA-MORALES, E.A. 1982. Informática de Recursos Genéticos. In: Encontro de Métodos Quantitativos da EMBRAPA, Memória do Primeiro..., Brasília: EMBRAPA-DMQ. p. 315-323.

--------. 1988. Documentação e informática de recursos genéticos. In: Encontro sobre recursos genéticos, 1, 1988, Anais. Jaboticabal: UNESP-FCAV. p. 135-147.

--------. 1989. Documentação e informática de recursos genéticos em fruticultura. In: Simpósio latino-americano sobre recursos genéticos de espécies hortícolas, 1, Anais, Campinas: Fundação Cargill, p. 128-139.

--------. 1991. Propuesta de Plan de trabajo para una acción integrada en el manejo y conservación de los recursos genéticos del trópico suramericano - PROCITROPICOS. Brasília: IICA. 68 p.

--------. 1993. Regras para denominação e codificação de germoplasma vegetal. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1v.. (Inédito).

--------. 1992. Fundamentos para conceituação, terminologia e estruturas para recursos genéticos. In: Vilela Moraies, E.A. & Monteiro, J.S. (eds.) Recursos Genéticos Vegetais: Fundamentos, procedimentos e documentação. Proposta de um Modelo. Brasilia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro

Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 1-23 (Inédito).

VILELA-MORALES, E.A. ; VALOIS, A.C.C.; COSTA, I.R.S. 1992. Core Collections for genebanks with limited resources. In: IBPGR. Internationai Workshop on Core Collections of Planta Germplasm. Brasilia. 20 p. (Inédito).

WATSON, I. 1970. The utilization of wild species in the breeding of cultivated crops resistant to plant pathogens. In: Frankel, O.; Bennet, E. Genetic Resources in Plants. London: IBPGR. p. 441-457.

WEIR, B.S. Sampling properties of gene diversity. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S. (eds.). Plant population genetics, breeding and genetic resources. Mass.: Sinauer Assoc., p. 23-42.

WILLIAMS, J.T. & CREECH, J.L. 1981. Crop genetic resources of the far east and the pacific. Bangkok, IBPGR. 158 p.

--------; LAMOUREUX, C.H. & WULIJARNI-SOETJIPTO, N. 1975. (eds.). South East Asian Plant Genetic Resources. Bogor, IBPGR - SEAMEO / BIOTROP - LIPI. Proceedings..., 272 p.

WILSON, E.O. 1988. The current state of biological diversity. In: Wilson, E.O.; Peter, F.M. Biodiversity. Washington: National Academy Press. p. 3-18.

# Princípios genéticos para recursos genéticos

por Eduardo A. Vilela Morales e Afonso C. Candeira Valois *

## BIODIVERSIDADE

Diversidade biológica ou biodiversidade é um termo freqüentemente associado com a diversidade de espécies, embora apresente um relacionamento ecológico e evolucionário muito mais abrangante (Falk, 1990). Em termos globais a UNEP (1992), considera a biodiversidade como sendo a variabilidade que ocorre entre os organismos vivos de todas as origens e os complexos ecológicos dos quais fazem parte, incluindo diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas. Conseqüentemente, biodiversidade pode ser considerada como o somatório da variação de genes, espécies e ecossistemas que ocorre na natureza (McNeely **et al.**, 1990), que se reflete no número de diferentes espécies, nas diferentes combinações de espécies e nas diferentes combinações dos genes dentro de cada espécie (CGIAR, 1992a; IPGRI, 1993).

O IBPGR (1991) tem definido variação genética como a capacidade de um organismo, população ou espécie, de mudar ou variar sua estrutura hereditária em relação às suas características, forma ou natureza. Considera ainda, por adotar os termos diversidade ou variabilidade para indicar a existência de formas alternativas, que diversidade genética é a quantidade de variação presente em uma população ou espécie, como conseqüência dos processos evolutivos a que foi submetida. Kresovich & McFerson (1992) consideram que diversidade genética, a porção hereditária da variação passível de ser observada, é o material primário onde a seleção natural vem atuado para criar os diferentes organismos vivos da terra.

Weir (1990) sugere que uma forma conveniente para mensurar a variação genética é aquela apresentada pela variação ou diversidade do gene, representada por 1-(soma dos quadrados das freqüência alelicas). Todavia, este autor, lembra que este procedimento é mais apropriado para plantas autógamas que aquele oferecido pela heterozygosidade, uma vez que suas populações embora possuam uma variação significante, apresentam poucos indivíduos heterozigosidade apresentam valores semelhantes. Marshall & Brown (1975) tem sugerido que o melhor mesuramento da diversidade genética da população depende de dois fatores: (a) do número e freqüência dos alelos através dos "loci", e (b) da estrutura genética da população. Por outro lado, Kresovich & McFerson (1992), consideram que dependendo do conhecimento disponível sobre o "taxon", a diversidade genética deve ser considerada a diferentes níveis de organização, como: complexos gênicos ou "genepools", populações, indivíduo, genoma, "locus" e seqüências de bases do DNA.

### Variação genética

Embora diversidade e variabilidade genética sejam termos alternativos para representar a variação genética, sugere-se que diversidade genética seja utilizada para indicar o somatório da informação genética conhecida e potencial (ou ainda desconhecida), e variabilidade genética para indicar a porção da diversidade genética capturada ou disponível.

---

* *Pesquisadores da EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, D.F., Brasil*

Em relação à origem da diversidade na natureza, pelo menos duas situações devem ser analisadas: (1) os centros de origem e (2) os centros de diversidade genética. Enquanto os primeiros estão relacionados com a região geográfica onde se originou uma espécie ou o local onde primeiro foi domesticada, o segundo tipo indica a região ecogeográfica onde ocorre um grau elevado de variação ou de diversidade genética (IBPGR, 1991), e podem ser classificados em dois tipos:

(1) Centros de diversidade primária, onde além da espécie de interesse econômico, social ou cultural, ocorrem espécies silvestres relacionadas que apresentam características primitivas e alta freqüência de caracteres dominantes.

(2) Centros de diversidade secundária, onde ocorrem poucas espécies silvestres relacionadas, os níveis de variação genética são baixos e ocorre alta freqüência de caracteres recessivos.

## COMPLEXO GÊNICO - "GENEPOOL"

No que diz respeito ao aproveitamento sócio-econômico da variação genética é importante levar em consideração o conceito do "genepool" ou complexo gênico. Este complexo está constituído por toda a informação genética encontrada na composição de uma população de organismos de reprodução sexuada, em um dado momento, e geralmente se aplica ao grupo de espécies filogeneticamente relacionadas, que compõem o gênero (IBPGR, 1991). Com o objetivo de oferecer perspectivas para seu aproveitamento nos procedimentos do melhoramento genético de plantas, Harlan & de Wet (1971) propuseram as seguintes categorias:

(1) "Genepool" primário (GP1), onde o cruzamento da espécie de interesse com outras espécies gera progênies férteis e capazes de manifestar os efeitos das trocas gênicas.

(2) "Genepool" secundário (GP2), onde o cruzamento da espécie de interesse com outras espécies gera progênies com níveis variáveis de esterilidade ou fertilidade, mas ainda com possibilidade de manifestar efeitos das trocas gênicas, embora ocorra forte tendência para a obtenção de híbridos estéreis.

(3) "Genepool" terciário (GP3), onde o cruzamento da espécie de interesse com outras espécies gera progênies anômalas, com expressivos índices de letalidade ou completamente estéreis e conseqüentemente incapazes de manifestar os efeitos das trocas gênicas através do uso de procedimentos tradicionais.

Seguindo-se este raciocínio pode-se sugerir, que embora o GP1 permita a obtenção de híbridos interespecíficos férteis, o mesmo nível de afinidade genética que ocorre entre as espécies que os formaram provavelmente, sera o maior entrave para que sejam encontrados caracteres desejáveis muito diferentes daqueles existentes na espécie de interesse. Em relação ao aproveitamento da diversidade genética disponível, os agrupamentos GP2 e GP3 parecem acenar com um enorme potencial de características genéticas desejáveis para incorporar nas espécies de interesse, como pode ser deduzido dos trabalhos de Hodgkin & Debouk (1992), Simpson (1990), Hahn et al. (1980) e Watson (1970).

Assim, embora muitas características venham sendo transferidas para as espécies de interesse através do uso de procedimentos clássicos de melhoramento genético, o nível de eficiência no aproveitamento da diversidade genética aumentará sensivelmente através do desenvolvimento e uso de técnicas biotecnologicas, como aquelas utilizadas para a obtenção de plantas transgênicas. Estes procedimentos poderão permitir que sejam superadas as barreiras biológicas que separam as espécies, de maneira a permitir a transferência de características genéticas desejáveis para as espécies de interesse.

## RECURSOS GENÉTICOS

### Recursos biológicos

O termo recursos biológicos tem sido adotado pela UNEP (1992) para indicar os componentes bióticos

com uso atual ou potencial ou de valor para a humanidade. Embora a termo material genético seja utilizado para designar genótipos, genes e alelos, a UNEP (1992) sugere que este termo deve ser aplicado a qualquer material originado de plantas, animais ou microrganismos, desde que possua unidades funcionais da herança. Considera ainda que o termo recursos genéticos indica o material genético de valor atual ou potencial. Por outro lado, Bennet (1978) considera que os recursos genéticos por residirem em organismos vivos estão não somente em um estado de constante alteração mas são vulneráveis a riscos ambientais semelhantes àqueles que atingem a humanidade.

## Recursos genéticos

No aspecto prático, o IBPGR (1991) utiliza o termo recursos genéticos para indicar o conjunto de amostras populacionais de plantas, animais ou microrganismos, obtidas com o objetivo de tornar disponíveis caracteres genéticos úteis e com valor atual ou potencial. Recursos genéticos vegetais reduzem o universo da diversidade genética para aquele relacionada com a flora e recursos genéticos de *Goiaba* ou recursos genéticos de *Psidium*, para aquela porção da diversidade genética relacionada com esta cultura ou gênero. Sua importância é tão visível, que o CGIAR (1992a) considera os recursos genéticos vegetais como fonte de uma vasta variedade de plantas sobre as quais todas as outras formas de vida terrestre dependem para sua subsistência, além de fornecer as bases para a agricultura.

Embora o conceito para aproveitamento da biodiversidade considere a diversidade genética como um elemento de destaque, pela sua estreita relação com os ambientes onde ocorre, dentro da diversidade de espécies existentes poucas apresentam características genéticas eficientes para atender os diferentes níveis de demanda para uso atual. Entretanto, ao levar-se em conta o relacionamento existente entre os organismos vivos e os ambientes onde se originaram é provável que existam diversas características genéticas, desenvolvidas como mecanismos evolutivos de adaptação ambiental, com interesse atual ou potencial. Por outro lado, na eventualidade de que ocorram mudanças nos atuais fatores de demanda, espécies atualmente consideradas com baixo ou nenhum nível de demanda poderão tornar-se altamente desejáveis no futuro. Conseqüentemente é importante que a variação genética apresentada pelos "genepools" seja considerada como o material genético a ser considerado na organização de um sistema de recursos genéticos, pois leva em conta não somente os fatores de demanda atual, mas também aqueles potenciais ou com características de utilização ainda desconhecidos.

Em relação ao potencial oferecido pela biodiversidade dois aspectos devem ser considerados: (i) a diversidade de espécies nos diferentes biomas e seus ecossistemas; e (ii) os caracteres genéticos de interesse sócio-econômico ou cultural com possibilidade de serem encontrados, Frankel (1978) considera que os recursos genéticos de plantas para uso atual ou potencial para o homem, podem ser agrupados em cinco grandes categorias: (1) cultivares produzidas desde o advento do melhoramento genético científico, geralmente selecionadas pela uniformidade e alta performance; (2) cultivares tradicionais ou primitivas que tem evoluído por centenas ou milhares de anos como resultado da migração, introdução ou seleção natural nos diferentes ambientes em que a cultura foi cultivada; (3) populações silvestres e ervas daninhas relacionadas com cultura; (4) espécies silvestres utilizadas para alimentação humana e animal, fibras e madeira; e (5) espécies de uso potencial.

Por outro lado, Breese (1989) aponta que o principal objetivo a levar em consideração no estabelecimento de sistemas relacionados com a conservação no estabelecimento de sistemas relacionados com a conservação de germoplasma estão relacionados com a captura e manutenção da diversidade genética existente, com o objetivo de ser utilizada pelos processos tradicionais ou avançados de melhoramento genético. Conseqüentemente, este autor considera, para as principais culturas a diversidade genética a considerar deve incluir: (1) cultivares obsoletos e estoques genéticos; (2) cultivares primitivos e "landraces"; e (3) espécies silvestres geneticamente relacionadas.

Em termos globais Wilson (1988) estima que existam entre 5 e 30 milhões de espécies de organismos vivos embora o número atual de espécies descritas seja de 1,4 milhões de espécies com as seguintes proporções: 750.000 de insetos 41.000 de vertebrados, 250.000 de plantas e 360.000 de invertebrados, algas e microorganismos. É facil observar qu estes números poderão aumentar sensivelmente ao serem incluídas espécies ainda não descritas, embora muitas delas já tenham sido coletadas e apresentam valor sócio-econômico potencial. McNeely **et al.** (1990) considera que o Brasil possui uma expressiva biodiversidade, com as seguintes estimativas: 55.000 espécies de plantas superiores ou 22 por cento do total mundial, 3.010 espécies de vertebrados terrestres, 3.000 espécies de peixes de água doce ou três vezes mais que qualquer outro pais e provavelmente 10-15 milhões de insetos (muitos de famílias ainda não descritas).

Em relação ao volume de informação genética disponível, Wilson (1988) considera que as espécies constituem o repositório natural de uma imensa quantidade de informação, com uma quantidade de genes variando desde 1.000 em bacterias até 400.000 ou mais em plantas superiores. Levandos-e em conta a estimativa de 55.000 espécies de plantas superiores para o Brasil e um valor médio de 300.000 genes por espécie, é possível estimar que existam 1.65E(10) genes, embora com elevado grau de duplicação de genes e redundância de sistemas alelicos ou de estruturas gênicas. Todavia, pode-se considerar aceitável a expectativa de que existam muitas estruturas genéticas com características desejáveis, principalmente para fatores relacionados com adaptação ambiental e produção de insumos alternativos ou estratégicos.

Dada a forte tendência cultural e comercial que dominam as relações globais, é importante analisar a incoerência que ocorre em relação à expressiva biodiversidade presentemente disponível em muitos países, onde a diversidade genética disponível aparentemente não é adequada para atender as demandas atuais. Todavia, ao levar-se em conta o potencial de alternativas de variação genética apresentadas e os recursos tecnológicos disponíveis em escala global, deve-se considerar a diversidade genética disponível como uma porção estratégica dos recursos naturais do país. De fato, diversos exemplos vem mostrando que muitas estruturas genéticas quando adequadamente manipuladas podem constituir fontes expressivas de variação genética para a produção de alimentos alternativos, ou para uso medicinal, industrial, ornamental ou cultural. Conseqüentemente, a fundamentação dos processos de desenvolvimento sócio-econômico para o aproveitamento sustentável dos recursos biológicos disponíveis deve não somente levantar, conhecer e conservar a diversidade genética, mas também estabelecer procedimentos prioritários para identificar o potencial utilitário das estruturas genéticas disponíveis.

## Germoplasma

Germoplasma é o material que constitue a base física da herança e se transmite de uma geração para outra através de células reprodutivas (IBPGR, 1991). No sentido mais abrangente pode ser considerado como a soma total dos materiais hereditários de uma espécie (Allard, 1960). No aspecto utilitário, o IBPGR (1991) adota o termo germoplasma para definir um indivíduo ou clone representando um tipo, espécie ou cultura e passível de ser mantido em um repositório. O "The United States National Plant Germplasm System" (1991) utiliza o termo germoplasma vegetal para designar culturas, plantas, sementes, ou outras partes da plantas consideradas úteis para o melhoramento, pesquisa e conservação, sempre com o propósito de estudar, manejar ou utilizar a informação genética que possuem.

Para facilitar seu manejo, o germoplasma está organizado em agrupamentos de gêneros, famílias, produtos ou culturas (para uma única espécie: milho, arroz, feijão, etc.), e até em grupos de produtos ou culturas (para várias espécies: forrageiras, frutíferas, florestais, medicinais, etc.). As principais fontes de germoplasma para a espécie de interesse são suas populações silvestres, cultivares, linhagens e as populações das outras espécies que compõem os diferentes "genepools". Em relação às linhagens,

somente as preliminares ou "pre-breeding lines" e as avançadas ou estáveis devem ser consideradas germoplasma. Já as cultivares devem incluir não somente as formas atuais ou modernas mas, principalmente, as primitivas ou "landraces", além de raças ou ecótipos.

**Acesso de germoplasma**

Acesso é o termo utilizado para qualificar toda amostra de germoplasma que representa a variação genética de uma população ou de um indivíduo propagado clonalmente. Deve-se preferir utilizar o termo acesso e seus equivalentes accesión em espanhol ou accesion em inglês, embora também seja referenciado como entrada, por representar um elemento da coleção, e coleta, para indicar tratar-se de amostras obtidas através de procedimentos de coleta. Na prática, toda acesso quando adequadamente propagado reproduz as características genéticas da população onde foi obtida.

Com o objetivo oferecer um apoio adequado para a demanda atual e futura por germoplasma, as atividades de recursos genéticos devem ser direcionadas para manter disponível o máximo da diversidade genética apresentada pelos "genepools", embora que para atender solitações de germoplasma seja necessário que alguns acessos sejam previamente submetidos a procedimentos de multiplicação. Assim, é importante tornar disponíveis genes, alelos, sistemas alelicos e genótipos, tanto para os acessos com características atualmente desejáveis, como para aqueles que aparentemente não apresentam valor atual, mas que eventualmente poderão vir a tornar-se úteis ou estratégicos.

A conservação da variação genética dos acessos mantidos fora do seu ambiente natural, em coleções de germoplasma "ex situ", representa um permanente desafio para evitar alterações genéticas na amostra populacional submetida à paralisação ou "congelamento" do processo evolutivo que atuava sobre a população no momento da amostragem. Por outro lado, quando a conservação dos acessos é realizada em seu ambiente natural, em reservas genéticas "in situ", o processo evolutivo continua e que com ele novas formas de variação genética podem ocorrer e serem amostradas.

As amostras de germoplasma utilizadas nos procedimentos "ex situ" podem ser classificadas em duas categorias em relação a sua conservação a longo prazo:

(1) Amostra inicial, obtida através de procedimentos de coleta e intercâmbio de germoplasma ou de melhoramento genético. Freqüentemente as amostras iniciais apresentam tamanho inadequado para evitar que ocorram perdas de variação genética, principalmente quando submetidas a procedimentos de multiplicação inicial para permitir sua incorporação na coleção de germoplasma. Quando estas amostras são submetidas a procedimentos de multiplicação inicial, devem ser adotados procedimentos que evitem ou diminuam perdas em variação genética, que se acentuadas poderão provocar uma expressiva descaracterização da amostra em relação à população onde foi obtida. Ao final dos procedimentos de multiplicação inicial, as amostras obtidas constituem a amostra base da coleção e com índice de regeneração zero, para indica tratar-se da amostra inicial para a coleção.

(2) Amostra base, obtida através dos procedimentos de multiplicação inicial da amostra inicial ou diretamente dos procedimentos de coleta ou de intercâmbio de germoplasma quando seu tamanho é adequado para evitar ou diminuir a ocorrência de perdas de variação genética durante os futuros procedimentos de multiplicação e regeneração. O sistema de conservação de germoplasma deverá definir o número de amostras necessárias para conservar cada acesso de germoplasma. Toda vez que a quantidade de amostras base diminua até um número mínimo, por exemplo duas, ou a viabilidade diminua até níveis considerados críticos pelo sistema estabelecido, por exemplo 85 por cento do poder germinativo, uma amostra base deve ser submetida a procedimentos de regeneração, sempre tomando-se os cuidados necessários para evitar ou diminuir perdas ou alterações em variação genética que provocarão sua descaracterização.

Ao final dos procedimentos de regeneração,. as amostras obtidas deverão substituir as amostras remanescentes na coleção de germoplasma e o índice de regeneração deverá ser alterado somando-se o valor um ao índice apresentado pela amostra que foi regenerada.

## ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO GERMOPLASMA

Ford-Lloyd e Jackson (1986), consideram que o padrão da variação genética observada nas culturas resulta da interação de fatores relacionados com: seleção, oscilação genética, mutação gênica, migração e recombinação, onde os dois primeiros provocam redução e os três últimos determinam aumentos nos níveis de variação. Em relação às alterações que diminuem os níveis de variação, o IBPGR (1991) adota o termo erosão genética para indicar a perda de materiais genéticos. Assim, pode-se afirmar que a manutenção da estrutura amostral, durante os procedimentos a que o acesso é submetido, constitue um fator essencial para reduzir os efeitos indesejáveis da erosão genética. Em relação às perdas de material genético, o CGIAR (1992a) destaca os seguintes pontos: (1) a extinção de espécies, particularmente espécies vegetais, significa diminuição de oportunidades para descubrir novas formas úteis; e (2) a erosão genética ou redução da diversidade genética dentro de uma espécie, significa perda da variação necessária para o melhoramento das plantas e ao mesmo tempo aumentos na uniformidade e na vulnerabilidade para fatores adversos.

Conseqüentemente, uma das principais preocupações a considerar no manejo do germoplasma deve ser dirigida a diminuir ou evitar alterações na estrutura genética dos acessos, principalmente sob a seguintes situações:

(1) Seleção natural, que ocorre pelo aumento da proporção de certos genótipos, através de gerações sucessivas, em detrimento de outros, provocada por fatores bióticos e abióticos (IBPGR, 1991). Sua ação pode ocorrer com destaque para os seguintes modelos:

(a) Seleção estabilizadora, centrípeta ou normalizadora (IBPGR, 1991), que permite o favorecimento do material genético em torno da média da população e tende a eliminar formas extremas. Em geral opera sobre populações estáveis mantendo o estado de adaptação em lugar de favorecer mudanças evolutivas.

(b) Seleção direcional, progressiva, linear ou dinâmica (IBPGR, 1991), que favorece a movimentação do material genético na direção de um extremo da população, provocando o desvio da freqüência gênica e reduzindo os genótipos do outro extremo. Em geral ocorre em ambientes em modificação.

(c) Seleção disruptiva ou centrífuga (IBPGR, 1991), que mantém genótipos favoráveis em estado de equilíbrio polimórfico, enquanto diminui ou elimina genótipos desfavoráveis. Freqüentemente ocorre em hábitats heterogêneos.

O efeito da seleção natural pode ocorrer através de alterações, mudanças ou "genetic shift" na estrutura genética do acesso de germoplasma, provocada pela perda de alelos ou pela alteração da freqüência de alelos adaptativos (Russell, 1988). Pode ocorrer de forma acentuada durante os procedimentos de multiplicação inicial ou de regeneração do germoplasma, principalmente quando os procedimentos são realizados em ambientes diferentes daqueles onde o acesso foi obtido. Durante a realização dos procedimentos de regeneração é prudente que sejam observadas precauções adequadas para evitar ou diminuir os efeitos da seleção natural, uma das mais importantes fontes de descaracterização genética dos acessos, cuja ação pode ser vista no quadro a seguir:

(2) Oscilação genética ou Efeito de Sewall Wright ("genetic drift" ou "random drift"), é um dos fatores mais expressivos do processo evolutivo por provocar mudanças aleatórias na freqüência gênica entre gerações através da fixação ao acaso de alelos e o desaparecimento de outros (IBPGR, 1991). Diversas condições de erro amostral podem provocar esta situação, entre as quais tem destaque as seguintes:

(a) Efeito de afunilamento, estragulamento ou "bottle-neck effect", que consiste na perda de alelos de uma população, quando esta é reduzida drasticamente (Russell, 1988). Esta situação pode ocorrer de forma expressiva nos procedimentos de regeneração de germoplasma toda vez que as amostras apresentem expressiva redução de sua viabilidade.

(b) Princípio do fundador ou "founder effect", que ocorre quando a amostra inicial é estabelecida a partir de um pequeno número de indivíduos utilizados para representar uma população (Russell, 1988). Este efeito pode ser freqüentemente observada durante os procedimentos de coleta de germoplasma em que são encontradas poucas plantas e sementes para amostrar uma população.

(c) Efeito do pequeno tamanho populacional ou "small population size effect", que ocorre quando o tamanho da população original permanece pequeno através de varias gerações (Russell, 1988).

Nestes casos, embora os procedimentos de multiplicação inicial possam aumentar a dimensão da amostra, com um sensível aumento de genótipos, a sua estrutura genética sempre será derivada daquela presente na amostra inicial e a variação genética será sempre menor daquela que potencialmente estava disponível na população onde a amostra foi obtida.

(3) Migração, que provoca uma alteração da freqüência alélica de uma população pela inclusão ou migração de alelos de outras populações (Ramalho **et al.**, 1990). Esta situação pode ocorrer durante os procedimentos de multiplicação inicial ou de regeneração de acessos, quando os procedimentos são realizados sem levar em consideração o sistema reprodutivo do acesso, seu nível de panmixia e seu nível de polimorfismo. Pode ocorrer também, pela mistura de acessos considerados fenotipicamente semelhantes mas que pertencem à populações genéticamente diferentes.

(4) Mutação, que consiste na súbita alteração do material responsável pela herança, devido a mudanças nos gene(s) - mutação gênica - ou cromossomo(s) - mutação cromossômica - (IBPGR, 1991). Este tipo de alteração pode ocorrer durante a execução de procedimentos de manejo do

Quadro 1. Alguns fatores causando seleção natural ("genetic shift") na regeneração de populações heterogêneas, de acordo com Breese (1989).

| Estado | Fatores | Procedimento(s) para minimizar |
|---|---|---|
| Germinação da semente que esta en conservação | Diferenças genotípicas em: longevidade e dormência. | 1. Regenerar antes do PG baixar a -85%; e<br>2. Quebrar artificialmente a dormência. |
| Plantula e Estado Vegetativo | Diferenças para sobrevivência, devido a: interação com clima e solo, suscetibilidade a doenças e pragas, e competição | 1. Regenerar em regiões semelhantes aquelas de adaptação ou sobre condições controladas.<br>2. Proteger com produtos fitossanitários.<br>3. Utilizar baixas densidades. |
| Fase Reprodutiva | Produção diferenciada de flores, pólen e sementes por ação de fatores semelhantes ao caso anterior. | 1. Maximizar a produção de cada genotipo utilizando baixas densidades.<br>2. Proteger com produtos fitossanitários.<br>3. Conservar quantidades iguais de sementes. |
| Colheita, separação, secagem e embalagem | Diferenças em maturação e debulha das sementes | 1. Embalar os frutos/infrutescências individualmente. |
| Conservação de semente de alta qualidade | Diferenças em maturação podem influir no potencial de conservação (longevidade) | Semelhante ao caso anterior. |

germoplasma, principalmente aqueles relacionados com a conservação de germoplasma sob procedimentos de criopreservação ou de conservação "in vitro". Assim, no planejamento de um sistema de conservação de germoplasma é importante levar em conta que embora as mutações possam ocorrer em níveis relativamente baixos, como este tipo de alteração ocorre continuamente na natureza pode também, estar afetando o germoplasma mantido a longo prazo em câmaras frigoríficas, pelo contínuo bombardeio de raios cósmicos. Esta situação poderá ser ainda mais danosa em regiões do planeta onde a camada de ozónio está danificada.

## TAMANHO DA AMOSTRA POPULACIONAL

No sentido de relacionar intimamente a amostra com as características genéticas da população que representa é importante que sejam considerados dois fatores: (a) a freqüência alélica mínima ser considerada; e (b) o tamanho efetivo (Ne) considerado na organização da amostra. Para o primeiro caso, é importante definir o nível de representatividade da amostra a ser obtida, geralmente organizada para amostrar e manter alelos ou características genéticas com freqüências acima de cinco ou 10 por cento. Geralmente, pelo efeito no aumento do tamanho amostral, os acessos obtidos não amostram alelos raros encontrados nas populações, assim denominados aqueles alelos que ocorrem com freqüências abaixo de cinco por cento. Por sua vez o tamanho efetivo populacional que deu origem a amostra se constitue no índice indispensável para definir a representatividade genética da amostra e indicar seu nível de endogamia. Em relação ao Ne, duas situações deven ser consideradas: coleta e regeneração.

Durante a execução dos procedimentos de coleta de germoplasma a organização de amostras de populações de plantas autógamas é provavelmente mais difícil que aquelas realizadas em populações de plantas alógamas (Allard, 1970). Vencovsky (1993, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", comunicação pessoal), considera que esta situação pode estar relacionada com a variação genética livre das plantas autógamas em contraste com a variação genética potencial das plantas alógamas. Assim, ao observar-se a segregação de dois locos com dois alelos (Aa e Bb), poderão ser encontrados os seguintes genotipos: (1) para plantas autógamas AABB, AAbb, aaBB, aabb; e (2) para plantas alógamas AABB, AABb, AAbb, AaBB, AaBb, Aabb, aaBB, aaBb, aabb. No primeiro caso nenhuma planta terá todos os alelos, o que deverá dificultar a coleta de germoplasma, em contraste com a variação potencial do heterozigoto AaBb, que tem todos os alelos e dever facilitar os procedimentos de amostragem.

A variação genética livre é de fato uma situação crucial para a coleta de germoplasma em populações de plantas autógamas, pois nelas ocorre uma maior dispersão dos alelos através dos diferentes genotipos da população que em populações de plantas alógamas. Todavia, para os procedimentos de regeneração de germoplasma, com manutenção das características genéticas dos acessos, as amostras de plantas alógamas demandam tamanhos maiores que aqueles exigidos para a regeneração de amostras de plantas autógamas. Durante os procedimentos de regeneração a manutenção da estrutura genética dos acessos dependerá do estabelecimento de um tamanho efetivo populacional ajustado para levar em conta a relação de sexos dos progenitores (número efetivo de progenitores), o grau de endogamia e o número de gerações (IBPGR, 1991). Assim, tamanho efetivo populacional pode ser considerado como sendo a medida da representatividade genética contida na amostra em relação à geração imediatamente anterior (Vencovsky, 1986).

Em relação à coleta de germoplasma, muitos dos procedimentos tradicionalmente adotados tem sido fundamentados sobre estratégias muito mais voltadas à busca de uniformidade que à captura de variação.

Nos procedimentos de coleta de germoplasma vegetal tem sido recomendado coletar 50 sementes por planta matriz e 50 a 100 plantas matrizes por população (Hawkes, 1992). Utilizando parâmetros semelhantes, Vencovsky (1986) tem mostrado que o Ne a ser obtido pode variar expressivamente, desde Ne = 185 (com 50 plantas e 2500 sementes), até Ne = 345 (com 100 plantas e 5000 sementes). Este autor

considera ainda que o valor do Ne poderá ser muito maior e mais representativo (Ne = 484), se 2500 sementes forem coletadas em 150 plantas e com a vantagem da amostra poder representar um número maior de plantas da população e conseqüentemente oferecer uma maior representatividade genética.

Na amostragem de germoplasma de animais domésticos Mariante (1992b), considera que o Ne é profundamente afetado pela relação de machos e fêmeas, ao ponto de quatro machos e quatro fêmeas apresentarem o mesmo Ne que dois machos e 100 fêmeas. Cita ainda: (a) Brem **et al.**, que afirmam ser o Ne maior que 100 adequado para amostrar com sucesso caracteres quantitativos de germoplasma animal; e (b) Maijala e Brem, que apresentam um Ne=100 obtido com 50 fêmeas e 50 machos e um Ne=109 obtido com 60 fêmeas e 50 machos, respectivamente, com índices de endogamia de 0,5 por cento para Ne=100 ou menores para Ne>100. Neste mesmo aspecto, Changhsin (1992) considera que a conservação de populações de raças ou variedades de animais devem considerar valores em torno de 100 animais para grande porte ou de 200 para pequeno porte, desde que o coeficiente de endogamia não passe de 0,1 por cento em 100 anos e exista uma relação de um macho para cinco fêmeas.

É importante levar em consideração que durante a realização dos procedimentos de coleta de germoplasma vegetal, freqüentemente são encontradas situações onde a amostra original somente poderá ser constituída por sementes de um único indivíduo da população e em alguns casos, somente por uma única semente ou planta. Nesta situação a amostra assim obtida somente representará a variação genética presente no indivíduo coletado e provavelmente nunca aquela que caracteriza a população, a não ser que o modo reprodutivo da espécie seja assexual. Todavia, esta situação, embora seja recomendável evitá-la, poderá muitas vezes ser a única fonte de germoplasma com características genéticas desejáveis.

No caso do germoplasma com propagação assexual a variabilidade genética dos acessos está relacionada com aquela encontrada no indivíduo onde a amostra original foi obtida. Nesta situação, um único propágulo ou clone poderá representar a variação genética de toda uma população. Apesar disto, por medida de segurança, é recomendável manter na coleção grupos mínimos de 5 a 6 indivíduos por acesso.

Hallauer e Miranda Filho (1981), apontam diversos trabalhos que consideram o número de 200 a 500 sementes como o tamanho ideal para manter as características genéticas de acessos de plantas alogamas como o milho. Este autores citam Omolo e Russell, que consideram 200 sementes como o tamanho mínimo para propagar um acesso de milho e obter uma população heterogênea sem perdas sensíveis de suas características genéticas, e 80 sementes para obter-se populações com ligeiros níveis de endogamia.

Em relação às alterações genéticas do germoplasma durante os procedimentos de regeneração, Crossa **et al.** (1992) consideram: que a conservação de germoplasma objetiva manter ao menos uma copia de cada alelo da população; que a amostra para regeneração depende da freqüência e número de alelos no locos; e que os modos da ação gênica e interação dos alelos (neutros, recessivos, dominantes, codominantes ou sobredominantes), afetam a distribuição da freqüência alélica em uma população finita. Estes autores ao analisar uma população finita consideram que: (a) contem em média até 11 alelos neutros com freqüências baixas, dois a três alelos com freqüências intermediárias e não mais que um com freqüência alta; (b) para taxas elevadas de mutação amostras com 100 a 250 indivíduos apresentarão uma proporção expressiva de alelos neutros com freqüências baixas, já amostras menores deverão conter graus menores de polimorfismo neutro; (c) sobredominancia é ineficiente para manter um grande número de alelos em uma população finita. Amostras para regeneração compostas por 100 a 300 indivíduos se afetadas pela seleção não deverão manter muitos alelos sobredominantes; (d) amostras iniciais pequenas, menos de 10 indivíduos, apresentarão o efeito do afunilamento, resultando em perda de alguns alelos presentes, com freqüências baixas, na população onde foram obtidas; e (e) mutação

não é um fator significante nos procedimentos de regeneração que utilizem 150-250 plantas. Conseqüentemente estes autores recomendam que sejam assegurados os seguintes aspectos: (1) dispor de amostras de ao menos 100 indivíduos da população como estratégia para manter ao menos uma copia de cada alelo da população; (2) recomenda-se utilizar 150 a 250 indivíduos, com cruzamentos para maximizar o Ne nos procedimentos de regeneração de espécies contendo graus elevados de heterogozidade; e (3) "bulks" balanceados devem ser preferidos para as próximas regenerações.

Vencovsky (1986), aponta que a determinação do Ne para regeneração depende do processo de amostragem adotado para o acesso. Assim, uma amostra de sementes, sem apresentar perdas de viabilidade, obtida como resultado de cruzamentos ao acaso entre todas as plantas oferece duas alternativas: (a) se adotada uma amostragem aleatória em número correspondente aquele da população, o Ne será igual ao número de plantas na população e apresentará alta representatividade genética; (b) se adotada uma amostragem organizada com igual número de sementes para cada planta, a representatividade genética aumentará.

Todavia, Vencovsky (1986) lembra que ao diminuir a viabilidade da amostra, a representatividade genética diminuirá a até situações em que será impraticável recuperar as características genéticas da amostra inicial, como pode ser esperado em situações onde a perda de viabilidade supera os 50 por cento. Neste caso, é importante lembrar que embora o ne possa representar as características genéticas dos progenitores imediatos, a perda de viabilidade será o fator responsável para que mais de 50 por cento dos genótipos não produzam sementes e conseqüentemente ocorra a descaracterização genética em relação à amostra original ou à população amostrada.

Vencovsky (1986) permite visualizar o efeito da freqüência alélica e do Ne nos procedimentos de amostragem para regeneração, através da utilização de intervalos de confiança para os Ne associados a freqüências alélicas. Assim, para um alelo que ocorre com freqüência de cinco por cento o Ne = 75 permitirá que 95 por cento das amostras obtidas no processo de regeneração se localizem entre os limites de 2,11 e 9,81 por cento e que 99 por cento das amostras se localizem entre 1,56 e 11,50 por cento, o que garante, com boa margem de segurança, que não ocorra a perda do alelo. Pelo mesmo raciocínio, para alelos com freqüência menores, como um por cento, o Ne deverá ser estabelecido entre 150 e 250. Vencovsky (1986) considera ainda que o 2Ne na casa das centenas é uma metodologia razoável, embora que para conservarse alelos de populações geneticamente heterogêneas o valor do Ne=1.000 poderá constituir um nível de segurança considerável.

Crossa **et al** (1993), consideram que para a maioria dos caracteres quantitativos, alelos com freqüências menores de cinco por cento pouco contribuem para a média ou variancia do carácter, podendo este, valor ser considerado como apropriado na definição da freqüência alélica a ser considerada nos procedimentos de amostragem. Ao mesmo tempo, lembram que quando a freqüência diminue para valores entre 3 e 1 por cento o tamanho da amostra dobra. Mostram também que a otimização do tamanho da amostra esta mais afetado pela freqüência dos alelos raros que pelo número de alelos ou número de locos, como pode ser observado nas seguintes situações que consideram "locus" com dois, três e quatro alelos:

(1) Para a amostra reter com 90 por cento de probabilidade, pelo menos uma copia do alelo, são necessários:

(a) Para alelos com cinco por cento de freqüência, respectivamente 89, 102 e 110 indivíduos para 10 "loci" ou 45 indivíduos adicionais em cada classe para 100 "loci".

(b) Para alelos com três por cento de freqüência, respectivamente 150, 172 e 186 indivíduos para 10 "loci" ou 75 indivíduos adicionais em cada classe para 100 "loci".

(c) Para alelos com um por cento de freqüência respectivamente 424, 523 e 563 indivíduos para 10 "loci" ou 128 indivíduos adicionais em cada classe para 100 "loci".

(2) Para a amostra reter, com 95 por cento de probabilidade, pelo menos uma copia do alelo, são necessários:

(a) Para alelos com cinco por cento de freqüência respectivamente 100, 116 e 124 indivíduos para 10 "loci" ou 45 indivíduos adicionais em cada classe para 100 "loci".

(b) Para alelos com três por cento de freqüência respectivamente 173, 196 e 209 indivíduos para 10 "loci" ou 76 indivíduos adicionais em cada classe para 100 "loci".

(c) Para alelos com um por cento de freqüência respectivamente 525, 594 e 634 indivíduos para 10 "loci" ou 229 indivíduos adicionais em cada classe para 100 "loci".

## LITERATURA CITADA E CONSULTADA


ABLER, B. S. B.; EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W. 1991. Izoenzimatic: Identification of quantitative trait loci in crosses of elite maize inbreds. Crop Science. v. 31, p. 267-274.

ADAMS, R. P.; ADAMS, J. E. (eds). 1992. Conservation of Plant Genes. DNA Banking and "in vitro" Biotechnology. London: Academic Press, Inc. 345 p.

ALLARD, R. W. 1970. Population structure and sampling methods. In: Frankel, O. H.; Bennett, E. Genetic Resources in plants - Their exploration and conservation. London: Blackwell, p. 97-107.

BENNETT, E. 1970. Tactics o Plant Exploration. In: Frankel, O. H.; Bennett, E. Genetic Resources in plants - Their exploration and conservation. London: Blackwell, p. 117-179.

BEUSELINCK, P. R.; STEINER, J. J. 1992. A proposed framework for identifying, and utilizing germplasm resources. Field Crops Research. v. 29, p. 261-272.

BREESE, E. L. 1989. Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: The scientific background. Rome: IBPGR. 69 p.

BREESE, L. 1989. Multiplication and regeneration of germplasm. In: Stalker, H. T.; Chapman, C. (eds). Scientific Management of Germplasm Characterization: Evaluation and Enhancement. Rome: IBPGR-North Carolina State University. (IBPGR Training Courses: Lecture Series. 2). p: 17-21.

BROWN, A. H. D. 1989 a. The case for core collections. In: Frankel O., Marshall, D. R.; Williams, J. T. (eds.), The use of plant genetic resources. Cambridge: Cambridge University Press, p. 136-156.

———. 1989 b. Core collections: a practical approach to genetic resources managements. Genome, v. 31, p. 818-824.

CHANGHSIN, WU. 1992. In-situ preservation: Suggestion of conservation of animal genetic resources in Asia region. In: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 120-130.

CGIAR, 1992 a. Plant genetic resources - the key to survival. CGIAR FACT SHEET 1. 2p.

———, 1992 b. Conservation estrategies - towards an integrated appoach. CGIAR FACT SHEET 4. 2p.

———, 1992 c. Plant genetic resources - research today to benefit tomorrow. CGIAR FACT SHEET 7. 2 p.

CORDEIRO, C. M. T.; VILELA-MORALES, E. A.; FERREIRA, P.; ROCHA, D. M. S.; COSTA, I. R. S.; VALOIS, A. C. C.; SILVA, S. 1992. Towards a Brazilian core collection for cassava. In: IBPGR. International Workshop on Core Collections of Plant Germplasm. Brasilia: 19 p. Inédito.

CROSSA, J.; JEWELL, D.C.; DEUTSCH, J. A.; TABA, S. 1992. Gene action and the bottleneck effect in relation to sample size for maintenance of cross pollinated populations. Field Crops Research. v. 29 p. 225-239.

———; HERNANDEZ, C. M.; BRETTING, P.; EBERHART, S. A.; TABA, S. 1993. Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections. Theor Appl Genet. v. 86. p. 673-678.

EMBRAPA. 1993. Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia. Plano Diretor do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN. Brasília: 42 p.

FALK, D. A. 1990. Integrated strategies for conserving plant genetic diversity. Ann. Missouri Bot. Gard. v. 77, p. 38-47.

FAO. 1984. Animal genetic resources information. Rome: FAO, 56 p.

———. 1990. Manual of establishment and operation of animal gene banks. Rome: FAO, 67 p.

FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. 1986. Plant Genetic Resources: an introduction to their conservation and use. Edward Arnold. London, 146 p.

FRANKEL, O. H. 1970. Genetic conservation in perspective. In: Frankel, O. H.; Bennet, E. Genetic resources in plants - Their exploration and conservation. Blackwell, Oxford, Edinburgh: p. 469-489. (IBP Handbook No. 11).

———; BENNET, E. 1970. Genetic Resources in plants - Their exploration and conservation. London: Blackwell, 554 p.

——— & SOULE, M. E. 1981. Conservation and Evolution, Cambridge: Cambridge University Press. 327 p.

GIACOMETTI, D. C.; GOEDERT, C. O. 1989. Brazil's National genetic resources and biotechnology center preserves and develops valuable germplasm. Washington: DIVERSITY. v. 5, n. 4, p. 8-11.

———. 1992. The management of genetic resources as a component of biological diversity. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 11 p.

GIANNASI, D. E. 1992. Feasibility of obtaining comparative gene sequence data from preserved and fossil materials. In: Adams, R. P.; Adams, J. E. Conservation of Plant Genes. DNA banking and in vitro biotechnology. San Diego, California: Academic Press, Inc., 75-98.

GILL, K. S. 1989. Role of plant genetic resource collections in research and breeding. In: Brown, A. H. D., Frankel, O. H., Marshall, D. R. and Williams, J. T. (eds.). The use of Plant Genetic Resources. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 3-16.

GOODMAN, M. M.; BIRD, R. M. 1977. The races of maize. IV. Tentative grouping of 219 Latin American races. Economic Botany. v. 31. p. 204-221.

HAHN, S. K.; TERRY, E. R.; LEUSCHNER, K. 1980. Breeding cassava for resistance to cassava mosaic disease. Euphytica, 29 (3): 673-683.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Ames: Iowa State University Press, p. 392-396.

HARLAN, J. R. and WET, J. M. J. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. TAXON. 20, 509-517.

HAWKES, J. G. 1976. Handbook for field collectors. Seed crops, Rome: FAO. 33 p.

———. 1982. Gene banking strategies for botanic gardens. Opera Bot. 113: 15-17.

HENSON, E. L. 1992. In situ conservation of livestock and poultry. Rome: FAO, 112 p. (FAO Animal Production and Health Paper 99).

HODGKIN, T.; DEBOUCK, D. G. 1992. Molecular Genetics in the use of wild species for crop improvement. In: Adams, R. P.; Adams, J. E. Conservation of Plant Genes. DNA banking and in vitro biotechnology. San Diego, California: Academic Press, Inc., p. 153-181.

HOYT, E. 1988. Conserving the wild relatives of crops. Rome: International Board for Plant Genetic Resources - IUCN - WWF. 45p.

HUAMAN, C. Z.; ARBIZU A. C.. 1981. Taxonomia. In: Curso Internacional. Colección, Evaluación, Conservación y Utilización de Recursos Genéticos. Lima: Universidad Nacional Agraria "La Molina"-Centro de Informática para la Investigación Agrícola. 84p.

IBPGR. 1976. Report of IBPGR working group on engineering, design and cost aspects of long-term seed storage facilities. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 19 p.

———. 1991. Elsevier's dictionary of plant genetic resources. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 187 p.

———. 1992. The FAO/IBPGR Expert Consultation on Genebank Standards (26-29 May, 1992). Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 18 p. Inédito.

IPGRI. 1993. Diversity for development. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 62 p.

IUBC. 1980. International code of the nomenclatura for cultivated plants. Bonn: International Union of the biological Sciences - International Comission for the nomenclature of cultivated plants, 31 p.

JENKINS, R. E. 1988. Information management for the conservation of biodiversity. In: Wilson, O. (ed.). Biodiversity Washington: National Academy Press, p. 231-239.

KEMP, R. H.; NAMKOONG, G.; WADSWORTH, F. H. 1992. Conservation of genetic resources in tropical forest management. Principles and concepts. Rome: 105 p. (FAO Forestry Paper 107).

KEYSTONE CENTER. 1988. The Keystone International Dialogue on Plant Genetic Resources. Keystone: Keystone Center. 33 p.

———. 1990. Keystone Madras Dialogue. Washington: Genetic Resources Communication Systems, Inc. 30 p.

KRESOVICH, S.; McFERSON, J. R. 1992. Assessment and management of plant genetic diversity: considerations of intra-and interspecific variation. Field Crops Research. v. 29. p. 185-204.

LANTICAN, R. M. 1988. Recent developments in plant genetic resources conservation work in Southeast Asia. In: Suzuki, S. (ed.). Crop Genetic Resources of East Asia, Proceedings ..., Tsukuba: International Board for Plant Genetic Resources, 286 p.

LLERAS, E. 1991. Conservation of Genetic Resources in situ. Diversity. v. 7, n. 1-2. p. 72-74.

--------; CORADIN, L.. 1985. Palmeras nativas como oleaginosas: situación actual y perspectivas para América Latina. In: Seminario-Taller sobre Oleaginosas promisoras. Informe, Bogotá: p. 92-143.

MARIANTE, A. da S. 1992 a. Identification of breeds/ populations in danger of extinction. In: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 6-14.

--------. 1992 b. Levels of risk and factors affecting breed loss. In: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 15-33.

--------. 1992 c. Ex-situ preervation. In: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal Gene Bank in Asia. Rome: FAO, p. 104-119.

MARSHALL, D. R.; BROWN, A. H. D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: Frankel, O. H.; Hawkes, J. G. Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge: Cambridge University Press. p. 53-80.

MATTICK, J. S.; ABLETT, E. M.; EDMONSON, D. L. 1992. The gene library - preservation and analysis of genetic diversity in Australasia. In: Adams, R. P.; Adams, J. E. Conservation of Plant Genes. DNA banking and in vitro biotechnology. San Diego, California: Academic Press, Inc., 15-35.

McNEELY, J. A.; MILLER, K. R.; REID, W.; MITTERMEIER, R. A. & WERNER, T. B. 1990. Conserving the world's biological diversity. Gland, Switzerland, Washington: IUCN/WRI/CI/WWF-US/World Bank. 193 p.

MONTEIRO, J. S. 1984. Sistema de Informações de Recursos Genéticos Projeto Lógico. Brasília: EMBRAPA/ DMO, 152 p.

NASS, L. L.; PELLICANO, I. J. & VALOIS, A. C. C. 1993. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. Brazil J. Genetics. v. 16, n. 4, p. 983-988.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M. M. 1977. Races of maize in Brazil and adjacent areas. Mexico: CYMMIT, 95 p.

PEETERS, J. P. & WILLIAMS, J. T. 1984. Towards better use of genebanks with special reference to information. Plant Genetic Resources Newsletter, v. 60, p. 22-32.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. B. 1990. Genética na agropecuária. Lavras: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. 359 p.

RUSSELL, P. J. 1988. Genetics. 2a. ed. Glenview. Scott, Foresman and Company. 913 p.

SALHUANA, W. 1985. Strategies for increasing the use of germplasm. In: Pionner H-Bred International, Inc. Report of the Latin American Plant Breeding Research Forum - Latin America's Plant Resources: Abundant Food Supplies for the Future. Caracas: p. 141-172.

SILVA, J. 1988. Programa Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos. In: Encontro sobre recursos genéticos, 1, 1988, Anais. Jaboticabal: UNESP-FCAV. p. 15-22.

SIMON, D. L. 1984. Conservation of animal genetic resources: a review. Livestock Production Science, v. 11, n. 1, p. 23-36.

SIMPSON, C. E. 1990. Introgression of early maturity into *Arachis hypogeae* L. In: American Peanut Research and Education Society, Inc. Proceeding ..., Stone Mountains: p. 49.

SMITH, J. S. C.; DUVICK, D. N. 1989. Germplasm collections and the private plant breeder. In: Brown, A. H. D.; Frankel, O. H.; Marshall, D. R.; Williams, J. T. (eds.), The use of plant genetic resources. Cambridge: Cambridge University Press, p. 3-16.

TAY, C. 1988. Present status management and utilization of tropical vegetable genetic resources at AVRDC. In: Suzuki, S. (ed.). 1988. Crop genetic resources of east Asia. Tsukiba: International Board for Plant Genetic Resources, Proceedings ..., 286 p.

The U.S. 1991. National Plant Germplasm System. Washington: National Academy Press, 171 p. il. (National Academy of Sciences. Managing Global Genetic Resources).

TINGEY, S. V.; RAFALSKI, J. A.; WILLIAMS, J.G.K. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. In: 1992. Application of RAPD technology to plant breeding. p. 3-8.

UNEP. 1992. Convention on Biological Diversity. Rio de Janeiro: United Nations Environment Programme (UNEP), 24 p. (Na. 92-7807).

VENCOVSKY, R. 1978. Herança quantitativa. In: Paterniani, E. (ed.). Melhoramento e produção de milho no Brasil. Fundação Cargill. Piracicaba: ESALQ-USP. p. 122-201.

VENCOVSKY, R.. 1986. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 15 p.

VILELA-MORALES, E. A. 1982. Informática de Recursos Genéticos. In: Encontro de Métodos Quantitativos da EMBRAPA, Memória do Primeiro..., Brasília: EMBRAPA-DMQ. p. 315-323.

--------. 1988. Documentação e informática de recursos genéticos. In: Encontro sobre recursos genéticos, 1, 1988, Anais. Jaboticabal: UNESP-FCAV. p. 135-147.

--------. 1989. Documentação e informática de recursos genéticos em fruticultura. In: Simpósio latino-americano sobre recursos genéticos de espécies hortícolas, 1, Anais. Campinas: Fundação Cargill, p. 128-139.

--------. 1991. Propuesta de plan de trabajo para una acción integrada en el manejo y conservación de los recursos genéticos del trópico sudamericano - PROCITROPICOS. Brasília: IICA, 68 p.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; COSTA, I. R. S.. 1992. Core Collections for genebanks with limited resources. In: IBPGR. International Workshop on Core Collections of Plant Germplasm. Brasília, 20 p. Inédito.

--------. 1993. Regras para denominação e codificação de germoplasma vegetal. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1 v. Inédito.

WATSON, I. 1970. The utilization of wild species in the breeding of cultivated crops resistant to plant pathogens. In: Frankel, O.; Bennet, E. Genetic Resources in Plants. London: IBPGR, p. 441-457.

WEIR, B. S. Sampling properties of gene diversity. In: Brown, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L.; Weir, B. S. (eds.). Plant populatino genetics, breeding and genetic resources. Mass.: Sinauer Assoc., p. 23-42.

WILSON, E. O.; PETER, F. M. 1988. Biodiversity. Washington: National Academy Press. p. 3-18.

# Princípios de documentação para recursos genéticos vegetais *

por Eduardo Vilela Morales **; Jeanete Schmitt Monteiro ***; Rui Américo Mendes **; José Nelson Lemos Fonseca ** e Rodolfo Godoy **

## INTRODUÇÃO

A primeira condição para elaborar a estabelecer uma sistemática para documentação de recursos genéticos, repousa na estrutura e estratégia a disponibilidade de um sistema de recursos genéticos como estrutura fundamental para apoiar as atividades científico-tecnológicas em geral e de melhoramento genético em particular. Seu planejamento, organização e manejo devem levar em conta as atividades a serem realizadas, a fundamentação técnico-científica necessária, o cenário nacional, as experiências institucionais e as alternativas organizacionais. De fato, um sistema de recursos genéticos não pode ser apenas uma estrutura especializada em fornecer amostras de germoplasma ou pior ainda, um museu de germoplasma onde muitas vezes os dados de identificação ou passaporte estão incompletos e aqueles relacionados com as características ou potencialidades de uso do germoplasma são ignorados ou desconhecidos. Um sistema de recursos genéticos deve manter acessos de germoplasma com boa representatividade dos caracteres genéticos encontrados nas populações onde foram obtidos e apresentar níveis satisfatórios de informação sobre suas características e potencialidades, além de apresentar disponibilidade de amostras para atender a demanda dos usuários.

Por outro lado, os procedimentos para recursos genéticos envolvem o uso de elevados níveis de conhecimento técnico-científico com o objetivo de não apenas conservar ou preservar o germoplasma, mas principalmente de estimular e permitir sua utilização, como pode ser observado na proposta clássica apresentada por Frankel & Bennett no início dos anos 80 e 90, nas inovações tecnológicas recentemente disponíveis apresentadas por Adams & Adams em 1992 e na estrutura de um sistema de recursos genéticos apresentada por Giacometti **et al.** em 1989 e pela EMBRAPA em 1993.

## ATIVIDADES TÉCNICAS DE RECURSOS GENÉTICOS

De maneira geral, as atividades podem ser reunidas nos seguintes agrupamentos:

### Prospecção e coleta

Os procedimentos de coleta se destinam a identificar e a obter de forma representativa a variação genética existente nos "genepools" da espécie de interesse, de maneira a torná-la disponível na forma de variabilidade genética. Em termos gerais, as coletas são realizadas sobre dois tipos de populações: (1) **domesticadas**, formadas por populações da espécie de interesse, utilizadas é cultivadas por diferentes comunidades étnicas, incluindo populações regionais tradicionalmente utilizadas, conhecidas como "landraces", com elevada chance de possuirem estruturas genéticas de adaptação eco-geográfica e (2) **silvestres**, formadas por populações primitivas da espécie de interesse econômico, pouco ou não cultivadas a por populações das outras espécies dos "genepools", que constituem uma rica fonte de genotipos, genes, alelos e sistemas alélicos geralmente não disponíveis na espécie de interesse comercial.

---

* *Bases do trabalho desenvolvidas entre 1981-1986.*

** *Pesquisadores da EMBRAPA - CENARGEN, Brasília, DF.*

*** *Analista de Sistemas da EMBRAPA - CENARGEN, Brasília, DF.*

De maneira geral as expedições de coleta são organizadas para coletar germoplasma: (1) de produtos ou culturas tradicionais e com interesse sócio-econômico-cultural; (2) de produtos ou culturas com potencial de uso como formas alternativas; (3) com risco eminente de destruição, através de operações de resgate; e (4) com o objetivo de enriquecer os níveis de variação genética disponíveis.

**Intercâmbio e quarentena**

O livre intercâmbio de amostras de germoplasma é uma prática estabelecida por tradição entre pesquisadores e instituições de pesquisa. Todavia, em função dos riscos fitossanitários e dos interesses sócio-econômicos envolvidos nas trocas, é recomendável que estas ações sejam feitas através de estruturas institucionais especializadas. Nos procedimentos de intercâmbio, os seguintes critérios devem ser considerados estratégicos, embora nem sempre possam ser realizados com o rigor necessário: (a) o tamanho da amostra deve representar a variabilidade genética obtida na população amostrada; (b) a amostra deve estar isenta de pragas e patógenos; (c) os procedimentos de inspeção sanitária devem ser organizados para preservar a estrutura genética da amostra de germoplasma; e (d) os procedimentos de quarentena devem considerar a eliminação da amostra de germoplasma como uma alternativa a ser tomada esporadicamente, se possível somente em casos de necessidade.

Considerando-se o interesse sócio-econômico que apresentam, as amostras podem ser classificadas nas seguintes categorías:

(1) Germoplasma de livre intercâmbio, que inclui espécies de importância social, que em geral não oferecem oportunidade de trocas por outros tipos de germoplasma.

(2) Germoplasma de intercâmbio restrito, geralmente relacionado com espécies que desempenham papel estratégico ou de importância sócio-econômica em nível internacional, oferecendo oportunidade de trocas de germoplasma através de acordos bilaterais e levando-se em conta os aspectos relacionados com a **propriedade intelectual e a lei de proteção de cultivares**.

(3) Germoplasma avançado ou de pesquisa, que inclui linhagens e cultivares comerciais e cuja liberação obedece os procedimentos estabelecidos para o caso de material restrito.

**Conservação**

Conservar e preservar germoplasma em sistemas de recursos genéticos significa manter disponível, o máximo da variação genética existente com o objetivo de torná-la útil para os programas de ciência a tecnologia, principalmente para aqueles relacionados com o melhoramento genético. Assim, é fundamental que para o germoplasma em conservação sejam considerados os seguintes pontos:

(1) O relacionamento filogenético das espécies e a evolução da espécie de interesse.

(2) O volume de diversidade presente nos diferentes "genepools" da espécie de interesse.

(3) As informações sobre a distribuição da diversidade dentro dos "genepools" em relação a fatores climáticos, ecológicos e geográficos.

(4) Desenvolver técnicas que aumentem a eficiência das estratégias para conservação "in situ" e "ex situ".

Os procedimentos utilizados para conservar o germoplasma de recursos genéticos vegetais, com acessos obtidos através de amostras de sementes ou de material clonal de populações, silvestres ou domesticadas, podem ser:

(1) Conservação de comunidades ou populações nos seus locais de origem ("in situ").

(2) Conservação de sementes em câmaras frias (frigorificação entre 4°C e 18°C).

(3) Conservação "in vitro" de tecidos sob condições de baixo desenvolvimento.

(4) Conservação "in vitro" de tecidos, pólen, óvulos, embriões sexuais, embriões somáticos e sementes sob condições de criopreservação.

(5) Conservação a campo do germoplasma propagado clonalmente, originado de sementes recalcitrantes ou de amostras populacionais estratificadas.

(6) Conservação de DNA, fragmentos de DNA e células em estruturas denominadas **bancos genômicos** ou "gene libraries". Esta ação poderá ser útil para conservar espécies com risco de erosão genética, extinção ou com interesse para o desenvolvimento de biotecnologias.

**Caracterização e avaliação**

Estas atividades são consideradas essenciais tanto para estabelecer diferenças ou semelhanças entre acessos de germoplasma, como para estimular sua utilização em programas científicos e de desenvolvimento. Quando possível, devem ser realizadas através de duas etapas: (1) caracterização ou classificação dos acessos por seus caracteres qualitativos; e (2) avaliação ou qualificação dos acessos por seus caracteres quantitativos ou métricos, freqüentemente relacionados com seu potencial de utilização.

A execução destas atividades envolve diferentes tipos de ações complementares, em nível laboratorial ou de campo, dirigidas não somente a características que estimulem sua utilização. Com o objetivo de diminuir o tempo necessário para definir as características e potencialidades do germoplasma, é importante que os procedimentos sobre morfologia, citogenética e avaliação de caracteres utilitários sejam correlacionados com características levantadas através do uso de tecnologias modernas, como izoenzimas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou procedimentos fundamentados no PCR (Polymerase Chain Reaction), como o RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA). Neste aspecto, tem sido lembrado que embora uma análise com isoenzimas em geral pode ser adequada para até dois alelos por locus, análise com RFLP ou RAPDs freqüentemente são mais adequadas para locus com maior número de alelos.

Ao levar-se em conta que a utilização do germoplasma será fortemente influenciada pelo conhecimento de suas características e de sua estrutura genética, é importante que os seguintes aspectos sejam estudados: (1) sistemática e evolução; (2) variação genética e"genepools"; (3) biologia da reprodução e barreiras reprodutivas; (4) mapeamento genético; (5) caracteres morfológicos; (6) caracteres fisiológicos; (7) caracteres de adaptação ambiental; (8) caracteres de resistência a doenças e pragas; (9) caracteres de interesse agrícola ou industrial; e (10) organização de "pre-breeding lines".

**Documentação e informação**

As ações de documentação de germoplasma devem ser dirigidas ao processamento e monitoramento das informações relacionadas com o enriquecimento da variabilidade genética (prospecção, coleta e intercâmbio de germoplasma), cadastramento ou inventário de coleções, monitoramento do estado de conservação e preservação dos acessos, e caracterização e avaliação do germoplasma. As informações devem ser arquivadas de maneira que permitam sua recuperação rápida, integral e consistente. Sugere-se que as informações sejam reunidas nos seguintes agrupamentos: dados de identificação (passaporte), dados de obtenção (coleta ou intercâmbio), dados de caracterização e avaliação, e dados sobre conservação, inventário e disponibilidade de germoplasma.

Para auxiliar o manejo e monitoramento das informações sobre recursos genéticos, tem sido sugerido que seja estabelecida uma série de aplicações correspondentes com as respectivas áreas de atividades como: COLETA, INTERCÂMBIO, COLBASE, COLATIVA e AVALIA (para caracterização e avaliação de germoplasma), reunidas em um SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE RECURSOS GENÉTICOS (SIRG). Considerando que estas atividades apresentam um forte grau de interface com os usuários da comunidade técnico-científica, principalmente com aqueles relacionados com genética, melhoramento genético, ecologia e conservação ambiental, é importante que o SIRG seja implementado em versão multiusuário e preferencialmente em rede nacional, para que a base de dados seja aberta para todos os segmentos da sociedade.

Por outro lado, considerando-se a magnitude das atividades de documentação e informação a serem consideradas em um sistema de recursos genéticos, é importante que além da base da dados sobre recursos genéticos, os esforços sejam direcionados para implementar e/ou dinamizar três outras linhas de ação: (1) automação laboratorial; (2) sistemas geográficos e de sensoriamento remoto para auxiliar nas atividades de conservação "in situ" e de coleta de germoplasma; e (3) sistemas especialistas utilizando inteligência artificial.

## CURADORIA DE GERMOPLASMA

A experiência vem mostrando que embora as ações de recursos genéticos possam ser coordenadas de forma consistente por áreas especializadas, uma eficiência mais acentuada, em relação à continuidade dos trabalhos e à realização de ações especializadas ou pontuais, é obtida através de um sistema de curadorias, onde os especialistas em germoplasma, são os elementos chave, responsáveis pelos avanços, ou eventualmente estagnação, em relação aos objetivos desejados. De fato, levando-se em conta que as diferentes ações para recursos genéticos requerem um enfoque sistêmico porém com ações pontuais, a coordenação e superação das diversas etapas dependerá muito da vontade do curador e do estímulo e apoio institucional que ele receber.

Os resultados apresentados pelas ações de recursos genéticos fundamentadas em especialistas de um produto ou grupo de produtos, preferencialmente especialistas no produto ou espécie, tem sido muito mais promissores que aquelas que apenas levam em consideração estruturas organizacionais. De fato, muitos dos avanços expressivos se devem mais ao interesse individual do Curador de germoplasma que à disponibilidade de estruturas institucionais adequadas. Estes especialistas em recursos genéticos são chamados Curadores de Germoplasma e o conjunto de suas atividades, ações e esforços constituem as ações de Curadoria.

As ações de Curadoria devem ser coordenadas pela instituição responsável pela política e pelas atividades de recursos genéticos em nível nacional. O Curador de Germoplasma deve ser um especialista com a função específica de zelar pelo enriquecimento de variabilidade genética, além da caracterização e avaliação, conservação e documentação do germoplasma sob seu controle. Podem ser consideradas como suas atribuições com maior destaque, as seguintes:

1. No enriquecimento da variabilidade genética das coleções de recursos genéticos.
2. Na conservação e preservação da variabilidade genética.
3. No manejo das informações e utilização dos recursos genéticos.

## INTEGRAÇÃO INSTITUCIONAL

Na definição e implementação de uma estrutura institucional é importante considerar uma organização para apoiar e demandar ações de Curadoria. Sugere-se que na estrutura da instituição base seja evitada a organização de áreas especializadas por atividades, uma vez que experiências passadas tem mostrado que este modelo estimula a compartimentalização das atividades em lugar de promover sua integração e complementação. Talvez o modelo mais adequado seja a manutenção de estruturas institucionais de suporte para as diferentes atividades: herbários, quarentenários, laboratórios de controle de qualidade, laboratórios de caracterização, laboratórios de sistemas geográficos e a organização de projetos para atender objetivos e prazos bem definidos e que demandem para sua execução uma forte interação de integração e complementação de atividades.

Nesta situação, por exemplo, um Projeto para Recursos Genéticos de Milho demandará a realização de diferentes atividades integradas (complementares e cooperativas), relacionadas com: coleta, conservação, caracterização e avaliação de germoplasma, definição e estabelecimento de uma "core collection" e obtenção de "pre-breeding lines", que somente poderão ser realizadas se houver um forte componente de integração intra e inter-

institucional. Provavelmente, as ações realizadas desta forma, poderão ser uma das melhores estratégias para vencer as diferentes barreiras que existem em relação a disponibilidade e utilização do germoplasma.

Neste modelo, é fundamental a organização de uma coleção de base central, localizada na instituição que lidera o sistema nacional de recursos genéticos, para ser utilizada como base nacional de apoio institucional). Como estratégia para diminuir os riscos de perdas de germoplasma, uma duplicata da coleção deve ser organizada obedecendo a mesma metodologia de conservação e preferencialmente localizada junto à instituição nacional que lidera a pesquisa com a cultura ou produto. Ao mesmo tempo, deve ser estimulado o estabelecimento de coleções ativas, ou preferencialmente coleções nucleares, nas diferentes regiões ecológicas onde a cultura ou produto apresenta interesse econômico, social ou cultural. Estas coleções devem estar localizadas junto às instituições que lideram as ações de ciência e tecnologia pertinentes.

## FONTES DE INFORMAÇÃO

### Coleta de germoplasma

1. Todo Coletor, com a colaboração do Curador de Germoplasma, deverá complementar os dados da cadernetа de coleta, promovendo a classificação botânica do germoplasma e completando as codificações e padronizações necessárias, como gênero, espécie, acesso e coordenadas geográficas. A codificação do gênero, espécie e acesso é fundamental para dar consistência às informações e principalmente para facilitar as consultas, embora estas possam ser feitas para outros mecanismos de identificação das amostras coletadas. Para o caso do germoplasma coletado. os códigos de acesso sempre serão novos, pois nunca será coletada uma outra amostra populacional com a mesma estrutura genética, com exceção do germoplasma propagado vegetativamente ou clones. É conveniente que a codificação seja de responsabilidade dos Curadores de Germoplasma.

2. Após atualização ou complementação da cadernetа de coleta, é realizado o processamento dos dados que finaliza com a emissão dos relatórios sobre o germoplasma coletado, com a seguinte ordem: local e quantidade, caracterização ambiental, e dados complementares. Somente após a crítica dos relatórios, pelo Coletor e Curador, serão emitidas etiquetas de herbário, listas de exsicatas, listas de acessos e área eco-geográfica coberta pela expedição de coleta.

3. Após o processamento das correções e separação das subamostras por destinatário, será procedida a conversão do arquivo de coleta para o formato de intercâmbio, como único procedimento para enviar germoplasma para os diferentes destinatários. As amostras de germoplasma serão encaminhadas para os destinatários obedecendo as rotinas estabelecidas para o manejo de germoplasma, como: controle da documentação protocolar; controle das amostras enviadas através de numeração sequêncial por ano; complementação das informações necessárias para os procedimentos de intercâmbio; processamento e emissão dos relatórios de acompanhamento.

4. Excepcionalmente, toda vez que durante a realização da expedição de coleta houver necessidade de proceder divisão das amostras coletadas entre os coletores, é necessário que sejam atendidas as seguintes condições: (1) ter sido considerada esta condição no projeto de coleta; e (2) o germoplasma não ter sido coletado em regiões com interdição fitossanitária. Caso as amostras tenham sido coletadas nestas regiões, o germoplasma deverá obrigatoriamente ser submetido a procedimentos fitossanitários estabelecidos como rotinas institucionais.

### Intercâmbio de germoplasma

1. Toda correspondência de solicitação de germoplasma deverá ser preparada de maneira que os termos utilizados sejam coerentes com procedimentos a serem adotados e ao mesmo tempo permitam o monitoramento da solicitação e o processamento da documentação. Deve-se controlar a correspondência através do

arquivamento da cópia em processo específico. É recomendável que a iniciativa seja iniciada pelo Curador. As correspondências de rotina relacionadas com a comunicação ao solicitante da chegada do germoplasma, de agradecimento ao remetente pelo envio das amostras e aquelas que acompanham o germoplasma solicitado, devem ser emitidas automaticamente, obedecendo formatos, idiomas e protocolos previamente estabelecidos. Todavia, os casos especiais serão tratados separadamente pelo Curador.

2. As listagens emitidas ao final do processamento das informações sobre o **registro de germoplasma** e somente na condição em que a **situação fitossanitária** do acesso indique que o germoplasma foi **liberado**, devem permitir os seguintes acompanhamentos: 1. cópia para arquivo junto ao processo; 2. cópia para o destinatário, que deverá acompanhar a amostra de germoplasma; 3. cópia para conhecimento do Curador; e 4. cópia para o remetente acompanhando a correspondência de agradecimento.

3. Para os acessos de germoplasma que não tenham sido liberados deve ser emitido um relatório de acompanhamento fitossanitário, onde será indicada uma das seguintes situações: 1. ainda em exame laboratorial; 2. em quarentena; e 3. em processo de limpeza. Este relatório deve ser emitido periodicamente de acordo com a data para nova inspeção ou novo laudo indicada na listagem emitida anteriormente. O material após ser liberado, deverá seguir os procedimentos estabelecidos para remessa de germoplasma solicitado.

**Conservação** "ex situ"

A emissão de relatórios deve ser feita periodicamente como mecanismo para orientar os critérios e procedimentos a serem observados no manejo do germoplasma em conservação, como: 1. monitoramento periódico dos padrões do germoplasma sendo conservado; 2. definição do germoplasma que necessita ser regenerado, renovado ou multiplicado; e 3. realização dos procedimentos de multiplicação inicial, regeneração ou renovação. Assim, com o objetivo de monitorar as coleções de forma sistemática, devem ser consideradas as seguintes situações:

1. ***Para coleções de base (COLBASEs)***

a. Lista para monitoramento da qualidade do germoplasma semente conservado em câmaras frias. Relatório mensal por COLBASE-GÊNERO-ESPÉCIE-ACESSO, com indicação dos acessos com data de reanálise para o mês seguinte. Esta condição permitirá retirar com antecedência os acessos armazenados nas câmaras a longo prazo (que preferencialmente somente devem ser abertas uma vez ao mês). Com esta informação, as amostras do germoplasma, que devem ser reanalizadas, são retiradas e encaminhadas ao **laboratório de controle de qualidade.**

b. Lista geral por gênero. Relatório geral COLBASE-Acessos em Conservação, com freqüência semestral, com indicação de sua localização, condição de armazenamento, estado fitossanitário, e indicação sobre disponibilidade de dados de caracterização e avaliação.

c. Lista por localização. Relatório Semestral COLBASE-Localização de Acessos, para indicar a localização dos acessos nas diferentes estruturas de conservação da COLBASE.

2. ***Para coleções ativas (COLATIVAs)***

a. Obtenção e fornecimento de informações. Para isto o Curador de Germoplasma ao revisar periodicamente os dados sobre os inventários nacionais de germoplasma, verifica as prioridades para caracterizar e avaliar acessos ou lotes de acessos, bem como atualiza o **inventário de germoplasma**. Esta atualização visa inclusão dos acessos que não constam do inventário, bem como complementar e corrigir informações. As informações relacionadas com os dados de caracterização e avaliação devem ser obtidas para cada espécie de acordo com as

metodologias estabelecidas pelos **Manuais de Caracterização e Avaliação de Germoplasma.**

b. Emissão de relatórios de acompanhamento. Periodicamente devem ser emitidas diversas listas de informações das COLATIVAs, entre as quais as seguintes apresentam destaque:
   * COLATIVA: Inventário Resumo Semestral, relatório emitido periodicamente para se ter uma visão global da coleção. Consiste em uma listagem indicando o total de acessos incorporados no período, o total de acessos disponíveis, o total de acessos em boas condições e o número de acessos em multiplicação.
   * COLATIVA: Controle de Qualidade, relatório emitido mensalmente para acompanhar, definir e monitorar o controle de qualidade dos acessos. Consiste em uma lista de lotes de acessos, com data definida para análise do PC. Esta informação permitirá retirar de forma organizada os acessos armazenados nas câmaras de conservação e encaminhá-los para análise do PC.
   * COLATIVA: Localização do Acesso, relatório emitido periodicamente para controlar o local de multiplicação ou regeneração, bem como o local de armazenamento dos acessos que compõem a coleção.
   * COLATIVA: Caracterização e Avaliação de Acessos, relatório emitido periodicamente para acompanhar as atividades de caracterização avaliação dos acessos que compõem a coleção.
   * COLATIVA: Inventário Detalhado, relatório completo sobre a coleção deve ser emitido quando necessário.

## Caracterização e avaliação

### *1. Aspectos estratégicos*

O apoio dado para os sistemas de recursos genéticos está diretamente relacionado com seu potencial de utilização. De fato, o desconhecimento do valor sócio-econômico do germoplasma pode ser um dos fatores mais importantes para o baixo nível de sua utilização, embora seja reconhecido seu valor estratégico para as futuras gerações. Esta mesma razão provavelmente seja uma das principais causas para o aparente desinteresse que os programas de desenvolvimento tem apresentado em relação à conservação ou utilização do potencial oferecido pela biodiversidade. Assim, tanto a persistência de baixos níveis de apoio institucional para os esforços de conservação ambiental, especificamente diversidade genética e recursos genéticos, como a sistemática destruição do potencial oferecido pelos diferentes biomas podem ter efeito direto desta situação.

Fica claro que grande parte do apoio a ser dispendido com recursos genéticos deve ser dirigido à sua caracterização e avaliação, sempre com vistas a determinar-se o valor sócio-econômico do germoplasma. É importante que o apoio seja dirigido não somente aos esforços para caracterização e simples separação de acessos do germoplasma, mas principalmente para aquelas características relacionadas com avaliação do potencial oferecido pelos recursos genéticos. Considera-se como atividades altamente prioritárias aquelas relacionadas com o potencial de utilização oferecido pelos recursos genéticos, principalmente em relação aos seguintes aspectos:

a. Como fonte direta ou alternativa de novos produtos ou cultivares.

b. Como fonte de variação genética importante para aumentar a produtividade, capacidade de adaptação a condições ambientais adversas e qualidade do produto a ser obtido.

c. Como fonte de estruturas genéticas importantes para produção de insumos de alto valor sócio-econômico e/ou estratégico, e com potencial de otimização da produção através de transferência para outros organismos.

### *2. Descritores e manuais*

Toda lista de descritores ou variáveis para organizar os Manuais de Caracterização e Avaliação do Germoplasma deve ser realizada através de uma

ação conjunta entre o Curador de Germoplasma, Curadores das Coleções de Germoplasmma e especialistas do produto ou Curadores das Coleções de Germoplasma e especialistas do produto ou espécie de interesse (preferêncialmente relacionados com a botânica, genética e o melhoramento genético). Sugere-se que os descritores sejam organizados sobre listas utilizadas em nível local, nacional e internacional, mas sempre com seus procedimentos bem definidos e previamente validados. Esta condição permitirá que as bases de dados e as informações possam ser facilmente organizadas, consultadas e intercambiadas.

Na organização destes descritores, quatro deles são considerados descritores base ou de amarração com a base de dados de recursos genéticos: Instituição-Unidade, Gênero, Espécie e Acesso. Embora as espécies possam apresentar características muito próximas, é necessário que as listas sejam organizadas para diferenciar os diferentes acessos - ou amostras de diferentes populações - de cada uma das espécies de cada gênero. Assim, para cada Gênero-Espécie deverá ser elaborado um manual com seus descritores específicos, embora alguns deles possam ser comuns para as outras espécies.

No processo de elaboração do manual, sugere-se que sejam definidas e organizadas diversas listas de descritores, que se iniciam por aquelas denominadas "listas mínimas" e continuam através de "listas complementares ou diferenciais", organizadas para serem utilizadas de forma sequêncial. Esta situação permitirá que o germoplasma seja caracterizado e avaliado em diferentes níveis, desde uma ação simples ou "preliminar" até aquelas mais complexas, que demandam tecnologias modernas, pessoal altamente especializado e recursos financeiros mais expressivos.

De maneira geral, os descritores mais utilizados são os seguintes:

a. De identificação ou passaporte.

- Identificação do acesso (código, intensidade de regeneração, tipo, denominações, genealogia e quando pertinente, sistema de melhoramento).
- Classificação botânica do acesso (família, gênero, espécie e raça ou ecótipo).
- Forma de obtenção do acesso (indicação de coleta ou melhoramento e sigla da instituição que o obteve).
- Local de obtenção (país, estado, município, local de coleta ou melhoramento, latitude, longitude e altitude).
- Informações complementares (disponibilidade de informações sobre caracterização, avaliação, estado fitossanitário e outras observações).

b. De coleta

- Informações sobre a expedição (período de coleta, coletores e patrocinadores).
- Identificação do acesso (família, gênero, espécie, código, nome do coletor + nº de coleta, denominação local, data de coleta, interesse econômico e determinador e data da determinação).
- Informações morfológicas do acesso (hábito de crescimento, cor da flor, cor do fruto).
- Informações geográficas (país, estado, região, município, local de coleta, latitude, longitude e altitude).
- Informações ecológicas (meio ambiente, substrato, relevo e freqüência relativa).
- Informações sobre as amostras coletadas (sementes, mudas, exsicatas, plantas, frutos, fotografias e quantidade).
- Outras observações.

c. De intercâmbio

- Informações sobre a documentação (datas de envio pelo remetente e de recebimento pela instituição base remetente e sigla da instituição remetente, destinatário e sigla da instituição destinatária, curador, nº do processo e discriminação do acesso).
- Classificação botânica do acesso (família, gênero, e espécie).

- Identificação do acesso (nº de controle de amostras, código, intensidade de regeneração, tipo, quantidade/unidade, denominações e genealogia).
- Informações sobre procedencia e origem (país, estado, região, município, local, latitude, longitude e altitude).
- Outras observações.

### *3. Informações*

As informações de caracterização e avaliação devem ser obtidas de forma consistente, de maneira que seja possível repetir os resultados quando testados em condições semelhantes. Estas informações, embora possam ser estruturadas para manejar as diversas situações apresentadas pela especificidade das diferentes espécies, devem ser organizadas em bases de dados específicas para cada combinação dos gêneros com suas espécies.

Na organização da base de dados é importante que seja feito um estudo criterioso em relação ao número de descritores utilizados como um balanço em relação às suas qualificações como qualitativos e quantitativos. Deve-se ter em mente a necessidade de organizar listas de descritores que permitam uma clara identificação do acesso, como também estimulem sua utilização pelos programas de melhoramento genético. Provavelmente o abuso na organização de listas de descritores mais voltados para a caracterização do acesso, mas com pouca indicação de suas qualidades ou potencial de utilização, tenha sido a principal causa pelo baixo nível de utilização do germoplasma. Ao mesmo tempo, deve ser feita a organização das informações sob três tipos de agrupamentos: 1. Dados sobre o ambiente. 2. Dados sobre a metodologia utilizada. 3. Dados sobre caracterização e avaliação como pode ser visto a seguir:

a. Local e ambiente
   - Local, latitude, longitude e altitude.
   - Tipo de solo (unidade pedogenética, estrutura física e fertilidade).
   - Clima (temperatura média, precipitação média e umidade relativa média).

b. Período e metodologia
   - Período.
   - Delineamento estatístico.
   - Manejo do experimento.
   - Manejo fitossanitário.

c. Descritores de caracterização e/ou avaliação
   - Morfológicos
   - Citogenéticos
   - Bioquímicos
   - Genético-Moleculares
   - Agronômicos ou Industriais

A disponibilidade de informações de caracterização e avaliação é de fato a condição essencial para estimular a utilização do germoplasma. Todavia, para que estas informações sejam utilizadas freqüentemente ou se transformem em um forte fator de aproximação dos usuários, é importante que sejam organizadas em bases de dados que além de reunir as condições fundamentais da eficiência e da eficácia, permitam ao mesmo tempo, através de um simples manejo, a obtenção de listas estruturadas por critérios definidos pelos usuários, respostas rápidas a consultas decisivas para orientar linhas e ações de pesquisa ou desenvolvimento. Uma das formas correntemente mais utilizada para difundir estas informações é a publicação de catálogos de germoplasma. Entretanto, considerando-se a constante atualização das bases de dados e a facilidade apresentada pelos recursos da moderna informática, parece mais adequado que os catálogos sejam publicados com tiragem limitada e as informações sejam oferecidas através de disquetes contendo as bases de dados especializadas na forma de "catálogos magnéticos de germoplasma".

De forma geral, sugere-se que estas bases de dados sejam abertas para a comunidade técnico-científica do país através de sistemas em rede. Provavelmente com a implementação desta política, as informações presentemente distribuídas através

de instituições e especialistas poderão ser reunidas e mantidas na base de dados especializada. Aparentemente, para que esta situação se torne realidade, é importante que as informações não sejam despersonalizadas e a autoria pela sua obtenção seja destacada. Todavia, o acesso às informações deve ser estruturado de maneira que seja possível atender os diferentes níveis de demanda e proteger, quando necessário, as informações consideradas estratégicas ou altamente potenciais para os processos de desenvolvimento sócio-econômico que o país necessita.

## CÓDIGO E NOMES DO ACESSO

### Denominação do produto

Do ponto de vista prático, quando o germoplasma faz parte de coleções de produtos ou culturas, torna-se importante referenciar o produto ou cultura de forma consistente. Como regra geral pode-se considerar que a denominação está relacionada com a combinação de um gênero com cada uma de suas espécies. Todavia, em certos casos, combinações diferentes podem apresentar a mesma denominação, como pode ser visto no exemplo a seguir:

| | |
|---|---|
| *Citrus aurantium* SWING | LARANJA AZEDA |
| *Citrus limonia* OSBECK | LIMÃO CRAVO |
| *Citrus sinensis* OSBECK | LARANJA DOCE |
| *Annona cauliflora* M. | ARATICUM |
| *Annona crotonifolia* M. | ARATICUM |
| *Annona hypoglauca* M. | ARATICUM |

### Código do acesso

Com o objetivo de serem definidos parâmetros consistentes para identificação dos acessos é recomendável que seja estabelecida uma metodologia segura e única (Vilela-Morales, 1988, 1989). Embora aparentemente possa dificultar os procedimentos de documentação, a utilização de códigos para famílias, gêneros, espécies e acessos parece ser a estratégia mais segura para processar as informações de forma consistente, embora a consulta à base de dados possa ser facilitada pelo uso das denominações. Levando-se em conta o papel dos códigos, é fundamental que seu controle seja feito com bastante rigor. Sempre que possível devem ser utilizadas tabelas de códigos adota-das por instituições com tradição no assunto.

Em relação ao código de família, sugere-se a adoção do sistema de códigos estabelecido pela University of Michigan e adotado no Brasil pelo Programa Flora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Para a codificação de espécies sugere-se que o código utilize seis dígitos, dos quais os quatro da esquerda constituem o código da espécie e os dois da direita são reservados para a codificação da sub-espécie, variedade botânica, etc.

O controle do código do acesso deve ser feito dentro de cada gênero, sendo específico e único para cada acesso do gênero. Cada gênero deve ter um código composto por seis dígitos e hierarquicamente dentro de cada gênero os códigos de acesso podem ser compostos também por seis dígitos, permitindo a codificação de 99.999 gêneros ou acessos, números aparentemente adequados para controlar gêneros de interesse atual e potencial e o total de acessos para cada gênero. Ambos os códigos devem reservar o primeiro dígito da direita para seu uso exclusivo como dígito verificador (DV), controlado pelo sistema de informática como recurso para prevenir ou diminuir a ocorrência de erros durante o processamento das informações, ex: para o número 1 o DV será 9 e o código 000019. É importante, sempre que possível, que o código do acesso seja de caráter nacional, conseqüentemente acompanhado pela sigla do país adotada pela Organização das Nações Unidas (ONU), como por ex: BRA para Brasil.

Uma das mais importantes justificativas para a utilização de um código de acesso reside no potencial oferecido para definir situações de dúvida, como no caso da coleta de dois acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris*), cultivados tradicionalmente em ambientes diferentes, mas com o mesmo nome (Preto). Nesta situação, é preferível manter códigos de acesso diferentes para cada população do que supor que se

trata do mesmo germoplasma e juntar as amostras obtidas. Caso se defina que são acessos diferentes os códigos dados para as amostras de cada procedência serão mantidas dando origem a dois acessos. Por outro lado, se ficar provado, através de procedimentos de caracterização e avaliação, de que se trata do mesmo acesso é necessário deixar como válido o código menor e invalidar o maior.

A utilização de tabelas de códigos com abrangência nacional permite a identificação consistente e única de cada acesso, além de colocar no mesmo nível todas as denominações pelas quais o acesso é reconhecido. Durante as rotinas dos diferentes procedimentos relacionados com recursos genéticos é importante considerar a prática da codificação e denominação de acessos sob os seguintes critérios:

(1) Nos procedimentos de conservação de germoplasma, a codificação do acesso deve ser **essencial** com o objetivo de utiliza-la como identificador único, estável e consistente;

(2) Nos procedimentos de intercâmbio a partir de coleções de germoplasma, a codificação do acesso deve ser **essencial** com o objetivo de manter a consistência de um identificador nacional.

(3) Nos procedimentos de coleta de germoplasma, em situação anterior aos procedimentos de intercâmbio, a codificação do acesso **é opcional** uma vez que existe a possibilidade da amostra coletada ser perdida quando submetida a procedimentos de multiplicação inicial.

(4) Nos procedimentos de intercâmbio, por ocasião do recebimento de acessos ainda não disponíveis no sistema de recursos genéticos, a codificação do acesso deve ser **opcional**, já que existe a possibilidade da amostra recebida ser perdida quando submetida a procedimentos de multiplicação inicial.

(5) Nos procedimentos de intercâmbio, por ocasião do recebimento de acessos disponíveis no sistema de recursos genéticos, a codificação do acesso é **desnecessária**, pois o acesso deve ser eliminado para evitar procedimentos de quarentena.

**Denominação do acesso**

As denominações de acesso podem ser consideradas válidas sob as seguintes situações:

(1) As que obedecem **regras institucionalmente estabelecidas**, como as **Séries BR** adotadas pela EMBRAPA no lançamento de suas cultivares, ex: MILHO BR-201.

(2) Aquelas que foram estabelecidas obedecendo as regras do **Código Internacional para Nomenclatura de Cultivares** (IUBS, 1980), ex: AMARELÃO.

(3) As adotadas por **tradição**, ex: AMARELÃO DO CERRADO.

(4) As **siglas de Instituições seguidas do código local** para o acesso, ex: CNA-3461 (para instituição nacional), ou IRRI-2221 (para instituição internacional).

(5) O(s) nome(s) do(s) coletor(es) mais o número sequêncial do coletor que lidera a expedição, para os acessos obtidos através de procedimentos de coleta de germoplasma, ex: Valls & Coradin 2514.

Para um hipotético acesso: BGA 3461 do gênero Oryza ou Arroz BGA 3461, é recomendável que nos catálogos, inventários e bases de dados de germoplasma seja utilizado o código ou nome do gênero (1503 ou ORYZA), em lugar do nome do produto (ARROZ), como pode ser observado a seguir:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ORYZA | BRA-142450 | BGA 3461, ou | | |
| 01503 | BRA-142450 | BGA 3461 | <= | 1a. denomin. |
| | | AMARELÃO | <== | 2a. denomin. |
| | | BGA 3461 | <== | 3a. denomin. |
| | | VALLS e CORADIN 2514 | <= | 4a. denomin. |
| | | IRRI 2221 | <== | 5a. denomin. |

onde:

| | |
|---|---|
| Oryza = | Nome do gênero |
| ou | |
| 01503 = | Código do gênero |
| BRA-142450 = | Código de Acesso no Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA). |
| BGA 3461 = | 1a. Den., Identificação adotada p/ instituição onde está a coleção. |
| AMARELÃO = | 2a. Den., nome comum, vulgar ou de fantasia mais utilizado. |

| | |
|---|---|
| BGA 3461 = | 3a. Den., identificação adotada p/ instituição nacional que lidera a pesquisa no país e somente utilizada por outras instituições. |
| VALLS & CORADIN 2514 = | 4a. Den., para identificar a coleta - Coletor (es) + No. de Coleta. |
| IRRI 2221 | =5a. Den., identificação adotada p/ instituição internacional que lidera a pesquisa para o produto. |

## SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE RECURSOS GENÉTICOS

Este sistema foi elaborado com o intuito de auxiliar no uso de aplicações sobre a documentação e informação automatizada para recursos genéticos vegetais. As aplicações aqui sugeridas estão fundamentadas na análise e desenvolvimento da versão 3.0 do Sistema de Informações de Recursos Genéticos - SIRG, da EMBRAPA-CENARGEN. Este sistema foi desenvolvido para operar em microcomputadores do tipo IBM-PC de 16 bits e permite atender as seguintes atividades com germoplasma:

1. Coleta, com o aplicativo COLETA.
2. Intercâmbio, com o aplicativo REGISTRO.
3. Conservação "ex situ" através das coleções de base e ativas, com os aplicativos COLBASE e COLATIVA.
4. Monitoramento de tabelas de famílias, gêneros, espécies e siglas institucionais, com o aplicativo TABELAS.
5. Caracterização e Avaliação, com o aplicativo AVALIA.

### Estrutura do SIRG 4.0

O sistema está composto por um número de aplicações correspondente as áreas de atividades de recursos genéticos. Entre estas, as seguintes são consideradas fundamentais:

1. **COLETA**, para documentar, processar e monitorar as informações de germoplasma vegetal obtido por procedimentos de COLETA.
2. **INTERCÂMBIO ou REGISTRO**, para documentar, processar e monitorar as informações que acompanham o germoplasma em atividades de intercâmbio (como importação, exportação e trânsito interno), doação coleta, regeneração, renovação e multiplicação inicial.
3. **COLBASE**, para documentar, processar e monitorar as informações relacionadas com a preservação na Coleção de Base.
4. **COLATIVA**, para documentar, processar e monitorar as Coleções Ativas de Germoplasma mantidas em diferentes instituições do país, e principal fonte dos dados de identificação ou passaporte.
5. **TABELAS**, para documentar e processar informações relacionadas com tabelas de códigos e denominações de famílias, gêneros, espécies e siglas institucionais.
6. **AVALIA**, para documentar, processar e monitorar as informações obtidas nas atividades de caracterização e avaliação do germoplasma.

### Características do SIRG 4.0

O desenvolvimento de um sistema de informações é específico para atender as características de cada instituição. Todavia, para uma primeira fase é recomendável que seja verificado a estrutura oferecida pelo SIRG Versão 4.0, definido para micro-computadores de 16 bits, tipo IBM-PC, com as seguintes características:

***(1) Recursos necessários para cada aplicação***

- Micro PC (pela rapidez necessária sugere-se At, 386 ou 486).
- Sistema Operacional MS-DOS (per versões 3.0 - 6.0).
- 1 disco rígido Winchester, com 80 Mb ou maior.
- Disquetes 5 1/4" ou 3 1/2" (para "back up" de arquivos)
- 1 Impressora
- Papel contínuo
- 1 Operador

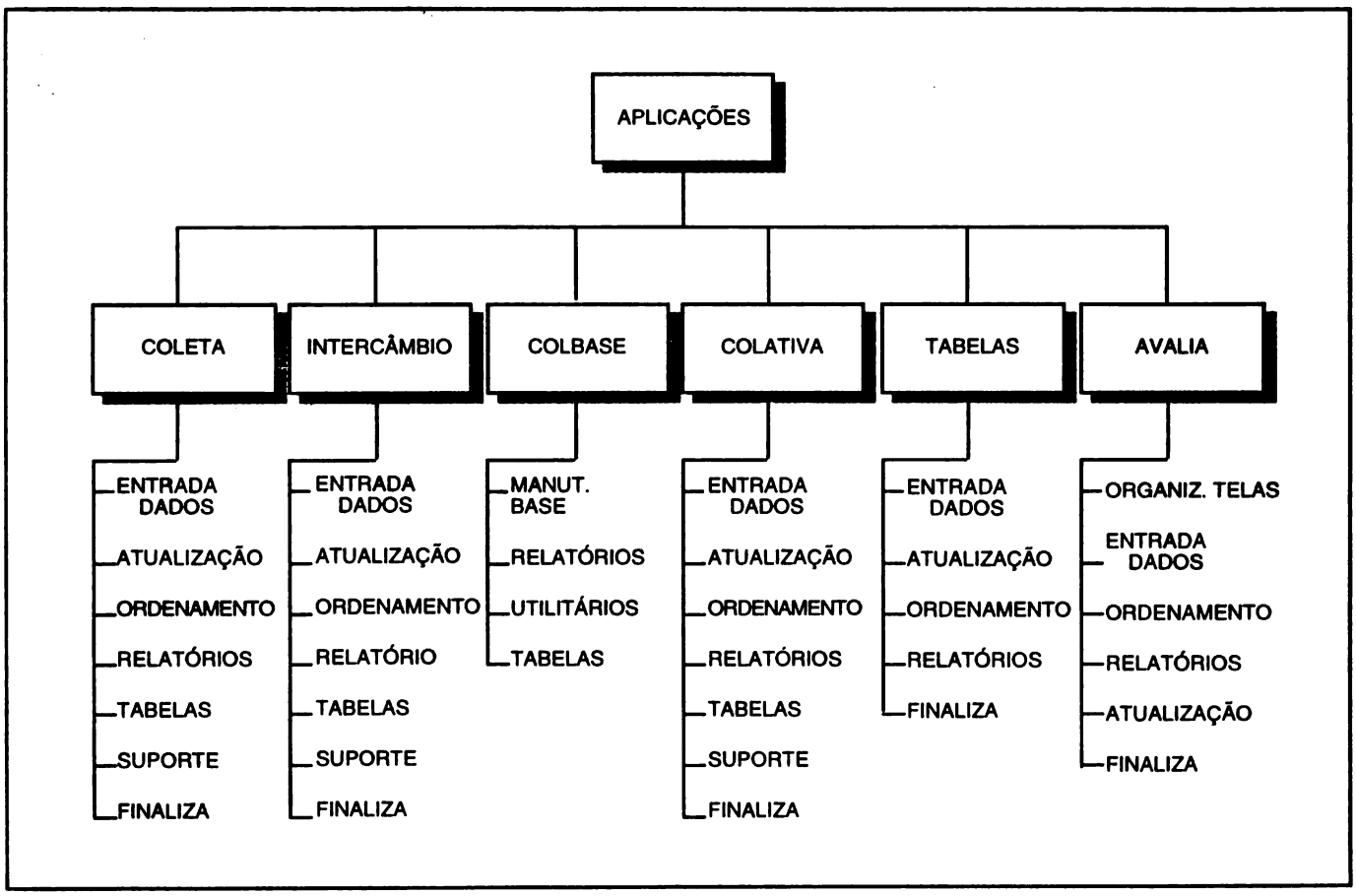



*Figura 1.Aplicações do SIRG 4.0.*

***(2) Base de dados***

a. Tipos de arquivos. Nas aplicações COLETA, REGISTRO, COLATIVA, TABELAS e AVALIA, os arquivos são sequenciais de formato livre mas com indexação binaria para permitir seu acesso randômico. Conseqüentemente, sempre devem ser ordenados antes de serem processadas consultas, relatórios e atualizações. Os arquivos indexados passam a constituir um jogo de três arquivos, sendo um arquivo original e dois indexadores (pelo código e pela primeira denominação dos acessos).

b. Denominação de arquivos. A denominação do arquivo deve ser composta no máximo de oito caracteres para o nome, mais um ponto e três caracteres para a extensão (COL, REG, CAD, AVA, etc.). Em relação às denominações dos arquivos TABELAS - específicos para famílias, gêneros, espécies e siglas - sempre deverão ter a mesma denominação dada ao arquivos CAD.

c. Uso de codificação nos arquivos. Para facilitar o manejo dos dados e permitir consistência nas atividades de intercâmbio em nível nacional e internacional, foram definidos sistemas de codificação para os acessos e as tabelas de famílias, gêneros, espécies e siglas. Objetivando evitar que ocorram erros e duplicações de códigos e considerando ainda que o germoplasma é de interesse para várias coleções que pertencem a diferentes instituições, é conveniente que a codificação dos acessos e sua atualização seja realizada com a colaboração estreita dos Curadores e usuários do sistema.

d. Estratégia de Gravação. As aplicações permitem que novas informações sejam adicionadas nos arquivos de dados existentes. Todavia, a gravação efetiva das informações que estão sendo digitadas somente se processará ao final da sessão. Para evitar-se riscos de perdas das informações digitadas, sugere-se que a cada hora seja finalizada a sessão de entrada de dados ou de correções e a seguir iniciada uma nova sessão.

**Compatibilização de descritores ou variáveis**

Quadro 1. Informações do ACESSO

| Descritores | TIPO | TAM. | COL | INT | CBA | CAD | TAB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Código gênero | N | 5 | x | x | x | x | x |
| Código espécie | N | 4 | x | x | x | x | x |
| Nome Produto ou Cultura | A | 30 | x | x | x | x | x |
| Grupo Racial ou Ecótipo | A | 5 | - | - | - | x | - |
| Código do Acesso | N | 6 | x | x | x | x | - |
| Intensidade Reg/Ren | N | 2 | - | x | x | x | - |
| Tipo acesso | A | 6 | - | - | - | x | - |
| Quantidade/Unidade | N | 9 | - | x | x | x | - |
| Denominação 1 Acesso | A | 40 | x | x | x | x | - |
| Denominação 2 Acesso ou Nome comum no local de coleta | A | 40 | x | x | x | x | - |
| Denominação 3 Acesso | A | 40 | x | x | x | x | - |
| Denominação 4 Acesso ou Identif. de Coleta (Coletor + No.) | A | 40 | x | x | x | x | - |
| Denominação 5 Acesso | A | 40 | - | x | - | x | - |
| COLETA-MELH/Instit. | A | 30 | - | - | - | x | - |
| Local de COL/MELH | A | 110 | x | x | - | x | - |
| Latitude COL/MELH | A | 5 | x | x | - | x | - |
| Longitude COL/MELH | A | 6 | x | x | - | x | - |
| Altitude COL/MELH | N | 4 | x | x | - | x | - |
| Genealogia | A | 110 | - | - | - | x | - |
| Sist. de Melhoramento | A | 110 | - | - | - | x | - |
| Ultimo Local REG/REN | A | 55 | - | - | - | x | - |
| Latitude REG/REN | A | 5 | - | - | - | x | - |
| Longitude REG/REN | A | 6 | - | - | - | x | - |
| Altitude REG/REN | N | 4 | - | - | - | x | - |

Quadro 2. Informações de INTERCÂMBIO.

| Descritores | TIPO | TAM. | COL | INT | CBA | CAD | TAB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Data Processamento ou de Atual./Cadastr. | N | 6 | - | x | - | - | - |
| No. Lote Germoplasma | N | 5 | - | x | - | - | - |
| Data Envio pelo Remet. | N | 6 | - | x | - | - | - |
| Data de chegada do germ. | N | 6 | - | x | - | - | - |
| Nome do Remetente | A | 30 | - | x | - | - | - |
| Cod. Instit. Remetente | N | 10 | - | x | - | - | x |
| Nome do Destinatário | A | 30 | - | x | - | - | - |
| Cod. Curador | N | 4 | - | x | - | - | - |
| Cod. Instit. Destinatária | N | 10 | - | x | - | - | x |
| Discriminação Registro | N | 1 | - | x | - | - | - |
| No. do Processo | N | 6 | - | x | - | - | - |
| No. Controle da Amostra | N | 8 | - | x | - | - | - |
| Observações | A | 110 | x | x | - | x | - |

Quadro 3.Informações de COLETA.

| Descritores | TIPO | TAM. | COL | INT | CBA | CAD | TAB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Período de Coleta | A | 15 | x | - | - | - | - |
| Nome(s) do(s) Coletor(es) | A | 110 | x | - | - | - | - |
| Patrocinador(es) | A | 55 | x | - | - | - | - |
| Data de Coleta do Acesso | N | 6 | x | - | - | - | - |
| Determinador/Data Determ. | A | 27 | x | - | - | - | - |
| Material Coletado | A | 27 | x | - | - | - | - |
| Hábito de Crescimento | A | 56 | x | - | - | - | - |
| Cor da Flor | A | 29 | x | - | - | - | - |
| Cor do Fruto | A | 27 | x | - | - | - | - |
| Interesse Econômico | A | 28 | x | - | - | - | - |
| Ambiente Geral | A | 57 | x | - | - | - | - |
| Substrato | A | 57 | x | - | - | - | - |
| Relêvo | A | 27 | x | - | - | - | - |
| Freqüência Relativa | A | 23 | X | - | - | - | - |
| País | A | 3 | x | - | - | - | - |
| Região Geopolítica | A | 23 | x | - | - | - | - |
| Unidade da Federação | A | 20 | x | - | - | - | - |
| Município | A | 22 | x | - | - | - | - |
| Latitude da Coleta | A | 5 | x | x | - | x | - |
| Longitude da Coleta | A | 6 | x | x | - | x | - |
| Altitude da Coleta | N | 4 | x | x | - | x | - |
| Local de Coleta | A | 110 | x | x | - | x | - |
| Observ. Gerais | A | 110 | x | x | - | x | - |
| Observ. Complementares | A | 110 | x | - | - | - | - |
| Quantidade Coletada/Unid. | A | 9 | x | x | - | - | - |
| Quantidade Coletada/Unid. | A | 9 | x | - | - | - | -Quantidade |
| Coletada/Unid. | A | 9 | x | - | - | - | -Quantidade |
| Coletada/Unid. | A | 9 | x | - | - | - | -Quantidade |
| Coletada/Unid. | A | 9 | x | - | - | - | -Quantidade |
| Coletada/Unid. | A | 9 | x | - | - | - | - |

Quadro 4. Informações da COLBASE.

| Descritores | TIPO | TAM. | COL | INT | CBA | CAD | TAB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| No. do Processo | N | 6 | - | x | x | - | - |
| Intensidade Reg/Ren | N | 2 | - | x | x | x | - |
| PG Mínimo Armazenamento | N | 3 | - | - | x | - | - |
| Quant. Min. Arm./Unid. | N | 7 | x | - | x | - | - |
| Poder Germinativo Anter. | N | 3 | - | - | x | - | - |
| Data Ant. da Análise | N | 4 | - | - | x | - | - |
| PG Viabilidade Atual | N | 3 | - | - | x | - | - |
| Data Análise PG Atual | N | 4 | - | - | x | - | - |
| Data Armazanamento | N | 4 | - | - | x | - | - |
| Número Prop. Arm./Unid. | N | 7 | - | - | x | - | - |
| Localização na Câmara | A | 9 | - | - | x | - | - |
| Situação Reg/Ren | N | 1 | - | - | x | - | - |
| Situação Fitossanitária | N | 1 | - | - | x | - | - |
| Situação Caract./Aval. | N | 1 | - | - | x | - | - |

Quadro 5. Informações da COLATIVA.

| Descritores | TIPO | TAM. | COL | INT | CBA | CAD | TAB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Código Colativa | N | 10 | - | - | - | x | - |
| Condição de Caract. | A | 55 | - | - | - | x | - |
| Condição de Avaliac. | A | 55 | - | - | - | x | - |
| Quant. Existente/Unidade | A | 9 | - | - | - | x | - |
| Data Análise PG | N | 4 | - | - | - | x | - |
| Valor do PG | N | 3 | - | - | - | x | - |
| Observações | A | 110 | x | x | - | x | - |

Quadro 6.Tabelas de apoio para famílias, gêneros, espécies e siglas.

| Descritores | TIPO | TAM. | COL | INT | CBA | CAD | TAB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Código Família | N | 8 | - | - | - | - | x |
| Nome Família | A | 30 | - | - | - | - | x |
| Ref. Bib. Família | N | 5 | - | - | - | - | x |
| Código Gênero | N | 5 | x | x | x | x | x |
| Nome Gênero | A | 25 | - | - | - | - | x |
| Ref. Bib. Gênero | N | 5 | - | - | - | - | x |
| Código Espécie | N | 4 | x | x | x | x | x |
| Nome Espécie | A | 65 | - | - | - | - | x |
| Ref. Bib. Espécie | N | 5 | - | - | - | - | x |
| Nome Produto ou Cultura | A | 30 | - | - | - | - | x |
| Ref. Bib. Produto | N | 5 | - | - | - | - | x |
| Código Instituição | N | 10 | - | x | - | x | x |
| Sigla Instituição | A | 30 | - | - | - | - | x |

*(*) Presença dos decritores nas aplicações: COL=Coleta; INT=Intercâmbio; CBA=Colbase; e CAD=Colativa*

*- Tipo do descritor: A=Alfanumérico; e N=Numérico*

**Recursos dos aplicativos do SIRG 4.0**

***1. Aplicação COLETA***

a. Entrada de dados: Digitação.

b. Consulta/Atualização/Correção.

c. Ordenamento de Arquivos.

d. Emissão de Relatórios.

e. Tabelas de Apoio: FAM/GEN/ESP.

f. Programas de Suporte.

***2. Aplicação REGISTRO***

a. Entrada de dados: Digitação.

b. Consultas/Atualização/Correção.

c. Ordenamento de Arquivos.

d. Emissão de Relatórios.

e. Tabelas de Apoio: FAM/GEN/ESP/SIG.

f. Programas de Suporte.

***3. Aplicação COLBASE***

a. Manutenção da Base.

b. Relatórios.

c. Utilitários do Sistema.

d. Manutenção de Tabelas.

***4. Aplicação COLATIVA***

a. Entrada de dados: Digitação.

b. Consultas/Atualização/Correção.

c. Ordenamento de Arquivos.

d. Relatórios.

e. Tabelas FAM, GEN, ESP e SIG.

d. Programas de Suporte.

***5. Aplicação TABELAS - FAM/GEN/ESP/SIG***

a. Entrada de dados.

b. Consulta/Atualização/Correção.

c. Ordenamento de Arquivos.

d. Relatórios.

e. Separação de arquivos FAM/GEN/ESP/SIG.

***6. Aplicação AVALIA***

a. Organização de Telas.

b. Entrada de dados: Digitação.

c. Ordenamento de Arquivos.

d. Relatórios.

e. Atualização/Correção.

## LITERATURA CONSULTADA E RECOMENDADA

BREESE, E. L. 1989. Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: The Scientific background. Rome: IBPGR, 69 p.

BREM, G.; BRENIG, B.; MULLER, M.; SPRINGMANN, K. 1989. Ex situ cryoconservation of genomes and genes of endangered cattle breeds by means of modern biotechnological methods. Rome: FAO. 123 p. (FAO - Animal Production and Health Paper 76).

--------. 1990. Future biotechnological possibilities in preserving animal germplasm. In: FAO. Animal genetic resources. A global programme for sustainable development. Rome: FAO, p. 59-67. (FAO-Animal Production and Health Paper 80).

BROWN, A.H.D. 1989a. The case for core collections. In: The use of plant Genetic Resources. Frankel, O., Marshall, D.R. & Williams, J.T. (eds.). Cambridge: Cambridge University Press, p. 136-156.

--------. 1989b. Core collections: a practical approach to genetic resources managements. Genome, v. 31, p. 818-824.

CORADIN, L. 1990. Coleta de germoplasma. Brasília: CENARGEN, 26 p.

ESQUINAS ALCÁZAR, J.T. 1982. Los Recursos Fitogenéticos una inversión segura para el futuro. Madrid: IBPGR, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias/ España, 44 p.

FAO. 1984. Animal genetic resources information. Rome. 56 p.

--------. 1990. Manual of establishment and operation of animal gene banks. Rome: FAO, 67 p.

FRANKEL, O.H. & BENNET, E. 1970. Genetic resources in plants. Oxford: Blackwell, 554 p. (IBP Handbook, 11).

-------- & HAWKES, J.G. 1975. Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge. Cambridge University Press. 492 p. (IBP. 2).

-------- & SOULE, M.E. 1981. Conservation and evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 327 p.

GIACOMETTI, D.C. & GOEDERT, C.O. 1989. Brazil's National Genetic Resources and Biotechnology Center preserves and develops valuable germplasm. Diversity. v.5, n.4, p. 8-11.

HENSON, E.L. 1989. In situ conservation of livestock and poultry. Rome: FAO, 112p. (FAO Animal Production and Health Paper 99).

HERSH, G.N.; TOGERS, D.J. 1975. Documentation and information requirements for genetic resources aplication. In: Crop genetica resources for today and tomorrow. Frankel, O.H. & Hawkes, J.G. (eds.). Cambridge. Cambridge University Press. p. 407-446.

HOYT, E. 1988. Conserving the wild relatives of crops. Rome: IBPGR - IUCN - WWF. 45 p.

IBPGR. 1976. Report of IBPGR working group on engineering, design and cost aspects of long-term seed storage facilities. Rome. 19 p.

--------. 1983. Practical constraints affecting the collection and exchange of samples of wild species and primitive cultivars. Rome. 11 p. (IBPGR Secretariat - Report).

--------. 1984. Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. Rome. 17 p. (IBPGR Secretariat - Report).

--------. 1985. Ecogeographical surveging and in situ conservation of crop relatives. Rome. 27 p. (IBPGR Secretariat Report).

--------. 1986. Design, planing and operation of in vitro genebanks. Rome. 17 p. (IBPGR Secretariat - Report).

--------. 1988. Conservation and Movement of vegetatively propagated germplasm: in vitro culture and disease aspects. Rome: 27 p. (IBPGR Secretariat - Report).

INSTITUT FUR PFLANZENBAU UND SAATGUT-FORSCHUNG. 1978. Technical aspects of information management and means of comunication in plant genetic resources work for a future utilization of genetic material in plant breeding. In: Proceeding of a colloquium held in Braunschweig on 7th and 8th November 1978. Braunschweig. 100 p.

INFORMATION SCIENCES/GENETIC RESOURCES PROGRAM. GDM. 1979. A computer based germplasm data management system. Boulder: University of Colorado. 15 p.

--------. 1979. User's manual for the germplasm data management system. Boulder: University of Colorado. 56 p.

KEMP, R.H.; NAMKOONG, G.; WADSWORTH, F.H. 1992. Conservation of genetic resources in tropical forest management. Principles and concepts. Rome, FAO. 105 p. (FAO Forestry Paper 107).

KONOPKA, J. & HANSON, J. 1985. Documentation of genetic resources: information handling systems for genebank management. Rome: IBPGR. 87 p.

LLERAS, E. 1991. Conservation of genetic resources in situ. Diversity. v.7, n.1-2, p. 72-74.

McMILLAN, C. & HANLEY, J.R. 1978. Data base management systems: an initial assessment for the agricultural research center. Boulder: University of Colorado-Information Sciences/Genetic Resources Program. 17 p.

MARIANTE, A. da S. 1992 a. Identification of breeds/population in danger of extinction. In: Animal gene bank in Asia. Chupin, O.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Rome, FAO.p. 6-14.

--------. 1992 b. Levels of risk and factors affecting breed loss. In: Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Animal gene bank in Asia. Rome, FAO. p. 15-33.

--------. 1992 c. Ex-situ preservation. In: Animal Gene Bank in Asia. Chupin, D.; Yaochun, C.; Zhihua, J. (eds.). Rome. p. 104-119.

McNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.; MITTERMEIER, R.A. & WERNER, T.B. 1990. Conserving the world's biological diversity. Gland, Switzerland, Washington: IUCN/WRI/CI/WWF-US/World Bank. 193 p.

MONTEIRO, J.S. 1984. Sistema de informações de recursos genéticos - Projeto lógico. Brasília: EMBRAPA/DMQ-CENARGEN.

PEETERS, J.P. & WILLIAMS, J.T. 1984. Towards better use of gene-banks with special reference to information. Plant Genetic Resources Newsletter, v.60, p. 22-32.

ROGERS. 1974. The documentation of plant genetic resources. A background paper. Rome FAO, 18 p. (ASPE: MISC/4).

SIMON, D.L. 1984. Conservation of animal genetic resources: a review. Livestock Production Science, v. 11, n.1, p. 23-36.

STALKER, H.T.; CHAPMAN, C. 1989. Scientific management of Roma. IBPGR. 194 p. (IBPGR Tralning Courses: Lecture Series 2).

THE U.S. NATIONAL PLANT GERMPLASM SYSTEM. 1991. Washington: National Academy Press, 171 p. 11. (National Academy of Sciences. Managing Global Genetic Resources).

VENCOVSKY, R. 1986. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. Brasília: CENARGEN. 15 p.

VILELA-MORALES, E.A. 1979. CENARGEN-BAGs: Manejo dos recursos genéticos vegetais no Brasil. In: EMBRAPA-CENARGEN. Simpósio de Recursos Genéticos Vegetais. Sessão I. Bancos Ativos de Germoplasma. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 39-46.

--------. 1982. Informática de recursos genéticos. In: EMBRAPA, Encontro de Métodos Quantitativos da EMBRAPA, Memória do Primeiro. Brasília: EMBRAPA-DMQ, p. 315-323.

-------.1982. A informática de recursos genéticos e a pesquisa agropecuária. In: Primeiro Curso de Recursos Genéticos. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 13 p.

VILELA-MORALES, E.A.. 1988. Documentação e informática de recursos genéticos. In: Encontro sobre recursos genéticos. Primeiro. Jaboticabal: UNESP-FCAV, p. 135-147.

--------. 1990. Documentação e informática de recursos genéticos em fruticultura. In: Simpósio latino-americano sobre recursos genéticos de espécies hortícolas, Primeiro. Campinas: Fundação Cargill, Anais... p. 128-139.

-------- & MENDES, R.A. 1983. Reunião sobre recursos fitogenéticos de interesse agrícola no Cone Sul. Relatório do Centro Nacional de Recursos Genéticos. Brasília. EMBRAPA-CENARGEN. 171p.

--------; VALOIS, A.C.C.; COSTA, I.R.S. 1992. Core Collections for Genebanks with Limited Resources. In: IBPGR. International Workshop on Core Collections of Plant Germplasm. Brasilia. 20 p.

WOODFORD, M.H. 1990. Cryogenic preservation of wild animal germplasm. In: FAO. Animal genetic resources. A global programme for sustainable development. Rome, FAO. p. 59-67. (Animal Production and Health Paper, 80).

# Conservação de germoplasma-semente no CENARGEN e Interface com os BAGs

por Francisco Ricardo Ferreira *

## INTRODUÇÃO

O Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN tem como missão "assegurar a diversidade de recursos genéticos e desenvolver metodologias e processos biotecnológicos visando a sua utilização em beneficio da sociedade". Nesta missão está implícita a conservação de germoplasma a longo prazo, ou seja, a conservação da coleção de base.

Para desenvolver esta atividade de conservação de germoplasma a longo prazo, o CENARGEN, trabalha em estreita cooperação com a rede nacional de bancos ativos de germoplasma (BAGs), em que, parte do trabalho é realizado no CENARGEN e parte no BAG.

De acordo com inventário realizado por Kornelius (1992), e mais recentemente publicado no folder de conservação de recursos genéticos do CENARGEN (1993), existem cerca de 80 BAGs localizados em várias unidades do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), distribuídos em 20 estados brasileiros. Deste total, apenas 28 operam com espécies de sementes ortodoxas, os quais serão abordados neste trabalho.

## CONSERVAÇÃO DA COLEÇÃO DE BASE NO CENARGEN

De acordo com o glossário do Geneflow do IBPGR (1992), coleção de base de germoplasma é uma coleção de acessos armazenados a longo prazo desde 1°C até - 20°C e não utilizada para distribuição. Complementando, pode-se dizer que é a coleção que mantém todos os acessos de um determinado produto, incluindo acessos utilizáveis em programas de pesquisa a curto, médio e longo prazos, e ainda aqueles de importância potencial. Esta coleção é considerada como o repositório básico ou fundamental da variabilidade genética do germoplasma, e deve obrigatoriamente manter acessos dos tipos: cultigens, indigens, populações silvestres, raças regionais, linhagens, híbridos, variedades comerciais, etc.

A coleção de base deve ser conservada de forma integral e permanente, visandose permitir a disponibilidade atual e futura de germoplasma com grau elevado de variabilidade genética. De acordo com as normas do IBPGR a coleção de base do acervo genético de um produto ou de uma espécie qualquer, pode estar duplicado em várias instituições. Porém, no caso brasileiro, toda coleção de base do germoplasma conservado na forma de sementes, está no CENARGEN. Há de se destacar que, temos duplicatas totais ou parciais, de algumas coleções internacionais, como é o caso do feijão o cevada.

### Infra-estrutura para conservação

O CENARGEN dispõe de quatro câmaras pré-moldadas, operando a -20°C, sem controle da umidade relativa, para o armazenamento de sementes a longo prazo. Cada câmara tem um volume aproximado de 47m³, perfazendo um total de 188 m³, o que é suficiente para armazenar cerca de 100.000 acessos na forma de sementes de tamanho médio. Estão sendo adquiridas mais dois unidades, visando aumentar em 50 por cento a capacidade instalada.

---

* *Pesquisador EMBRAPA/CENARGEN*

Existem mais três câmaras, que dão apoio ao sistema de conservação a longo prazo. A primeira câmara, denominada de "câmara de espera", opera a 10°C e 30 por cento de umidade relativa; e é utilizada para armazenar os materiais que chegam ao CENARGEN até que haja condições para prepará-los para a conservação a longo prazo. A segunda câmara, denominada de "câmara de secagem" funciona a 22° e 15 por cento de umidade relativa e destina-se a secagem das sementes até o ponto de umidade recomendado para o armazenamento a longo prazo. A terceira delas funciona a 5°C e 30 por cento de umidade relativa, condições estas, preconizadas para conservação a curto e médio prazos.

O Sistema de conservação a longo prazo conta com três laboratórios, que dão suporte aos trabalhos de rotina e de pesquisa. O Laboratório de Preparo de Amostras (LPA) se incumbe do recebimento, limpeza, divisão de amostras, secagem, embalagem e armazenamento das sementes. No Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) são realizados os testes da qualidade fisiológica das sementes, notadamente teste de germinação, das partidas iniciais para armazenamento a longo prazo e das monitorações periódicas do material armazenado. O Laboratório de Patologia de Sementes (LPS) é responsável pelo inventário da qualidade sanitária das sementes a serem armazenadas e também daquelas conservadas a longo prazo, principalmente no que diz respeito à micologia.

Os três laboratórios trabalham de forma harmônica e integrada, promovendo um fluxo normal e contínuo, tanto das sementes, quanto das informações a elas referentes. As informações no entanto, são manejadas de forma centralizada, através de microcomputador 486 específico para este fim que brevemente estará ligado em rede com as demais áreas do CENARGEN e com o Sistema Brasileiro de Informação de Recursos Genéticos (SIBRARGEN).

A Área de Conservação de Recursos Genéticos conta ainda com várias casas-de-vegetação e telados, que dão suporte ao sistema de conservação a longo prazo.

**Recursos Humanos**

O Sistema de conservação a longo prazo, no CENARGEN, conta com uma equipe de dez pesquisadores e nove auxiliares, alguns deles trabalhando em tempo parcial nesta atividade. Normalmente, no entanto, nos últimos anos cerca de 20 a 30 por cento dos pesquisadores tem estado participando de treinamento, a nível de pós-graduação, portanto fora da base física operacional.

O pessoal de apoio trabalha exclusivamente na rotina da coleção de base, já os pesquisadores, além da rotina, desenvolvem projetos de pesquisas, cujo trabalho operacional é feito pelos próprios pesquisadores, auxiliados por estagiários e/ou bolsistas.

De maneira geral, os pesquisadores são bem qualificados para a função que desempenham, a maioria possui curso de pós-graduação, a nível de mestrado ou doutorado, em sementes e/ou conservação de recursos genéticos.

**Padrões de Qualidade das Amostras**

O CENARGEN adota os padrões internacionais de qualidade das amostras de sementes, estabelecidos pelo IPGRI. Algumas adaptações, no entanto, são necessárias, as quais dependem das circunstâncias e das espécies, que estão sendo trabalhadas.

Na quinta reunião da Comissão de Recursos Fitogenéticos de "experts" da FAO/CIRF (1993), realizada em Roma em abril de 1993, estabeleceram-se normas para bancos de genes, as quais, principalmente no que concerne às condições de armazenamento, número de sementes viáveis e controle de viabilidade, são apresentadas a seguir. Segundo estas normas, as condições de armazenamento das sementes de uma coleção de base, podem ser de dois níveis:

- *Aceitável*: temperaturas inferiores a zero graus centígrados (T<0°C) e conteúdo de umidade das sementes entre 3 e 7 por cento, de acordo com a espécie.

- *Preferível*: temperatura de 18 graus centígrados negativos ou inferior (T≤ -18°C), e conteúdo de umidade das sementes entre 3 e 7 por cento, de acordo como a espécie.

Quanto ao tamanho das amostras, para o armazenamento inicial das sementes na coleção de base, este pode ser:

- *Aceitável*: amostras de no mínimo 1.000 sementes viáveis por acesso. Neste caso a norma não é muito rígida, e admite que podem ser aceitas amostras com número inferior a 1000 sementes viáveis, para armazenamento em boas condições. Essas amostras devem, no entanto, ficar aguardando o momento oportuno para serem submetidas a regeneração e/ou multiplicação.

- *Preferível*: amostras entre 1.500 a 2.000 sementes viáveis. Há de se destacar, que quanto se trata de sementes de espécies geneticamente heterogêneas, seria recomendado utilizar-se um número maior de sementes.

Para o controle da viabilidade inicial deve-se utilizar una amostra mínima de 200 sementes, retirada ao acaso da amostra inicial. Nas monitorações deve-se utilizar 100 sementes para os testes de germinação, também retiradas ao acaso.

A primeira monitoração também de acordo com aquelas normas, deve ser feita dez anos após o início de armazenamento. O intervalo das monitorações subseqüentes será determinado com base nos resultados da primeira monitoração, porém em muitos casos este intervalo poderá ser muito superior a dez anos.

### Pesquisa

Além desse trabalho de rotina para manter a coleção de base, a equipe desenvolve trabalhos de pesquisa com sementes. A pesquisa desenvolvida nesta área visa basicamente alimentar o sistema de conservação a longo prazo.

As linhas de pesquisa procuram dar preferência a estudos de anatomia, fisiologia e patologia de sementes. Em primeira instância, procura-se classificar as espécies em sementes recalcitrantes ou ortodoxas. Em seguida procura-se determinar a metodologia adequada para conservação a longo prazo para cada espécie.

Ultimamente a criopreservação tem-se mostrado uma boa alternativa para conservação de germoplasma a longo prazo. A equipe do CENARGEN tem se empenhado em desenvolver pesquisas nesta linha, tanto com sementes como com outros tipos de propágulos, notadamente para aquelas espécies que produzem sementes recalcitrantes.

A pesquisa de semente desenvolvida no CENARGEN, tem como alvo principal as espécies tropicais autóctones, uma vez que a literatura é bastante escassa para estas espécies.

## MULTIPLICAÇÃO E/OU REGENERAÇÃO NOS BAGS

### Coleção Ativa

No sistema brasileiro de conservação de germoplasma a multiplicação e/ou regeneração são realizadas nos BAGs, donde são mantidas as coleções ativas de germoplasma.

O glossário do Geneflow do IBPGR (1992) conceitua coleção ativa como sendo a coleção de acessos armazenados a médio prazo de 0 a 15°C, com 3 a 7 por cento de umidade da semente. Esta coleção inclui somente acessos utilizáveis em programas de pesquisa a curto e médio prazos, além do material para intercâmbio. Descartes e introduções fazem esta coleção variar ativamente suas dimensões quanto ao número de acessos nela conservados, porém sempre de acordo com as necessidades dos programas de pesquisas atuais ou de futuro próximo. Na coleção ativa o descarte de material pode ser realizado em qualquer época, desde que o germoplasma esteja integrado à coleção de base.

Além da coleção ativa o BAG pode manter também uma coleção de trabalho, esta de caráter bem mais temporário, de interesse imediato da pesquisa. Pode

ainda manter uma coleção para conservação a longo prazo, notadamente para espécies perenes conservadas a campo. Neste caso deve-se evitar sempre que possível a mistura de atividades no manejo das três coleções.

**Multiplicação e/ou Regeneração de Germoplasma**

Com relação a multiplicação e/ou regeneração, deve-se seguir normas que garantam, que as amostras de sementes armazenadas na coleção de base, não apresentem níveis de viabilidade inferiores àqueles aceitáveis; por outro lado deve-se procurar realizar ao mínimo o número de ciclos de regeneração, visando a preservação da integridade genética do material conservado. Portanto, o intervalo de regeneração dependerá basicamente da longevidade das sementes armazenadas.

As normas para bancos de germoplasma do IBPGR preceituam que, as sementes produzidas para armazenamento na coleção de base, devem apresentar uma viabilidade o mais alto possível, e estar livres de pragas e doenças. Porém, sabendo-se que o poder germinativo depende das condições ambientais de produção e manejo, da maturidade e estado fisiológico das sementes no momento da colheita, e das diferenças, genéticas entre espécies, admite-se que 85 por cento de germinação seja considerado o nível mínimo nas amostras iniciais para a maioria das sementes, como por exemplo os cereais; 75 por cento para determinadas hortaliças, e inclusive menos do que isto, quando se tratar de determinadas espécies silvestres, que normalmente não alcançam altos níveis de germinação.

Deve-se promover a regeneração de uma amostra quando a viabilidade das sementes tenha sido reduzida a menos de 85 por cento do valor inicial. A metodologia de regeneração deverá seguir as normas estipuladas para cada espécie e garantir que se empregue o número de plantas necessárias para manter a integridade genética da amostra inicial. Na medida do possível deve-se eliminar as fontes de pressão de seleção, garantir uma contribuição equivalente de sementes de cada uma das plantas, e aplicar todas as medidas possíveis par evitar a deriva genética.

As normas do IBPGR preconizam a utilização de no mínimo 100 plantas para regeneração, a fim de reduzir a probabilidade de grande perdas de alelos. Não obstante, no caso das espécies silvestres a quantidade total de sementes disponíveis pode ser insuficiente neste sentido. As espécies silvestres por outro lado diferem das espécies cultivadas no que diz respeito ao melhoramento, a resposta ao armazenamento e germinação, refletindo na decisão quanto a regeneração.

A fim de garantir a manutenção da integridade genética e as peculiaridades da amostra inicial, recomenda-se que as sementes utilizadas para regeneração estejam geneticamente mais próximas do germoplasma original. Sempre que possível, é desejável utilizar-se sementes da coleção de base para regeneração, em detrimento da coleção ativa, tendo em vista que esta normalmente é mais vulnerável à instabilidade genética, devido aos plantios sucessivos.

Não obstante se tenha todos esses cuidados, é prudente pesquisar métodos válidos para controlar as possíveis variações associadas a regeneração, a fim de que se possa detectar qualquer mudança na constituição genética da amostra inicial.

**Interação CENARGEN/BAG**

Determinada a necessidade de multiplicação e/ou regeneração de um acesso da coleção de base, faz-se uma consulta ao BAG para verificar qual é a época mais oportuna, para realizar o plantio do material, que deverá ser multiplicado e/ou regenerado.

Uma vez acordada a época adequada para realização do trabalho de campo, procede-se a retirada de uma amostra da coleção de base que é enviada ao BAG, juntamente com um relatório onde se tem os dados de passaporte daquele acesso.

Após o plantio e colheita das sementes, conforme descrito anteriormente, estas são embaladas e

envidadas novamente ao CENARGEN, junto com as informações pertinentes. Se as amostras das sementes estiverem dentro dos padrões de qualidade preconizados pela conservação da coleção de base, estas entrarão para o sistema de conservação a longo prazo, conforme descrito no item Conservação da Coleção de Base no CENARGEN.

## PARTICIPAÇÃO DO CURADOR

A articulação da Área de Conservação de Recursos Genéticos do CENARGEN com o BAG é feita através do curador de germoplasma do produto, no CENARGEN, com o curador de banco de germoplasma do produto no respectivo BAG; uma vez que de acordo com a deliberação da EMBRAPA nº 28/93, de 07 de junho de 1993, o curador de germoplasma de produto ou grupo de produtos no CENARGEN, tem entre outras a atribuição de promover, acionar e acompanhar as atividades relativas a conservação, multiplicação e/ou regeneração.

Esta mesma deliberação estabelece as atribuições dos curadores de bancos de germoplasma de produto ou grupo de produtos nos BAGs, e dentre elas destacam/se a manutenção da coleção ativa, a fazer ou promover a multiplicação e/ou regeneração de germoplasma.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com Strauss **et al** (1988), os coletores e curadores de germoplasma preconizam conservar tudo. Não obstante este seja um fator positivo, isso faz com que as coleções cresçam muito, dificultando principalmente sua manutenção e manejo. Por outro lado, o desenvolvimento de novas tecnologias como a criopreservação e o estabelecimento de coleções nucleares, tem mostrado ultimamente, perspectivas mais racionais para conservar, manejar e utilizar a variabilidade genética das espécies.

O sistema brasileiro de recursos genéticos, com seus dois componentes básicos - CENARGEN/BAGs - foi, na época de sua implantação um sistema inédito, e hoje apesar do tamanho gigantesco que assume o programa de conservação de germoplasma tem funcionado a contento, notadamente no que concerne a conservação de germoplasma de semente de espécies ortodoxas, apesar da escassez de recursos financeiros. Porém, o sistema é dinâmico e busca sempre se aperfeiçoar, visando a otimização dos processos, para melhor conservar os recursos genéticos existentes para utilização atual e futura.

## LITERATURA CITADA E CONSULTADA

CENARGEN. 1993. Conservação de Recursos Genéticos. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN. (Folder)

FAO/CIRF. 1993. Comisión de recursos fitogenéticos. Quinta reunión. Normas para bancos de genes. Rome, FOA/CIRF. 14p. (mim.)

FAO/IBPGR. 1992. Report of the expert consultation on genebank standards. Rome, FAO/IBPGR. 25p. (min.).

FERREIRA, F.R. 1988. Conservação de germoplasma "in vivo". **In**: Encontro sobre recursos genéticos, 1º, Jaboticabal, 1988. Anais. Jaboticabal, UNESP/FCAVJ. p. 96-101.

GIACOMETTI, D.C. & GOEDERT, C.O. 1989. Brazil's National Genetic Resources and Biotecnology Center Preserves and Develops Valuable Germplasm Diversity, 5(4):8-11.

GOEDERT, C.O. 1988. Conservação de germoplasma semente. **In**: Encontro sobre Recursos Genéticos, 1º, Jaboticabal, 1988. Anais. Jaboticabal, UNESP/FCAVJ. p. 78-95.

IBPGR. 1992. Geneflow - a publication about the earth's plant genetic resources. Rome, IBPGR. 20p.

KORNELIUS, E. & COSTA, I.R.S. 1992. Conservação de recursos genéticos vegetais no Brasil. **In**: Congresso Internacional de Etnobotânica, Anais. Cordoba/Espanha. Set. (no prelo).

STRAUSS, M.S.; PINO, J.A.; COHEN, J.I. 1988. Quantification of diversity in "ex situ" plant collections. Diversity, 16: 30-32.

# Aspectos práticos da coleta de germoplasma

por Roberto Fontes Vieira *

## INTRODUÇÃO

A necessidade de suprir a alimentação humana e enfrentar os desafios impostos pelo crescimento populacional tem exigido dos governos um grande esforço no sentido de minimizar a crescente erosão genética da biodiversidade. Este fato tornou-se relevante recentemente na Convenção sobre Diversidade Biológica, onde de um lado os países detentores de grande riqueza genética e de outro os que dominam as tecnologias modernas para a exploração desta biodiversidade, necessitam encontrar um ponto de equilíbrio para promoverem estudos científicos dos recursos genéticos existentes no planeta.

Porém, desde a década de 60, a comunidade científica vem dedicando especial atenção as perdas de material genético, principalmente aqueles relacionados a plantas cultivadas. Em 1972, a Conferência do Homem e Meio Ambiente, realizada em Estocolmo, concluiu que medidas efetivas deveriam ser tomadas para evitar a perda contínua de genes, resultando na criação em 1974 do Comitê Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR), vinculado a FAO (Giacometti, 1990).

Diversos fatores tem contribuído para a aceleração da erosão genética: a expansão de fronteira agrícola, crescimento populacional, urbanização de novas áreas, implantação de usinas hidroeléctricas, mineração de superfície, abertura de novas ferrovias e rodovias (Giacometti & Coradin, 1985).

O Brasil é um dos centros de maior diversidade biológica do planeta, graças a sua localização geográfica e dimensão territorial, possuindo importantes centros de diversidade genética de plantas cultivadas e seus parentes silvestres, entre as quais a mandioca, o amendoim, o cacau, a seringueira, o cajú, além de um grande número de espécies florestais, forrageiras, medicinais, corantes e ornamentais nativas.

O Brasil possui uma grande riqueza em variedades locais ("land races") de várias espécies cultivadas, que embora não tenham sido originárias no Brasil, foram introduzidas por colonizadores ou advindas da cultura pré-colombiana. Estas espécies, como milho, feijão, trigo, arroz, entre outras, ven sendo cultivadas a muitos anos, estando adaptadas as mais diferentes condições do meio, como clima, solo, pragas, etc.

Com a missão de assegurar a diversidade de recursos genéticos importantes para o desenvolvimento da pesquisa agropecuária, a EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, criou em 1974 o Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN.

## IMPORTÂNCIA DOS RECURSOS FITOGENÉTICOS

O número de plantas utilizadas pelo homem na alimentação é pequeno se comparado com o número de espécies existentes na natureza. A agricultura é extremamente dependente desta pequena parcela do reino vegetal, da qual se exige o máximo de eficiência produtiva para suprir a crescente demanda por alimento.

* *Engenheiro Agrônomo, Pesquisador, EMBRAPA/ CENARGEN, Brasília, DF, Brasil.*

Os povos pré-históricos utilizavam em sua alimentação ou em outras formas cerca de 3.000 plantas. Atualmente, apenas 250 espécies são utilizadas de maneira geral na agricultura (aproximadamente 80 por horticultores), sendo que destas, cerca de 20 são responsáveis por 90 por cento da alimentação humana. Dentre estas 20 espécies, o milho, o arroz e o trigo perfazem 70 por cento deste total.

O aparecimento da agricultura há 10 - 12 mil anos atrás trouxe consigo o processo de domesticação de espécies úteis ao homem. A necessidade de produzir alimentos para a manutenção das comunidades humanas cada vez maiores levou ao homem se fixar cada vez mais ao campo. A atividade de caça e coleta de alimentos (os povos primitivos eram considerados basicamente caçadores/coletores) foi transformado em atividade agrícola, por um processo lento e talvez um dos mais importantes da história humana, no qual a observação do modo de reprodução das espécies associado a sua utilização, selecionou aquelas que viriam a ser cultivadas.

Deste modo, surgiram os primeiros cultivos, onde sementes de gramíneas silvestres transformavam-se em espécies de trigo e cevada no sudeste asiático e em milho, no México. Ao mesmo tempo em que apareciam a pimenta, feijões e abóboras no México e a batata nos Andes (Hoyt, 1992).

Ainda hoje podemos observar nos grupos indígenas mais primitivos sistemas de cultivos onde são mantidos ampla variabilidade genética interespecífica e intraespecífica. Esta variabilidade genética inter e intraespecífica, vem sustentando estas populações ao longo de milhares de anos.

Ao mesmo tempo que espécies foram selecionadas e se tornaram a base alimentar da maioria dos povos, seus parentes silvestres, isto é, espécies do mesmo gênero que não foram "selecionadas" para domesticação, permaneceram em um processo contínuo de evolução, adaptando-se as condições mais adversas do meio, como variações térmicas, regime hídrico, fertilidade de solo, etc. Estas espécies são consideradas de grande valor para a agricultura e o melhoramento genético das plantas cultivadas, uma vez que desenvolveram mecanismos de adaptação aos fatores acima citados, podendo conter genes de grandes valia ao melhoramento genético (Hoyt, 1992).

Os registros mais antigos sobre missões de coleta de material botânico datam de 4.500 A.C., em que os Sumérios enviaram expedições a Ásia Menor na procura de uvas, figos e rosas. Também em 3.495 A.C. uma expedição egípcia foi enviada à África Oriental para coleta de franco incenso (Ford-Lloyd & Jackson, 1986; Plucknett **et al.**, 1987 citados por Lleras, 1988).

Com a época das descobertas, a coleta de recursos genéticos e o intercâmbio de novos produtos, gerou uma verdadeira revolução alimentícia a nível mundial, com um grande número de espécies deixando de ser de uso restrito e passando a ser de uso universal (Lleras, 1988). Um exemplo típico desta fase é a batata inglesa, que originaria nos Andes e levada à Europa onde foi aclimatada e produz muito bem. No entanto, a estreita base genética introduzida não permitiu superar problemas inerentes ao monocultivo, ocasionando perdas quase totais dos cultivos e a um sério problema social na Irlanda, onde milhares de pessoas morreram de fome, uma vez que a batata havia se tornado a principal base alimentar do povo irlandês.

No século XX, destacaram-se as coleta realizadas por Nicolai Vavilov e seus colaboradores, os quais foram os primeiros a escrever sobre a importância da diversidade genética a estabelecer os principais centros de origem das plantas cultivadas (Lleras, 1988).

Com o desenvolvimento da agricultura, os parentes silvestres das plantas cultivadas se concentraram as margens dos cultivos, crescendo como ervas daninhas, e até mesmo cruzando com as cultivadas, num processo natural, favorecendo o fluxo de genes e a manutenção de culturas diversificadas e sadias (Hoyt, 1992).

## COLETA DE GERMOPLASMA

O primeiro aspecto a considerar em uma coleta de germoplasma é a definição do que pretendemos coletar. De acôrdo com Giacometti & Coradin (1982) e

Giacometti (1990), existem quatro tipos ou grupos a serem considerados em uma coleta de germoplasma.

1. Espécies cultivadas e cultivares obsoletas de variedades obtidas através do melhoramento genético ou não, porém superadas.

2. Cultivares primitivas ou raças locais, "land races",freqüentes no Brasil para culturas de milho, mandioca, normalmente encontradas em comunidades de pequenos agricultores ou grupos indígenas. Geralmente são materiais com ampla variabilidade e bem adaptadas ao meio.

3. Parentes silvestres das plantas cultivadas, como por exemplo as do gênero *Arachis* (Amendoim), *Manihot* (Mandioca), *Anacardium* (Cajú), entre outras, que compões a variabilidade interespecífica de cada produto.

4. Espécies silvestres com potencial para domesticação, como por exemplo fruteiras nativas, espécies florestais, medicinais, palmeiras, gramíneas e leguminosas forrageiras, plantas ornamentais, corantes, etc.

Uma vez bem definido o produto de interesse, a coleta de germoplasma distingue-se em três etapas bem estabelecidas: a precoleta, a coleta propriamente dita e a pós coleta. Não é raro se imaginar que uma coleta se constituiria apenas do ato de ir ao campo e apanhar o material de interesse. No entanto, uma expedição de coleta se constitui de atividades preliminares e posteriores de fundamental importância para o seu sucesso. A seguir serão detalhadas estas etapas:

**Précoleta**

Dentre as atividades de précoleta incluem-se aquelas de natureza técnica e logística, para que seja alcançado o objetivo da expedição. Antes de qualquer atividade a ser realizada, considera-se o primeiro passo, apesar de óbvio, a definição do produto (milho, feijão, abóbora, maracujá, etc.) ou grupos de produtos (forrageiras, florestais, medicinais, etc.) a ser coletado, e sua prioridade dentro do sistema de pesquisa. Isto implica na disponibilidade de um Banco de Germoplasma que vá receber o material a ser coletado. Este aspecto é fundamental para a captação dos recursos necessários para a execução de uma expedição de coleta bem sucedida. Considerando-se que uma expedição de coleta desta natureza atinge diferentes regiões geográficas, muitas vezes distantes, com difícil acesso, com participação de uma equipe multidisciplinar (algumas vezes com participação de pesquisadores estrangeiros), e de custo elevado, são sugeridos os seguintes itens a serem considerados para a realização desta expedição:

***Revisão bibliográfica***

A consulta a bibliografia especializada sobre o produto que se pretende coletar é uma condição básica e o primeiro passo na realização de um programa de expedições de coleta de germoplasma. Em se tratando de espécies cultivadas, a bibliografia poderá nos fornecer dados a respeito da época de produção e colheita nos diferentes locais do país; nomes vulgares nas diferentes regiões; parentes silvestres, sua descrição botânica e nomes científicos para consulta posterior em herbários; ocorrências de raças locais, etc.

Entretanto, nem sempre todos estes dados estão disponíveis na literatura ou mesmo se dispõe da literatura na biblioteca da instituição. Neste caso, é sempre conveniente consultar um especialista no assunto (ver item formação da equipe) ou um técnico local, se houver, que provavelmente possuirá contato direto com o produtor e que é fundamental para o acesso a região.

Em relação as espécies silvestres, a bibliografia auxiliará na distribuição geográfica do produto, na descrição botânica correta da espécie, com chaves sistemáticas, facilitando o reconhecimento do material em campo.

***Pesquisa de herbário***

O objetivo de revisar os herbários referentes as floras regionais onde possivelmente existem exsicatas

das espécies de interesse é específico para parentes silvestres de plantas cultivadas e espécies silvestres com potencial econômico atual ou potencial, uma vez que para espécies cultivadas muito pouco ou quase nada existe nos herbários.

Em relação aos parentes silvestres de plantas cultivadas e as espécies silvestres de importância econômica, a consulta a herbários é fundamental, uma vez que a literatura nem sempre dispões de todos os dados de localização geográfica que necessitamos. Através das etiquetas de herbários, pode-se encontrar para a(s) espécie(s) de interesse, dados sobre sua localização (estado, município e local da coleta), fenofase (botões florais, flores, frutos imaturos ou maturos) e a data da coleta. Associando-se estes dados podemos estimar as melhores épocas de coleta de frutos e sementes e locais a serem percorridos.

Entretanto, de acordo com Lleras (1988), um dos maiores problemas enfrentados ao programarem-se coletas de germoplasma para produtos específicos para uma determinada região consiste na falta de dados quase generalizada sobre sua distribuição geográfica.

Isto pode se explicar pelo pouco número de coletas de material de herbário de parentes silvestres de plantas cultivadas, existindo por parte dos botânicos, de maneira geral, um interesse maior em descobertas de espécies novas ou raras para a ciência.

Segundo Lleras (1988), este problema pode ser solucionado através da realização de prospecções, as quais embora possuam o mesmo significado de prospecções de reservas petrolíferas e minerais, suas implicações logísticas são totalmente diferentes, devido a natureza das riquezas exploradas. O custo da prospecção de recursos genéticos é da mesma ordem que a sua coleta, enquanto que para reservas petrolíferas e minerais este valor é irrisório se comparado ao custo total de sua exploração.

### *Metodologia de amostragem*

A metodologia de amostragem na coleta de germoplasma é sem dúvida um dos pontos mais importantes e complexos desta fase de trabalho em recursos genéticos.

Segundo Coradin (s.d.), a metodologia de amostragem busca definir, para cada caso, esquemas de amostragem capazes de assegurar a captação da maior variabilidade genética possível em uma população de plantas. Ainda segundo o mesmo autor, a definição de técnicas para amostragem não são suficientemente claras, uma vez que a maioria dessas técnicas foi desenvolvida para espécies temperadas, onde a estrutura das populações são melhor definidas e os sistemas reprodutivos melhor conhecidos.

Existe uma diferença fundamental entre os tipos de coletores, onde o coletor botânico procura coletar sementes com a intenção de representar em seu herbário e jardim botânico amostras de um vegetal, sem preocupar-se com sua variabilidade ou potencial genético. O coletor melhorista, por sua vez, possui objetivos mais aplicados, e procura coletar plantas promissoras, conhecidas como "materiais de elite", visando o pronto aproveitamento de seus gens em seu programa de melhoramento. Com o advento da importância dos recursos genéticos, surge um novo tipo de coletor, talvez uma mistura entre os dois primeiros. É o coletor de recursos genéticos, que procura amostrar a variabilidade genética de uma população de plantas de interesse econômico, sempre observando materiais promissores, de elite, sem contudo desprezar uma amostra de uma população pelo fato de não ser de uso direto e imediato nos programas de melhoramento, mas de interesse potencial para coleções de germoplasma e jardins botânicos.

Pouco tem sido feito em têrmos de estudo com respeito a amostragem em relação a espécies silvestres tropicais, onde para a maioria desta a estrutura das populações e biologia reprodutiva é ainda objeto de muita pesquisa.

De maneira geral, adota-se como método de amostragem a coleta de forma casualizada de pequenas amostras de sementes de um maior número possível de matrizes.

Segundo Marshall & Brown (1975, 1983) citados por Lleras (1988) e Valls (1990), uma amostragem de

uma população deve ser suficiente para captar materiais que tragam o máximo de variabilidade útil, isto é, todos aqueles alelos em locus com mais de 5 por cento de freqüência. Estes autores sugerem um número mínimo de indivíduos coletados (de 50 a 100) para representar adequadamente distintos tipos de populações, citando ainda o número mínimo de amostragem por local e de locais por região. Esta abordagem teórica, na maioria dos casos choca-se com a experiência prática obtida, como por exemplo, no caso de forrageiras, onde Reid & Strickland (1983) citados por Valls (1990), enfatizam sobre as dificuldades de colocação na prática de técnicas de amostragem dentro do tempo limitado das expedições e do caráter generalizado de coleta de forrageiras, que podem abranger uma ampla gama de espécies e gêneros de uma só vez.

Reid & Strickland (1983) citados por Valls (1990), consideram mais importante a coleta do maior número de locais de ocorrência das populações, do que a coleta de número teoricamente ideal de plantas ou amostras de germoplasma por local. Este aspecto se agrava ainda mais quando nos direcionamos mais para os parentes silvestres de plantas cultivadas e as espécies silvestres de interesse econômico, justamente por a maioria destas não ter sido ainda estudada quanto a sua biologia reprodutiva.

Tendo em vista a acelerada erosão genética apresentada por vários grupos de plantas, associada a própria de seus habitats, é preferível na maioria das vezes amostrar uma pequena quantidade de germoplasma de uma população, mesmo que esta não represente o seu "pool" gênico, do que ignorar sua disponibilidade devido ao fato de não se ter uma amostragem teoricamente perfeita.

Entretanto, segundo recente experiência vivida por Coradin (comunicação pessoal), com algum esforço e muita paciência, é possível, para muitas espécies, tanto silvestres (gramíneas e leguminosas forrageiras, por exemplo), como cultivadas (cereais), a coleta de um número grande de sementes por acesso (5.000 sementes). Para tanto, deve-se utilizar como estratégia de coleta a redução do número de pontos de coleta e o aumento de número de plantas amostradas por acesso. A desvantagem da cobertura de uma área geográfica menor, com a coleta de um menor número de acessos, trará como grande vantagem a coleta de acessos com maior número de sementes, o que para a maioria dos casos, dispensará a multiplicação inicial dos acessos, atualmente um dos maiores pontos de estrangulamento do processo. Mesmo considerando-se que, tradicionalmente, as expedições busquem atingir grandes áreas, com a coleta de muitas amostras de poucas sementes, devemos mudar esta estratégia, de maneira que apenas a partir das expedições de coleta seja possível atender os bancos ativos e a conservação a longo prazo.

### *Itinerário*

A partir dos dados obtidos na literatura e nos herbários, além de consultas a técnicos da região, pode-se estabelecer com auxílio de mapas rodoviários e cartas geográficas (de preferência com precisão de 1:1.000.000) o roteiro da expedição. Um detalhe importante a considerar é a época a se realizar a viagem, devido as condições climáticas na região a ser abordada e as condições das estradas a serem percorridas. É importante considerar o(s) tipo(s) de veículo(s) a serem utilizados durante todo o processo de coleta (carro, barco, avião, etc.) e o tipo e volume de material a ser coletado (mudas, sementes, estacas, exsicatas, etc.), pois isto implica diretamente na mobilidade da equipe e preservação do material coletado.

### *Formação da equipe*

Em tese, uma equipe de coleta de germoplasma deve ser a mais diversificada possível, composta de um taxonomista, especialista na(s) família(s) ou gênero(s) a ser coletado, um melhorista, um especialista em recursos genéticos e um auxiliar técnico coletor e motorista. A presença do taxonomista permitirá a melhor identificação do material, principalmente em se tratando de espécies silvestres. O melhorista contribuirá com a visão aplicada de materiais promissores de elite a serem coletados. O apoio dos técnicos de instituições locais é fundamental para o sucesso da expedição, pois além de terem

conhecimento da região, facilitam os contatos com agricultores e a localização de áreas e plantas a serem abrangidas e coletadas. Em geral, a equipe deve ter um líder, que tem a função de organizar a expedição e registrar todos os dados relativos à coleta do produto de interesse.

***Aspectos legais***

Dentro dos aspectos legais, é importante saber em que áreas serão realizadas as coletas. No Brasil, a coleta em áreas públicas de preservação deverão ser autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. Esta permissão é fornecida pela Divisão de Ecossistemas do IBAMA, através de solicitação formal e apresentação do projeto para coleta da instituição requerente.

Com relação a áreas indígenas, deve-se manter um contato prévio com membros da Fundação Nacional do Índio - FUNAI e a comunidade indígena para o acompanhamento dentro da reserva. Estas solicitações devem ser feitas com antecedência de pelo menos três (3) meses.

Quando da participação de estrangeiros em expedições de coleta, uma autorização ao governo brasileiro deve ser solicitada através do Ministério de Ciência e Tecnologia - MCT, através do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq pela instituição brasileira responsável pela expedição. Em geral, esta autorização leva um período longo para sua viabilização, devendo ser solicitada tão logo se defina a realização da expedição, ou pelo menos com 3-4 meses de antecedência, conforme decreto no. 98.830, de 15 de janeiro de 1990.

***Infra-estrutura***

No aspecto de infra-estrutura podem ser considerados o material e apoio necessário para realização da expedição e para o recebimento do material coletado.

Em relação a infra-estrutura necessária para realizar a expedição, além do material necessário de campo, devem ser considerados o apoio logístico de instituições locais, como Universidades, Organizações Não-Governamentais (ONGs), escritórios da EMATER e de empresas assistência técnica rural, agroindústrias, associações de pequenos produtores, sindicatos rurais, etc. O contato preliminar com estas instituições é fundamental para o apoio na coleta, como por exemplo em regiões de difícil acesso ou sem condições de hospedagem, na localização dos produtores ou áreas de ocorrência de uma determinada planta.

Em relação a infra-estrutura necessária ao recebimento do material coletado, requer-se um contato prévio com o Banco de Germoplasma para o plantio do material (quando se tratar de material com sementes recalcitrantes ou estacas). Deve ser considerado também o envio de material via correio no caso de material de perda muito rápida e quando a expedição for muito longa.

De maneira geral, devem ser considerados, de acôrdo com as necessidades de cada produto e área a ser coletada, os seguintes materiais para uma expedição de coleta de germoplasma:

- água mineral
- álcool 70%
- altímetro
- barbante
- barracas
- binóculo
- botas
- bujão de gás e fugareiro
- bússola
- caderneta de campo
- caixa de primeiros socorros
- canivete
- cantil
- corda
- elastico
- enxada
- enxadão

- escada de alumínio
- estufa de campo para secagem de material de herbário
- etiquetas para identificação de material
- facão
- filmes fotográficos para slide e papel
- fita metrica
- fita adesiva
- foice
- folha de alumínio corrugado
- fósforos
- garrafa térmica
- jornal
- lâmpadas e fio para instalação
- lápis, borracha, caneta
- lupa de bolso
- luvas
- máquina fotográfica
- mosquiteiro
- papelão
- parafina
- peneiras de diferentes malhas
- pemeira
- picareta
- podão
- prensa
- redes
- saco plástico grande para coleta de material de herbário
- sacos de pano de diversos tamanhos
- sacos plásticos para amostras de soio
- sacos de papel de diversos tamanhos
- serragem e caixa de isopor para estacas
- tesoura de poda
- veículo apropriado com pneus sobressalentes

**Coleta**

Ford-Lloyd & Jackson (1986) citados por Lleras (1988), relatam que existem quatro tipos básicos de locais de coleta de germoplasma: 1) culturas; 2) hortas e pomares domésticos; 3) mercados e feiras; e 4) habitats naturais. Os dois primeiros locais estão em geral associados, quando se trata principalmente de pequenos produtores agrícolas, onde evidentemente se mantém os materiais de maior interêsse à pesquisa agrícola avançada.

É de se esperar que este pequeno produtor de regiões pobres possua uma diversidade de materiais genéticos que o permita enfrentar a adversidade climática. Assim, é comum encontrar com um mesmo produtor, materiais mais precoces e outros mais tardios, produzindo uma safra desuniforme e heterogênea, porém que lhe permite assegurar alguma produção.

A coleta em feiras e mercados, principalmente as do norte, nordeste e centro-oeste do país, são extremamente ricas, devido a diversidade de produtos que apresentam, na sua maioria trazidas e comercializadas pelos próprios produtores.

Entretanto, as feiras e mercados apresentam um problema que é a identificação do material e sua procedência, além do problema dos intermediários, o que dificulta reconhecer a origem do material.

Segundo Lleras (1988), apesar da coleta em feiras e mercados permitir uma coleta rápida e diversificada de materiais, ela não substitui a coleta na roça, onde além de se verificar a procedência do material, pode-se registrar informações sobre seu uso, plantio, manejo, conservação, através do contato direto com o produtor.

A coleta de material silvestre apresenta características bastante distintas das cultivadas. Além dos problemas relativos a localização, mapeamento, acesso e definição da melhor época de coleta, Lleras (1988) ressalta também a dificuldade em definir a campo tamanho de populações, uma vez que estas são freqüentemente disjuntas, de tamanhos variáveis e de difícil delimitação.

É bastante freqüente se encontrar a campo um tamanho reduzido de sementes por matrizes, dificultando os parâmetros estabelecidos para amostragem do material. Porém, não existe estratégia

para amostragem definida para coleta de germoplasma destes materiais, prevalecendo como base o conhecimento gerado para outras espécies afins, o senso de amostragem estatística e o bom senso, associado as condições existentes no campo.

### *Germoplasma*

Entende-se por germoplasma o material genético que forma a base física da hereditariedade e a qual é transmitida de uma geração para outra através de células reprodutivas; ou é um indivíduo ou clone que representa um tipo, espécie ou cultura e que poderá ser mantido por razões agronômicas, históricas ou outras (IBPGR citado por Kornelius, 1992).

Para os efeitos práticos de uma coleta, o germoplasma constitui-se de sementes, mudas, estacas, rebentos, estolões e mesmo meristemas de uma população de plantas que se pretende amostrar.

A coleta de germoplasma deve ser registrada através dos dados de cadernetas (que se constituirão dados de passaporte do material coletado), informações estas que deverão acompanhar este material no seu fluxo dentro do sistema de pesquisa que estiver integrado. Baseado em cadernetas de anotações dos botânicos sistemátas e outras já desenvolvidas para coleta de recursos genéticos, o CENARGEN desenvolveu um modelo de caderneta que integra as informações botânicas da espécie, associada aos dados de interêsse agronômico. Os dados de caderneta de campo mínimos adotados pelo CENARGEN são os abaixo relacionados. Entretanto, é obvio, que para produto pode-se adicionar outras informações, desde que sempre associadas ao número do coletor.

1. *Nome científico*: nome mais atualizado da espécie. No caso de material ainda indeterminado, considerar apenas o gênero.

2. *Família*: família botânica.

3. *Nome comum no local*: é importante registrar os diversos nomes comuns para cada produto nos diferentes locais encontrados, uma vez que estes facilitam o seu reconhecimento pelo agricultor e pelos mateiros.

4. *Nome do(s) coletor(es)*: citar de forma abreviada o nome de cada coletor participante da expedição.

5. *Número do coletor*: é um número sequencial dado pelo coletor principal, o qual será responsável e líder da expedição. O coletor principal deve cuidar do andamento pós coleta de todo material coletado até o seu destino.

6. *Data da coleta*: registrar dia, mês e ano da coleta.

7. *Nome do determinador e data*: refere-se a material indeterminado, em geral de espécies silvestres, enviado para determinação botânica por especialista na família ou gênero. Deve constatar do nome do especialista botânico e a data da determinação.

8. *Material coletado*: registrar todo o tipo de material coletado e a quantidade, como sementes, mudas, estacas, amostra de solo, exsicatas, amostras de folhas, etc. Todos estes materiais devem receber as iniciais do coletor e o seus número para facilitar recuperação de dados associada aos mesmos.

9. *Hábito de crescimento*: refere-se ao hábito da espécie coletada, como erva, subarbusto, arbusto, árvore, liana, epífita, etc.

10. *Cor da flor/Cor do fruto*: descrever com detalhes a coloração das flores e frutos. Caso o espaço seja insuficiente, incluir no item observações.

11. *Interêsse econômico*: alimentício, fruteira, medicinal, taxonômico, melhoramento genético, etc.

12. *Ambiente geral*: descrever o ambiente onde a espécie ocorre, isto é, citar o bioma principal e a fitofisionomia, por exemplo, cerrado (cerradão, campo cerrado, etc.) mata amazônica (mata de terra firme). No caso de outras espécies não ocorrentes de biomas típicos, citar como ruderal,

exótica, invasora de cultura, cultivada em fundo de quintal, etc.

13. *Substrato geral*: descrever o tipo de solo sobre a planta, por exemplo Latossolo Vermelho Amarelo.

14. *Relevo*: descrever o relevo, plano, inclinado, suave ondulado, etc.

15. *Freqüência relativa*: item específico para espécies silvestres, podendo ser rara, ocasional, freqüente.

16. *País/Região/Estado/Município*: descrever, deve-se cuidar com a abrangência do município.

17. *Latitude/longitude/altitude*: descrever a latitude e longitude após a coleta, através da busca em mapas de precisão. A altitude pode ser avaliada por meio de altímetro, ou estimada por mapas.

18. *Local da coleta*: detalhar o máximo possível o local da coleta, de maneira a permitir o retorno ao local por outro coletor. Detalhar a quilometragem para acesso ao local. Por exemplo: material coletado à 32 km N de Planaltina, entrada na margem esquerda da rodovia cerca de 13 km de estrada de chão até a fazenda do Sr. Bento.

19. *Código de produto/Código de acesso*: estes códigos devem ser dados pelo curador do produto após a sua coleta. Estes códigos são utilizados pelo CENARGEN para registro do germoplasma circulante no país.

20. *Observações*: este espaço serve para complementação de dados morfológicos e etnobotânicos, e demais informações que se julgar necessário.

### *Material de herbário*

A coleta de material de herbário é realizada para espécies silvestres e segue procedimentos já bem estabelecidos dentro dos estudos botânicos.

Um bom exemplar de herbário produz informações geográficas, ecológicas e fenológicas de importantes espécies. As coleções de herbário são a base de estudos taxonômicos, os quais produzem floras e monografias que poderão definir locais de coleta de germoplasma, especialmente de parentes silvestres de plantas cultivadas, além de mostrar-nos quando e onde devemos amostra-las (Perdue & Christenson, 1989).

O material coletado deve ser prensado preliminarmente entre folhas de jornal e papelão, sendo posteriormente acondicionado em uma prensa com alumínio corrugado, papelão e jornal. Cada material de herbário deve receber o mesmo número existente na caderneta de campo, devendo este número ser registrado na borda do jornal. A prensa com material botânico coletado deverá ser depositada sobre uma estufa de lâmpadas ou a gás para sua secagem. Em regiões de grande umidade se faz uso de produtos como álcool, entre outros, para permitir a sua preservação até a secagem no herbário.

Uma vez o material seco, este deve ser colado em cartolina, juntamente com a etiqueta de campo, para ser depositado no herbário. Normalmente se coleta no mínimo três exemplares de cada material, para sua posterior distribuição a especialistas para identificação e a outras instituições.

### *Amostra de solo*

A amostragem de solo é dirigida mais para espécies silvestres, onde se pretende correlacionar o germoplasma coletado e o solo onde ocorre. Porém, para a coletas em culturas ou em pequenos pomares e hortas, podem ser feitas também amostras de solo.

É importante que esta amostra esteja sempre associada ao germoplasma coletado. As amostras de solos seguem os procedimentos normais exigidos, sendo feita uma amostra composta para cada população. O detalhamento desta amostragem porém pode ser feito, dado ao interesse de pesquisa que se requeira.

### *Amostra de parte da planta*

A amostragem de partes do vegetal coletado não é rotina, porém é realizado para espécies de interesse medicinal para estudo fitoquímico e/ou farmacológico ou então para estudos fitopatológicos, visando

estabelecer a ocorrência de alguns patôgenos em plantas siivestres.

***Pós coleta***

Durante a pós coleta são complementados os dados da cademeta de campo, como latitude, longitude, determinação do material, etc. O germoplasma deve receber os códigos de produto e acessos, os quais são incluídos na cademeta. O germoplasma coletado, juntamente com sua identificação (coletor, Nº) deverá seguir para o curador do produto, que o enviará ao Banco de Germoplasma ou Câmara de Conservação.

O material de herbário deve ser fumigado com fosfina em tambor e posteriormente montado e depositado no herbário da instituição. Suas duplicatas serão distribuídas a especialistas para determinação e a outros herbários de referência.

Em relação ao material vegetativo coletado, como mudas e estacas, o coletor deve providenciar sua propagação e manutenção até que esteja em condições ideais para ser tranferida ao BAG.

Em relação ao germplasma coletado deve-se sempre procurar averiguar, conjuntamente com um especialista, a presença de patógenos e insetos daninhos que possam estar sendo trazidos de uma região para outra. O germoplasma coletado deve passar por uma triagem, onde será felta a secagem, limpeza das sementes, contagem e fumigação. Sempre que possível, esta verificação deverá ser feita ainda no campo, visto que mesmo após a coleta e o retorno da equipe, os insetos poderão causar danos ao material coletado.

## LITERATURA CITADA

FORD-LLOYD, B. & JACKSON, M. 1986. Plant genetic resources: an introdution to their conservation and uses. London, Edward Arnold, 1986, 145 p. il.

GIACOMETTI, D.C. 1990. Estratégia de coleta e conservação de germoplasma hortícola da América Tropical. Anais: Primeiro Simpósio Latino-Americano sobre Recursos Genéticos de Espécies Hortícolas. Campinas, Fundação Cargill, 1990. p. 91-110.

-------- & CORADIN, L. 1985. Conservação e manejo de recursos genéticos no Brasil. In: Congresso Nacional de Botânica, 23, 1982. Maceió. Anais... Brasília, SBB, p. 201-248.

HAWKES, J.G. 1980. Crop genetic resources field collection manual. Birmingham, Dept. of Plant Biology, 37 p.

HOYT, E. 1992. Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas. Mexico, Addison Wesley Iberoamericana, IBPGR/IUCN/WWF/CENARGEN-EMBRAPA. 52 p. (traduzido por L. Coradin).

KORNELIUS, E. 1992. Proposta de Fluxo de Germoplasma no Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária - SNPA, elaborada para atender a instrução de serviço CENARGEN Nº 006/92, de 05/10/92.

LLERAS, E. 1988. Coleta de recursos genéticos vegetais. In: Encontro sobre recursos genéticos, 1988, Jaboticabal: FCAVJ-UNESP/CENARGEN-EMBRAPA, p. 23-42.

PERDUE, R.E. & CHRISTENSON, G.M. 1989. Plant Exploration. In: Janick, J. Plant Breeding Reviews. Portland, Timber Pres, v. 7. p. 67-93.

VALLS, J.F.J. 1990. A busca de germoplasma de plantas forrageiras e estratégias para sua coleta. In: Diálogo XXVIII - Introducción, Conservación y Evaluación de Germoplasma Forrajero en el Cono Sur. Montevideo, Uru., IICA/PROCISUR, 1990. p. 309-318.

# Manejo da coleção de germoplasma-semente

por Antonio Rodrigues de Miranda *

Palavras-chave: Conservação a longo prazo, germoplasma-semente, semente ortodoxa, manejo de germoplasma.

**ABSTRACT**

EMBRAPA/CENARGEN has an ongoing plant genetic resources conservation system since 1974. Changes and improvements in the facilities and tecnologies took place in the meantime. CENARGEN's main business, to keep the germplams in good viable conditions for long term storage, has been achieved.

The handling of seed germplasm in a gene bank is not an easy task because of the responsibility in taking managerial decisions. The curator is acutely aware of that At present, CENARGEN holds 70,000 accessions of seed germplasm which account for 373 species and 166 crop plants in cold chambers running at -20°C.

## INTRODUÇÃO

O presente tópico relata as experiências obtidas pelo CENARGEN no que se refere à conservação de germoplasma-semente a longo prazo, durante os vinte anos de sua existência (1974 a 1994).É bem verdade que durante todo esse período uma série de fatos aconteceram, conseqüentemente, mudanças ocorreram, mas o firme propósito de manter o germoplasma-semente sob condições seguras prevaleceu, e como resultado o CENARGEN conta hoje com uma coleção de germoplasma-semente onde estão representadas 373 espécies e 166 produtos.

O início foi lento e até certo ponto frustrante para a equipe técnico-científica pioneira, constituída de apenas quatro elementos. Na época não existia nenhum modelo fora do país que pudesse fornecer subsídios à organização, à estruturação e funcionamento deste Centro, mas o objetivo primordial que sempre foi a manutenção da variabilidade genética de espécies vegetais que apresentam importância sócio-econômica atual e/ou potencial com vistas a sua utilização em benefício de toda sociedade brasileira tem sido alcançado. A conservação da coleção de base é responsabilidade do CENARGEN. Neste trabalho são apresentados e descritos também os diferentes passos percorridos por um acesso que se destina a conservação a longo prazo no CENARGEN.

Todo germoplasma-semente enviado ao CENARGEN com destino a conservação a longo prazo, procede de uma das seguintes fontes: introdução, coleta e bancos ativos de germoplasma (BAGs).

## REGISTRO DE GERMOPLASMA

A Figura 1, mostra em detalhe as informações constantes da ficha de registro e que devem acompanhar o acesso destinado a conservação a longo prazo.

Assim que o material chega ao CENARGEN o primeiro passo é o registro do mesmo na Área de Intercâmbio e Quarentena de Germoplasma (AIQ), para tanto, é usado um formulário (ficha) próprio, no qual registram-se as principais informações relativas ao referido acesso.

A Figura 2, mostra a seqüência dos diferentes passos percorridos por um acesso de germoplasma-semente no esquema de conservação a longo prazo desenvolvido no CENARGEN.

---

* *Pesquisador EMBRAPA/CENARGEN em Conservação e Utilização de Recursos Genéticos Vegetais, Brasília, DF, Brasil.*

EMBRAPA CENARGEN DMO | REGISTRO DE GERMOPLASMA | PA.E.A.C.BL 001

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 04308 | 200993 | 70100122 | Algodão | Malvaceae |

| | | |
|---|---|---|
| 150893 | 100993 | COLBASE E CNPA(Centro Nacional de Pesquisa de Algodão) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 0706504011 | USDA- PGQC | Dr. G. White | 0853 | Antonio Rodrigues de Miranda |
| 0022200002 | CENARGEN | Antonio R. de Miranda | 930050 3 | 1- REGENERAÇÃO 2- COLETA 3- IMPORTAÇÃO 4- TRÂNSITO INTERNO 5- RENOVAÇÃO 6- EXPORTAÇÃO 7- ENSAIO INTERNAC. 8- ENSAIO NACIONAL 9- DOAÇÃO |

| | |
|---|---|
| 005700 | Gossypium hirsutum L. var. latifolium Hutch. |

E/A- SITUAÇÃO DE CARAC/AVALIAÇÃO: 1- COM DADOS DISPONÍVEIS 2- SEM DADOS DISPONÍVEIS 3- SEM CARACTERIZAÇÃO/AVALIAÇÃO

S/F- SITUAÇÃO FITOSSANITÁRIA: 1- EM EXAME LABORATORIAL 2- EM LIMPEZA 3- EM QUARENTENA 4- LIBERADO 5- EM MULTIPLICAÇÃO

| CONTROLE AMOSTRA ANO | NÚMERO | CÓDIGO DO ACESSO | I.R. | MATERIAL RECEBIDO OU ENVIADO QUANTIDADE | UNIDADE | DENOMINAÇÃO DO ACESSO (A, LOCAL - LOB, LOCAL - LOCR) / LATITUDE, LONGITUDE, ALTITUDE / GENEALOGIA, ODS / ODS (CONT.) | C/A | S/F | DATA PROV. NOVA INSPEÇÃO MÊS | ANO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 93 | 001000 | 002429 | 00 | 200 | G | 20=Acala 1514 21=PI 1020 22=CNPA 9 | | | | |
| 93 | 001001 | 006084 | 00 | 250 | G | Texas 318 | | | | |
| 93 | 001002 | 007471 | 00 | 200 | G | Tamcot SP 21 31= Glândulas de gossipol ausente | | | | |

VISTO DO CURADOR/DATA: [signature] 15/09/93 | VISTO DO COORDENADOR DA ÁREA/DATA | OBSERVAÇÕES

*Figura 1.Registro de Germoplasma.*

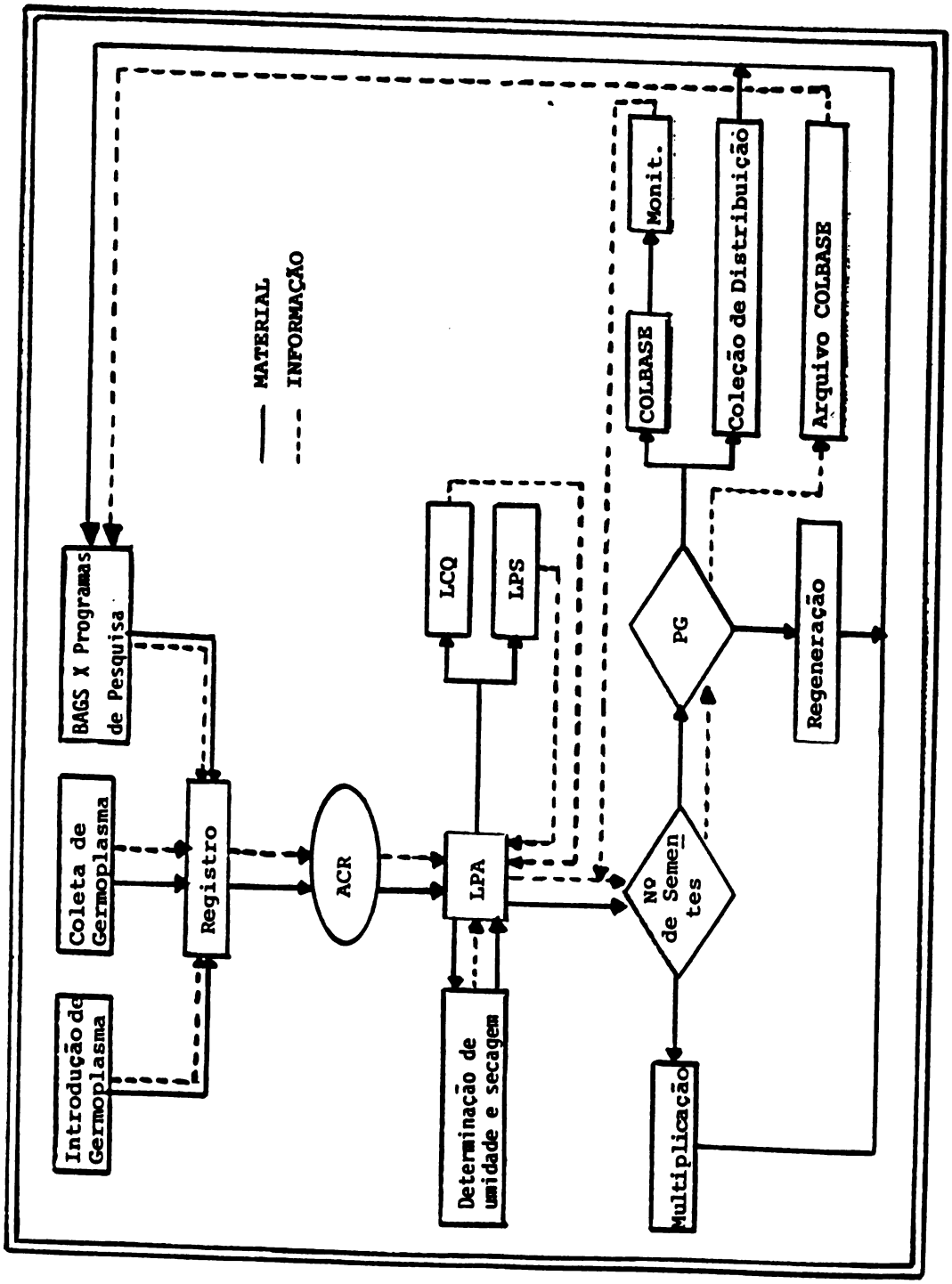



*Figura 2.Fluxograma de Conservação de Sementes Ortodoxas no CENARGEN.*

## INTRODUÇÃO DE GERMOPLASMA-SEMENTE-DESCRIÇÃO DE CADA PASSO DO FLUXOGRAMA

A Área de Intercâmbio e Quarentena de Germoplasma (AIQ), é responsável pela coordenação e processamento do intercâmbio de germoplasma vegetal, além de executar a quarentena de pós-entrada do germoplasma importado, bem como a quarentena doméstica do germoplasma em trânsito no país. Desta feita, e em estreita colaboração com o Departamento Nacional de Produção e Defesa Vegetal, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MAARA), realiza o registro, análise fitossanitária, tratamento erradicante, quarentena e envio de germoplasma vegetal procedente de várias partes do mundo, aos usuários, com a maior segurança possível.

## COLETA DE GERMOPLASMA-SEMENTE

As coletas realizadas no Brasil, e no exterior são tão importantes quanto as introduções de germoplasma. Ênfase especial tem sido dada às coletas de produtos de valor econômico atual e/ou potencial, com grande diversidade em território brasileiro ou que se encontram em áreas ameaçadas de devastação (urbanização, colonização, mineração, construção de rodovias ou hidroelétricas, etc.). A variabilidade genética de variedades cultivadas, mantidas pelos agricultores representam um patrimônio valioso, em perigo de extinção, tendo em vista a sua crescente substituição por variedades melhoradas. Daí a necessidade do resgate de todo esse material ainda disponível na natureza.

## BAGS X PROGRAMAS DE PESQUISA

Todo programa de pesquisa para ser bem sucedido necessita de uma ampla base genética. A variabilidade genética de cultivares "primitivas" e mantidas pelos agricultores representa um patrimônio valioso em perigo de extinção, tendo em vista a sua crescente substituição por variedades melhoradas (erosão genética). Diante disso, praticamente em todo o mundo é reconhecido a necessidade de se preservar os recursos genéticos vegetais. Essas variedades primitivas, que passam de geração a geração, tem sido coletadas e incorporadas às coleções dos bancos ativos de germoplasma. Todo esse material básico é conservado a longo prazo no CENARGEN e também incorporado aos programas de pesquisa do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), através dos BAGs.

Também é nos BAGs que são efetuadas as multiplicações e/ou regenerações do germoplasma-semente. Para isso, é necessário que haja uma perfeita interação entre o curador do produto no CENARGEN e o curador de BAG nas unidades descentralizadas, onde fisicamente estão instalados os bancos ativos de germoplasma; visto que as decisões a serem tomadas em termos de multiplicação, regeneração, introdução, coleta etc. não devem ser unilaterais, mas requer a participação efetiva de ambas as partes.

## ÁREA DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS-ACR

A conservação propriamente dita é executada nesta área. Após o registro na AIQ o germoplasma-semente juntamente com as informações pertinentes são encaminhados para a Área de Conservação de Recursos Genéticos (ACR).

### Laboratório de Preparo de Amostra-LPA

Neste laboratório, inicialmente o material é beneficiado isto é, faz-se a limpeza, contagem do nº de sementes, determinação de umidade, secagem se necessário, separação de subamostras, embalagem, selagem, localização nas câmaras frias e processamento de todas as informações referentes a cada acesso. As subamostras retiradas são destinadas à determinação do teor de umidade (LPA) e testes de germinação (LCQ), enquanto o material restante é depositado em uma câmara a 10°C e 30 por cento de umidade relativa, denominada câmara de armazenamento provisório, aguardando o resultado das análises.

## UMIDADE E SECAGEM DA SEMENTE

O alto teor de umidade da semente é a maior causa de reduções na qualidade fisiológica de semente

armazenada, Popinigis (1985). A umidade do germoplasma-semente no CENARGEN, tem sido determinada seguindo-se a orientação do Comitê Consultivo do IBPGR sobre Armazenamento de Semente, o qual sugere que para bancos de germoplasma, seja usado o método da estufa, ISTA (1976):

$$\% \text{ umidade} = \frac{PF - PS \times 100}{PF}$$

*Onde: PF=Peso Fresco; PS=Peso Seco*

O principal objetivo da secagem é reduzir o conteúdo de umidade a um nível tal que prolongue a longevidade durante o armazenamento, aumentando assim, o intervalo de regeneração, FAO/IBPGR (1982). Vários métodos de secagem existem, mas os preferíveis são: sílica gel ou câmara de secagem com controle de umidade e temperatura do ambiente. Contudo, a recomendação de FAO/IBPGR (1992), é uma sala de secagem com temperatura de 10 a 25°C e 10 a 15 por cento de umidade relativa.

O CENARGEN dispõe de uma sala de secagem funcionando com uma temperatura de 22 a 24°C e 15 por cento de umidade relativa.

## LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE (VIABILIDADE)

Popinigis (1985), define qualidade fisiológica da semente como o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade. A qualidade fisiológica da semente é a sua capacidade de desempenhar funções vitais, caracterizada pela sua germinação, seu vigor e sua longevidade. A alta qualidade da semente reflete diretamente na cultura resultante, em termos de uniformidade da população da ausência de patógenos transmitidos pela semente, do alto vigor das plantas e da maior produtividade.

Para o teste inicial de germinação (viabilidade), o Comitê consultivo do IBPGR sobre Armazenamento de Semente, IBPGR (1985), recomenda que uma amostra fixa de semente deve ser usada. No CENARGEN são utilizadas 200 sementes tiradas ao acaso, para cada teste, ou seja quatro repetições de 50 sementes/acesso. O método adotado é o do papel germiteste (papel-toalha) e germinadores com temperaturas constantes ou alternadas, dependendo da espécie em estudo, Brasil, MARA (1992).

## LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DE SEMENTES-LPS

O teste de patologia não é feito no início do processo de armazenamento do germoplasma-semente, mas sim durante o teste de monitoração periódica. Esse teste é feito por amostragem, onde apenas 10 por cento do lote é amostrado. O germoplasma-semente não é tratado quimicamente no início do armazenamento, por razões técnicas; inclusive FAO/IBPGR (1992), relata que não se conhece nenhum benefício evidente do tratamento químico das sementes que se destinam a conservação a longo prazo (-20°C) durante o armazenamento. Os produtos químicos podem causar danos cromossômicos, danos à saúde. Contudo, no CENARGEN adota-se a prática de comunicar ao curador de banco de germoplasma durante o processo de multiplicação e/ou regeneração a necessidade do tratamento químico de determinado acesso antes do plantio, quando se constata a presença do patógenos na semente armazenada durante os testes de monitoração. E neste caso, é feita a recomendação do produto(s) químico(s) específico(s) e a dosagem mais adequada.

## REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO

Basicamente o intervalo de regeneração vai depender da longevidade da semente durante o armazenamento. A regeneração no CENARGEN, tem sido recomendada toda vez que a viabilidade (poder germinativo da semente) esteja abaixo do nível crítico adotado por esta instituição, isto é, abaixo de 80 por cento, veja Quadro 1.

De acordo com a FAO/IBPGR (1992), a regeneração deve ser conduzida toda vez que a viabilidade da semente atingir 85 por cento da viabilidade inicial. O

Quadro 1. Padrões adotados na conservação a longo prazo.

| Itens | FAO/IBPGR, 1992* | EMBRAPA/CENARGEN** |
|---|---|---|
| 1. Nº de sementes (tamanho da amostra) | - aceitável - 1.000 sementes viáveis.<br>- preferível - 1.500 a sementes viáveis. | 1. mínimo - 1.000 sementes |
| 2. Umidade | - 3 - 7% | 2. 3 - 7% |
| 3. Viabilidade (P.G.) | - >85% para maioria das espécies. ex. cereais<br>- 75% para algumas espécies hortícolas.<br>- <75% para espécies silvestres e espécies florestais. | 3. 80% |
| 4. Embalagem | - embalagem selada à quente e à prova de umidade, que pode ser testada regularmente para assegurar a qualidade do material e do selo.<br>- preferível - Estocagem de acessos individuais em múltiplos containers (várias embalagens) do mesmo acesso, como uma segurança especial. | 4. embalagem hermética selada à quente - sacos de polietileno aluminizados. |
| 5. Temperatura | - aceitável - temperatura subzero (<0°C) com umidade da semente variando entre 3 - 7%, dependendo da espécie.<br>- preferível - (-18°C) ou mais frio, sendo a umidade da semente 3 - 7% dependendo da espécie. | 5. -20°C. |

* *Compilado da FAO/IBPGR, 1992.*

** *Nem todos os acessos que compõem a coleção estão dentro dos padrões. Existem acessos que estão acima e acessos que estão abaixo dos padrões.*

método de regeneração deve seguir os padrões normais daquele cultivo, de modo que um determinado nº de plântulas sejam suficientes para manter a integridade genética daquele acesso.

A multiplicação do germoplasma semente no CENARGEN é indicada quando o nº de sementes está abaixo do padrão mínimo adotado por esta instituição, ou seja, quando o nº de sementes de um acesso estiver abaixo de 1.000.

## COLEÇÃO DE BASE

É o repositório da variabilidade genética que não deve ser manipulado, e que é considerado material de segurança nacional, Goedert (1988). São também coleções mantidas em condições que asseguram a viabilidade do material por longo prazo (até 100 anos), e normalmente não são utilizadas nas operações de rotina, como, distribuição e intercâmbio de acessos. Seu objetivo é: segurança, proteção, garantia.

A coleção de base do CENARGEN conta com duplicatas de coleções internacionais, como é o caso da cevada (*Hordeum vulgare* L.) com 18.000 acessos e parte da coleção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do CIAT, com 3.500 acessos.

Sumarizando, a coleção de base do CENARGEN conta com aproximadamente 70.000 acessos, representando 373 espécies e 166 produtos.

## EMBALAGENS ALUMINIZADAS

Especificações das embalagens, conforme Hanson (1985):

- Uma camada externa de 17g/m² de Terilene (poliester) + 4g/m² de laca.
- Uma camada mediana de 33g/m² (12m) de folha de alumínio + 4g/m² de laca.
- Uma camada interna de 63 g/m² de polietileno.

Os tamanhos usados no CENARGEN são:

- 16 x 26 cm
- 13 x 18 cm
- 6 x 9 cm

## MONITORAÇÃO DA VIABILIDADE

O principal objetivo da monitoração da viabilidade é saber se determinado acesso necessita ou não ser regenerado. Inicialmente o CENARGEN estabeleceu o intervalo de cinco anos para efetuar os testes de monitoração. Com base nos resultados da última monitoração levada a efeito em 1991, onde três produtos foram trabalhados (feijão, soja e triticale), decidiu-se aumentar o intervalo de monitoração para dez anos considerando que os resultados obtidos foram muito bons, isto é, praticamente não houve perda da viabilidade durante esse período o que vem de encontro ao recomendado pela FAO/IBPGR (1992); se o material entra para a coleção de base com viabilidade inicial ótima (>85%) esse intervalo pode ser dez anos ou mais, para o caso de cereais e 75 por cento para algumas espécies hortícolas ou até mesmo menos para algumas espécies silvestre e espécies florestais, que normalmente não atingem alto nível de germinação.

## COLEÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO

O germoplasma-semente é intercambiado livremente mediante solicitação das instituições de ensino e pesquisa dentro e fora do país. Normalmente os pedidos são feitos diretamente ao CENARGEN ou ao banco ativo pertinente. A coleção ativa existente no BAG visa atender aos programas de pesquisa da unidade, assim como, dispor de material para intercâmbio, avaliação, caracterização, regeneração e/ou multiplicação.

## ARQUIVO COLBASE

Uma base de dados computadorizada foi estabelecida, para ajudar no manejo, monitoração, documentação e processamento de todas as informações relativas a coleção de base, Vilela Morales et al. (1984). A importância da COLBASE para a pesquisa agropecuária brasileira com ênfase em genética e melhoramento é de indiscutível valor estratégico para as atividades futuras. Sua importância é tão crucial para o futuro, que uma adequada conservação do germoplasma-semente com baixo nível de "erosão genética" será uma garantia para o desenvolvimento de tecnologias adequadas às necessidades futuras.

Os principais tipos de relatórios operacionais que este programa oferece são os seguintes:

1. Relatório geral por produto;
2. Relatório resumo;
3. Relatório controle de qualidade;
4. Relatório alfabético por denominação;
5. Relatório total por produto/ano;
6. Relatório de acessos/ano;
7. Relatório número de câmara;
8. Relatório etiqueta;
9. Relatório geral por processo.

## CONCLUSÃO

O manejo de um banco de germoplasma parece ser simples, entretanto, esta atividade requer tomadas de decisões importantes em cada passo do processo. Além disso várias dificuldades identificadas durante os procedimentos envolvidos podem ser evitados desde que a pessoa responsável esteja cônscia da importância da semente como a mais preciosa herança para a humanidade.

## LITERATURA CITADA

BRASIL. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. MARA. SNDA/DNDV. Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para Análise de Sementes. Brasília, DF.

FAO/IBPGR. 1992. Expert Consultation Group on Genebank Standards. Rome, Italy, 26p.

GOEDER, C.O. 1988. Conservação de Germoplasma Semente. In: Encontro sobre Recursos Genéticos. 1º Jaboticabal. Anais. Jaboticabal, UNESP/FCAVI p. 78-95.

HANSON, J. 1985. Practical Manual for Genebanks: nº 1. Proceedures for handling seeds in Genebanks. IBPGR Secretariate, Rome, 115p.

IBPGR. 1985. Seed Storage Advisory Committee. Report of the Third Meeting. Rome, Italy.

ISTA. 1976. International rules for seed testing, annexes 1976. Seed Sci. and Technol., 4: 51-177.

POPINIGIS, F. 1985. Fisiologia da semente. Brasília [s.n]. 289p.

VILELA MORALES, E.A.; GODOY, R. e MONTEIRO, J.S. 1984. Subsistema "colbase" para controle e manejo da coleção básica de germoplasma mantida no CENARGEN. Brasília, DF: EMBRAPA, 24p.

# Formação e estrutura das sementes

por Rosana de Carvalho Cristo Martins *

## INTRODUÇÃO

Os eventos biológicos necessários para produção de sementes são: iniciação de primórdios reprodutivos, desenvolvimento favorável dos óvulos e estames, polinização adequada, fertilização e desenvolvimento normal pós-fertilização.

A formação de sementes resultante da união dos gametas masculino e feminino, começando com a transferência do grão-de-pólen, quer por meio biótico ou abiótico, dos estames ou estróbilos masculinos para os pistilos ou cones ovulados (POLINIZAÇÃO), e, subsequentemente, o crescimento do tubo polínico até atingir o óvulo ou arquegônio, com posterior união dos gametas (FERTILIZAÇÃO).

As condições favoráveis a ambos os processos, polinização e fertilização, são necessárias para que haja em seguida o processo de desenvolvimento pós-zigótico.

Nas florestas tropicais latifoliadas predominam as espécies hermafroditas, com pequena representação de espécies dióicas e monóicas. Nas espécies não-hermafroditas predomina a polinização abiótica, geralmente anemofilia, enquanto nas hermafroditas a polinização biótica é comum. A grande diversidade das florestas tropicais faz com que haja uma grande especificidade quanto aos seus polinizadores, demonstrando uma grande dependência dos vetores de polinização para o sucesso na produção ou formação das sementes em espécies tropicais.

Quanto aos fatores abióticos tem-se que mesmos possuem um papel duplo na polinização, atuando diretamente como vetores de pólen, ou indiretamente por afetar o transporte do pólen. A umidade relativa do ar, temperatura e velocidade do vento influenciam o transporte do pólen, podendo alterar significativamente a formação de semente de espécies anemófilas. A alta umidade do ar impede a liberação do pólen transportado pelo vento e prolongados períodos chuvosos na época da dispersão faz com que os estróbilos supera-madurecidos caiam ainda cheios de pólen, não sendo efetivada a polinização.

Deve haver também um certo grau de sincronismo entre o período de dispersão do pólen e o período em que as flores femininas se encontram receptivas dentro de uma mesma espécie para o sucesso da formação da semente.

## REPRODUÇÃO DAS GIMNOSPERMAS E ANGIOSPERMAS

### Gimnospermas

A reprodução das Gimnospermas apresenta as **fases esporofítica e gametofítica**. A **fase esporofítica**, na parte masculina, caracteriza-se pela produção do microsporócitos dentro dos microsporângios. Sofrem meiose originando numerosos microsporos haplóides. Estes dividem-se mitoticamente antes de serem eliminados dos microsporângios. Neste momento são denominados de **grãos polínicos**. Na parte feminina são formados os megasporângios, com apenas um megasporócito cada um. Após sofrer meiose, o megasporócito produz **quatro megasporos**, sendo que apenas **um é funcional** e os três restantes (na direção distal do esporângio) são abortados.

---

* *Professora Assistente do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília, Brasília, DF.*

A seguir, inicia-se a **fase gametofítica** que se caracteriza pela germinação do megasporo para produzir o megagametófito. Na extremidade distal, vários arquegônios alongados se desenvolvem mergulhados dentro do megagametófito. **Em cada arquegônio há uma oosfera**. Neste estágio, o tecido que protege a semente já se desenvolveu quase completamente o **nucelo (megasporânglo)** deixando somente a **micrópila**.

Os grãos polínicos liberados podem atingir o ápice do óvulo, levados por correntes de ar. A micrópila, então, exsuda uma gotícula muscilaginosa que promove a adesão do grão de pólen, sendo o mesmo carreado para o interior pelo dessecamento da gotícula. Neste ponto a célula generativa do grão polínico se divide dando origem a dois anterozóides. Já a célula vegetativa dá origem ao microgametófito, liberando os anterozóides até o megagametófito, podendo atingir a oosfera. Quando o **anterozóide atinge a oosfera forma-se o zigoto**, dando origem a uma nova fase esporofítica. O tecido carnoso do **megagametófito (1 n) origina** o **endosperma**.

**Angiospermas**

A **fase esporofítica** das Angiospermas, na parte masculina, pode ser caracterizada pela produção de microsporos pelos estames, que é formado por filete e antera. Estes microsporos sofrem divisão mitótica antes de serem eliminados dos estames, recebendo o nome de **grão-de-pólen**. A parte feminina apresenta a formação do megagametófito, onde vários arquegônios alongados se desenvolvem. **Em cada arquegônio há uma oosfera**.

A **fase gametofítica** caracteriza-se pela liberação dos grãos-de-pólen que podem atingir o estigma através do vento. O grão-de-pólen não atinge diretamente o óvulo. A célula generativa do grão-de-pólen se divide originando dois anterozóides. Já a célula vegetativa dá origem ao microgametófito bem fino e alongado que penetra na micrópila do óvulo, conduzindo os anterozóides até a oosfera. **Um anterozóide forma o zigoto unindo-se a oosfera e o outro anterozóide se funde com o saco embrionário dando origem** a uma célula triplóide que depois de muitas divisões forma **ao endosperma**. Após a formação do zigoto, inicia-se outra fase esporofítica.

## DESTAQUE QUANTO AS CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS NA FORMAÇÃO DE SEMENTES DE GIMNOSPERMA E ANGIOSPERMA

A formação de qualquer semente verdadeira requer: polinização e fecundação, produção de um novo embrião e uma cobertura protetora (tegumento).

Tanto a fase esporofítica quanto a gametofítica são muito importantes no ciclo reprodutivo das plantas, sendo que nas Angiospermas há redução na fase gametofítica, permitindo uma possibilidade maior de eficiência da fecundação. Neste caso a fase esporofítica apresenta-se em maior evidência.

A sementes de Angiospermas é um óvulo maduro, fecundado, contendo o embrião e nutrientes acumulados, com tegumento ou tegumentos diferenciados. Já a semente de Gimnospermas é uma semente nua, porque não fica dentro de um ovário transformado em fruto, mas presa às folhas carpelares abertas.

A semente de Angiospermas é protegida pelo fruto. Sua flor é dita completa, com cálice, corola (conjunto de pétalas), androceu (órgão/aparelho reprodutivo masculino) e gineceu (órgão/aparelho reprodutivo feminino). Os órgãos reprodutores podem ocorrer na mesma flor (flores hermafroditas - Ex. *Eucalyptus* spp.) ou em flores separadas na mesma árvore (espécies monóicas - ex.: *Pinus* spp.) ou em flores e árvores separadas (espécies dióicas - ex.: *Araucaria angustifolia*).

O **gineceu** é formado pelo estigma, estilete e ovário. É neste último que se forma a semente. O ovário prende-se à flor através do funículo, que após a maturação da semente se desprende e dá origem ao hilo. No interior do ovário, protegido pelo tecido denominado nucela (o) encontra-se o óvulo. O gametófito feminino ou óvulo é constituído por oito células, sendo três antípodas, duas sinérgides, a oosfera, e dois núcleos polares. As sinérgides e as antípodas se degeneram rapidamente, não tendo ainda função definida.

Com relação ao **androceu**, local onde são encontrados os grãos-de-pólen protegidos nos sacos polínicos. A antera e o filete são partes do androceu visíveis na flor. É na antera que se localizam os sacos polínicos quese abrem na época adequada para o dispersão do pólen. O gametófito masculino (pólen) é formado por duas células, uma vegetativa e outra reprodutiva, com funções específicas na fertilização, e, ainda, possui uma camada externa denominada exina e uma camada interna, a intina.

Quanto as Gimnospermas tem-se que o óvulo se desenvolve diretamente na flor, sem a proteção do ovário. São exemplos de Gimnospermas a *Araucaria angustifolia*, que é dióica, e *Pinus* spp., que é monóico, com flores femininas na parte inferior da copa e flores masculinas na parte superior, em sua maioria. As flores femininas das *Pinaceae* são denominadas cones. Apresentam um eixo central de onde partem as escamas. Na base de cada escama, junto ao eixo, encontram-se dois óvulos visíveis a olho nú, com expansões alares.

A flor masculina ou estróbilo é de menor tamanho que o cone. Constitui-se por um eixo central de onde partem numerosas escamas, onde se encontram localizados os sacos polínicos contendo o grão-de-pólen.

O óvulo é formado por um tecido, a nucela (o), protegida por uma camada de célula denominada de integumento, que apresenta uma pequena abertura, a micrópila, por onde penetra o grão-de-pólen por ocasião da polinização. O óvulo é preso à escama pela região oposta à micrópila, a chalaza, por onde é transportada a seiva para a sua nutrição. A oosfera encontra-se protegida em *Pinus*, nos arquegônios, típico saco embrionário das Gimnospermas. Os arquegônios, geralmente em número de dois, formam-se perto da micrópila, e contem a oosfera, um núcleo e um "pescoço" rudimentar. É comum entre as *Pinaceae* ocorrer a fertilização de mais de um arquegônio, tratando-se da poliembrionia.

O pólen, por sua vez, originalmente é formado por quatro células, sendo que duas se degeneram (células do protalo). O grão-de-pólen maduro é formado por uma célula reprodutiva e uma vegetativa que irá dar origem ao tubo polínico. Nos estróbilos são formadas grandes quantidades de grãos-de-pólen por ocasião da dispersão.

Nas Angiospermas o período entre o florescimento e a produção de sementes é curto, podendo ser de semanas, como no caso de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*) que é de aproximadamente três semanas. Já nas Gimnospermas o período entre a polinização e a formação da semente é extenso, o que as torna suscetíveis a danos causados por alterações climáticas (geadas, chuvas excessivas, secas prolongadas, entre outros) durante a fase de germinação do tubo polínico. Isto se deve ao fato de que enquanto em Angiospermas a germinação do tubo polínico é rápida (durando dias ou semanas), nas Gimnospermas o processo é lento, podendo extender-se por meses ou até anos, tendo em vista que tanto o óvulo quanto o pólen ainda estão em estágios atrasados de desenvolvimento na época da polinização.

A dupla fertilização ou singamia, quando o núcleo de um esperma ou anterozóide une-se aos núcleos polares constituindo um núcleo triplóide denominado "núcleo do endosperma primário" enquanto o outro esperma ou anterozóide fecunda a oosfera dando origem ao zigoto, é uma característica típica das Angiospermas.

## ESTRUTURA DA SEMENTE

A semente é o resultado de um óvulo fertilizado. Em quase todos os casos é possível o reconhecimento das seguintes estruturas quando se desenvolve o óvulo fertilizado: (1) Testa, que é o produto de um ou mais integumentos do óvulo: (2) Perisperma, que é derivado do nucelo (a); (3) Endosperma, produzido como resultado da fusão entre um núcleo generativo (masculino) e dois núcleos polares para formar o núcleo do endosperma triplóide; (4) Embrião, resultado da fertilização da oosfera (ovo) por um núcleo masculino.

Até quando estes vários componentes continuam seu desenvolvimento ou se são ou não mantidos

promove algumas das diferenças estruturais fundamentais entre os vários tipos de sementes. Em muitas espécies, o tecido extra-ovular, especialmente a parede do ovário (pericarpo), torna-se estreitamente associado com a semente durante sua formação. Variações no tamanho, presença ou ausência de endosperma, cor da testa e quantidades de clorofila podem ser encontradas em várias espécies. Os fatores responsáveis pela produção dessas diferenças são pouco conhecidos.

**Testa**

A testa é geralmente uma cobertura dura; em alguns casos há uma fina camada de células na testa formado a partir do integumento interno. Uma atenção especial tem sido dada pela taxonomia à anatomia da testa para a distinção entre gêneros e espécies. Sua importância fisiológica nasce da presença de uma cutícula externa e interna, freqüentemente gordurosa ou cerosa, e uma ou mais camadas espessas. Estas características conferem a testa um certo grau de impermeabilidade à água e/ou aos gases, incluindo o oxigênio. Logo, ela pode exercer uma influência regulatória sob o metabolismo e o crescimento dos tecidos internos e órgãos da semente. Em alguns casos, a testa pode vir a apresentar uma muscilagem que vai exercer uma importante influência sobre a retenção de água e a dispersão da semente.

Além de sua coloração e textura, uma característica óbvia da testa é o hilo. Ele é a cicatriz, geralmente de cor diferente do resto da testa e de forma variável e tamanho de acordo com a espécie, marcando o ponto de contato da semente com o funículo. Em muitas sementes uma abertura pequena, encontra-se no final do hilo.

A testa de algumas espécies pode ter pêlos ou expansões alares (asas) que auxiliam na dispersão das sementes, com por exemplo em *Epilobium*, *Salix*, *Lilium* spp. Também situados na testa da algumas espécies estão as protuberâncias, tal como o crescimento no hilo denominado estrofiolo; ele pode ser importante no controle do movimento de entrada e saída de água da semente.

Outras protuberâncias são os arilos. O arilo associado com a micrópila, tal como em *Ricinus communis*, denomina-se carúncula. Os arilos podem ter outras formas, tais como botões, faixas, cristas ou cúpulas, e freqüentemente têm um colorido brilhoso. Um arilo com o qual se está familiarizado é o de *Myristica fragans*, que produz um condimento muito característico. Os arilos freqüentemente contém compostos químicos incomuns não encontrados em qualquer outro lugar da planta. Outro exemplo interessante é o de *Thaumatococcus* que tem uma proteína extremamente adocicada. Os conteúdos arilares podem ser importantes na atração dos animais que auxiliam na dispersão da semente.

Muitas "sementes", cuja bioquímica e a fisiologia tem sido intensamente estudadas são frutos verdadeiros. O girassol (*Helianthus annum*) e o alface (*Lactuca sativa*) são cipselas (um tipo de aquênio), os grãos de cereal são cariopses (aquênios nos quais o pericarpo e a testa rudimentar são fundidos) e *Fraxinus* e *Ulmus* que são aquênios alados chamados de sâmaras.

Em um pequeno número de espécies a "testa" não é derivada nem de integumentos ovulares nem do pericarpo, mas de camadas externas do endosperma (ex.: *Crinum*).

**Perisperma e endosperma**

O perisperma, na maioria das sementes, desaparece no início do desenvolvimento da semente. Mas em uns poucos casos (ex.: *Yucca, Coffea*) este tecido torna-se o armazenador maior das reservas alimentares da mesma. Nestas sementes o endosperma é geralmente ausente, mas pode ocorrer também de apreciáveis quantidades de endosperma estarem presentes.

As sementes são denominadas endospermáticas ou não-endospermáticas, dependendo da presença ou ausência do endosperma bem formado. Entretanto, muitas espécies não podem ser classificadas como endospermáticas embora possuam endosperma, pois este não passa de uma camada ou poucas camadas de células (ex.: *L. sativa*). O endosperma, quando relativamente grande, armazena as reservas

alimentares: exemplos conhecidos são os membros das *Gramineae, Trigonella foenum-graecum, R. communis* e *Phoenix dactylifera*. Nestes casos, os cotilédones são relativamente pequenos em massa ou são órgãos haustoriais.

Durante o desenvolvimento da semente o endosperma circunda o embrião (exceto em *Orchidaceae*, onde é ausente) e pode persistir como um tecido relativamente grande até estágios bem avançados de desenvolvimento da semente (ex.: *Pisum*). Entretanto, quando o embrião vai ocupar, então, toda a semente. Onde o endosperma não passa por isso, ou seja nas sementes endospermáticas, seu desenvolvimento pode ser, entretanto, irregular. Nos cereais, o endosperma desenvolve-se unilateralmente. Em algumas sementes o endosperma é ruminado, tendo em vista o crescimento para dentro da cobertura externa (ex.: *Hedera helix*).

O endosperma dos membros das *Gramineae* e certas outras espécies (ex.: *Trigonella, Fagopyrum*) é caracterizado pela posse de uma camada externa de aleurona. Quando a semente começa a amadurecer, as células periféricas do endosperma que cortam as células internamente começam a se dividir anticlinalmente para formar células pequenas de aparência retangular na seção. Uma ou mais camadas destas células podem ser produzidas, tornando-se bastante espessas, com corpos desenvolvidos de proteína denominados grãos de aleurona e, mais importante, permanecem vivas.

O verdadeiro endosperma é derivado da união de dois núcleos polares do óvulo e um núcleo masculino. Portanto, trata-se de um tecido triplóide, mas em muitas espécies vários graus de ploidia são encontrados, freqüentemente em células diferentes. É o resultado da fusão nuclear que ocorre durante o desenvolvimento do endosperma.

Finalmente, percebe-se que o endosperma de coníferas (ex.: *Pinus*) é haplóide, desenvolvendo-se do tecido megagametofítico. Embora ele tenha função de endosperma verdadeiro, sendo o repositório de reservas armazenadas, deve-se considerar a sua origem e desenvolvimento diferentes.

**Embrião**

Consiste em um eixo embrionário com um ou mais cotilédones. O eixo embrionário é composto por hipocótilo (ao qual os cotilédones são presos), a radícula (que costuma ser de difícil separação do hipocótilo), e a plúmula (broto apical com a primeira folha verdadeira ou folhas). Raramente um mesocótilo (um internó entre os cotilédones) está presente.

Estas partes do embrião são geralmente fáceis de se distinguir em um embrião de dicotiledônea, mas de difícil identificação em muitas monocotiledôneas, especialmente em *Gramineue*. O cotilédone único destes embriões torna-se geralmente haustorial; isto é, o escutelo. A bainha basal do cotilédone alonga-se para o coleóptilo e o hipocótilo torna-se modificado em algumas espécies, particularmente no mesocótilo. A coleorriza pode ser interpretada como a base do hipocótilo envolvendo a radícula.

As formas dos embriões e sua posição na semente variam grandemente entre as espécies. Nas espécies dicotiledôneas que tem um endosperma substancial, o embrião, é claro, ocupa proporcionalmente pouco da semente. Acima de tudo, os cotilédones dessas sementes endospermáticas, desde que não armazenem reservas, são freqüentemente finos, delicados e como folhas.

Por outro lado, os cotilédones de sementes não-endospermáticas são muito volumosos, e, em alguns casos, tais como *Pisum* e *Phaseolus*, chegam a representar mais de 90 por cento da massa da semente. Os cotilédones de não-endospermáticas de espécies epígeas (ex: *Lactuca, Cumunis*), os quais atuam como folhas após a germinação, não são tão maciços quanto nos tipos hipógeos.

Em algumas espécies os cotilédones exibem formas complexas, eles são intensamente divididos em *Tilia*, cupilar em *Myzodendron*, e com muitas convulações em *Juglans*. Raramente os cotilédones são excessivamente reduzidos, como em *Bertholletia excelsa*, onde eles são órgãos fechados acima de um maciço, o hipocótilo volumoso.

Os cotilédones de sementes de muitas espécies parasitas estão ausentes. Os cloroplastos estão

presentes nos cotilédones de muitas espécies, tais como *Acer* spp., *Capsella bursa pastoris e Salsola* spp.

As sementes de algumas espécies, tais como *Linum usitatissimum, Citrus* spp., *Empetrum nigrum, Poa alpina* e *Opuntia* mostram poliembrionia. Isto pode ocorrer devido a clavagem do zigoto, desenvolvimento de uma ou mais sinérgides, existência de mais de um saco embrionário por nucelo (a), entre outras causas. Em algums tipos de poliembrionia os embriões formados são haplóides, com em *Linum.*

É possível, ainda, observar que em algumas espécies os embriões são extremamente reduzidos ou imaturos. As sementes de orquídeas tem diminutos e pouco-diferenciados embriões, sem endosperma. Outras espécies produzem sementes com embriões muito mais desenvolvidos que os de orquídeas, mas, são ainda imaturos. Isto acontece em *Fraxinus* spp. e *Ranunculus ficaria*, onde o desenvolvimento do embrião continua após a semente ter se liberado da planta-mãe.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do conhecimento dos fatores que promovem a produção das sementes, quer sejam de espécies agrícolas quer sejam de espécies florestais, é possível o estabelecimento de técnicas de manejo de forma a se obter sementes com a qualidade desejável, em quantidade conveniente e na época de interesse.

Da mesma forma, é importante o conhecimento da estrutura da semente para se explorar melhor, principalmente, suas características promotoras de atração dos agentes de dispersão e acompanhar o sucesso da sua germinação e estabelecimento da plântula, sempre ciente de que a presença ou não de uma determinada estrutura e suas características na semente é o resultado da pressão de evolução da espécie.

## LITERATURA CONSULTADA

AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. & FIGLIOLIA, M.B. (coord.) 1993. Sementes Florestais Tropicais. Brasília, ABRATES. 350 p.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1978. Phisiology and biochemistry of seeds: in relation to germination. Vol. 2. Springer-Verlag. N.Y. 375 p.

MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. The germination of seeds. Fourth Edition. Pergamon Press.

MURRAY, D.R. 1984. Seed physiology: development. Vol. 1. Academic Press.

--------. 1984. Seed physiology: germination and reserve mobilization. Vol. 2. Academic Press.

POPINIGIS, F. 1977. Fisiologia da semente. AGIPLAN, Brasília. 289p.

# Fatores que afetam a qualidade das sementes

por Flávio Popinigis *

Desde o aparecimento da agricultura, o homem preocupa-se em assegurar a disponibilidade de sementes para o próximo plantio. Além dos problemas de proteção contra roedores, passáros, insetos e microorganismos, a conservação de sementes é também afetada por outros fatores que podem causar a perda completa do seu valor para plantio.

O emprego de sementes de alta qualidade é de fundamental importância para se conseguir a boa formação da lavoura, bem como par se otimizar a ação dos demais insumos e fatores de produção. No conceito de qualidade da semente está o conjunto de atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que influenciam a capacidade do lote de originar lavoura uniforme, constituída de plantas vigorosas e representativas da cultivar e de não contaminá-la com predadores e plantas invasoras ou indesejáveis (Popinigis 1985).

Na agricultura moderna, a produção e distribuição de sementes de alta qualidade é imperativa. Ela decorre da existência e funcionamento harmônico de um conjunto de atividades integrantes de um sistema de sementes. Durante sua obtenção, conservação e distribuição e semeadura, a semente fica sujeita a sofrer maior ou menor grau de incidência de fatores favoráveis ou desfavoráveis à preservação de sua qualidade. A seguir, é feita uma análise da atuação potencial dos fatores mais importantes.

* *Engenheiro Agrônomo, Ph.D, Pesquisador, Coordenador de Qualidade de Pesquisa & Desenvolvimento. EMBRAPA. Brasília, DF.*

## ESPÉCIE

Este fator está relacionado principalmente à longevidade e à pureza física das sementes.

A longevidade da semente é variável entre as espécies. As sementes são classificadas em "de vida curta" e "de vida longa".

Alguns exemplos de sementes de vida curta são: chuchú, café, seringueira, jaboticaba, cacau, manga, vários citrus, e outras. De vida longa são as sementes de: aveia, cevada, arroz, trigo, milho, cebola, beterraba, feijão, ervilha, tomate e outras.

Para as sementes das grandes culturas, quando armazenadas sob condições idênticas, as sementes oleaginosas deterioram-se mais rapidamente que as albuminosas.

Em relação à pureza física, é notória a dificuldade em se conseguir elevado grau de pureza em espécies gramíneas forrageiras. Porém nas leguminosas forrageiras e nas demais espécies cultivadas em geral, a pureza física, via de regra, não se constitui em obstáculo à boa qualidade da semente.

## SEMENTE-MÃE

Para se obter uma semente de boa qualidade, deve-se instalar e conduzir, adequadamente, um campo de produção de sementes. A semente utilizada na implantação desse campo pode ser o fator decisivo entre se alcançar ou não essa boa qualidade. De modo a propiciar uma perspectiva favorável à obtenção de alta qualidade, é importante que se utilize semente sadia, geneticamente pura e representativa da cultivar, e que não contenha contaminantes. Essa semente a

ser plantada deve ser adquirida de fontes fidedignas e ser de cultivar recomendada. No ato de aquisição, deve-se conferir a identificação da cultivar nas embalagens, se todas embalagens são da mesma cultivar, e, se possível, do mesmo lote; se o teste de germinação ainda é válido e se os selos, etiquetas e a própria embalagem não foram violados.

Para produzir sementes, deve-se ainda observar as exigências da entidade certificadora ou fiscalizadora, de modo a utilizar a classe de sementes adequada.

## TERRENO

A seleção do terreno pode influir decisivamente na qualidade da semente que será produzida. Ao selecioná-lo, deve-se obter informações sobre os cultivos anteriores, e observarse:

a. Permite isolamento adequado.

b. Apresenta boas condições topográficas, boa fertilidade e adequada condição física.

c. É livre de invasoras nocivas.

d. É livre de patógenos capazes de afetar o campo e infectar as sementes a serem produzidas.

e. Não foi anteriormente plantado com a espécie em produção no cultivo anterior a não ser que tenha sido com a mesma cultivar e aprovado para a mesma classe de semente.

## ISOLAMENTO

O isolamento do campo de produção de sementes de outros da mesma espécie previne a contaminação genética e a ocorrência de misturas varietais procedentes de lavouras vizinhas.

A contaminação genética ocorre principalmente em espécies alógamas e, nestas, o isolamento adequado pode evitar a perda da pureza genética da cultivar.

Nas espécies autógamas, o isolamento permite evitar principalmente as misturas possíveis de ocorrência durante as operações de semeadura e colheita.

O isolamento com objetivo de obtenção de elevada qualidade sanitária inclui também o controle e erradicação de plantas hospedeiras ao redor do campo. Para evitar que destas se propaguem agentes predadores para o campo de sementes.

## SEMEADURA

As semeadeiras e demais máquinas e equipamentos utilizados na semeadura podem ser, quando não-adequadamente limpos, fonte de contaminação da lavoura, e conseqüente perda de qualidade. Antes da semeadura, deve ser efetuada limpeza completa do equipamento, para remover sementes da mesma ou de outras espécies e de espécies silvestres e nocivas.

A densidade de semeadura deve, de preferência, ser um pouco menor que aquela utilizada em lavouras para consumo, a fim de permitir observação das plantas individualmente, de modo que possa ser obtida melhor qualidade ou pureza varietal.

Os adubos ou fertilizantes a ser utilizados deverão ser visualmente examinados, a fim de evitar que levem ao solo sementes de outras cultivares, de outras espécies ou de invasoras.

## CONTROLE DE INVASORAS

O controle de invasoras nos campos de produção de sementes permite evitar perdas de qualidade causadas pela formação de micro-clima úmido resultante da vegetação dessas plantas por ocasião da maturação das sementes, que favorece também o desenvolvimento de doenças fúngicas.

Além disso, a presença de plantas invasoras em excesso impede a observação de eventuais contaminantes, prejudicando a inspeção e a erradicação, podendo resultar em perda da qualidade e condenação do campo ou da semente colhida.

O controle inicia-se com a seleção de terreno não infestado, e deve prosseguir com a utilização de práticas culturais apropriadas, tais como uso de herbicidas de pré e pós-emergência, e capinas mecânicas ou manuais, se necessárias.

## CONTROLE DE PRAGAS

Algumas pragas atacam as sementes, afetando sua qualidade.

Em alguns casos, os insetos podem ser vetores de doenças indesejáveis ou de níveis limitados de tolerância. A fim de evitar essa perda de qualidade, a lavoura deve ser constantemente examinada e o controle de pragas efetuado antes de ocorrência de danos.

## CONTROLE DE DOENÇAS

As doenças da lavoura podem ter origem nos patógenos presentes na semente utilizada na sua instalação, no solo, na água de irrigação, ou transportar pelo vento ou por insetos vetores, grande parte das doenças das principais culturas podem ser evitadas pela utilização de cultivares resistentes, emprego de sementes sadias ou tratadas e previnindo-se a contaminação do solo.

Outras medidas dependem do problema específico, porém algumas de ordem geral são a rotação de culturas, erradicação de plantas hospedeiras do patógeno e controle dos vetores, irrigação por sulcos ao invés de aspersão, e colheita sem demoras, evitando o desenvolvimento de patógenos.

## CLIMA

A produção em regiões de clima seco, sob irrigação, permite produzir sementes de elevada qualidade fisiológica e sanitária. O clima seco desestimula ou até impede a proliferação de agentes patogênicos e a interrupção do suprimento de água, próximo ao ponto de colheita, permite colher a semente seca, com alto vigor.

Em climas úmidos, pode ocorrer a proliferação de doenças, e a deterioração das sementes no campo, antes da colheita.

## COLHEITA

Uma colheita bem conduzida, efetuada no momento oportuno, permite evitar perdas de qualidade durante essa operação.

Deve-se evitar colher para sementes áreas contendo excesso de invasoras ou de plantas acamadas.

O teor de umidade da semente é, na prática, o indicador do ponto de colheita. Em geral as sementes de grãos e cereais (arroz, feijão, milho, sorgo e trigo), podem ser colhidas tão logo seu teor de umidade desça para 22 por cento ou menos. Todavia, quanto menor o teor de umidade, maior o risco de ocorrência de danos mecânicos. Uma vigilância constante deve ser mantida durante a colheita, reajustando-se as regulagens da colheitadeira diversas vezes durante o dia, à medida que a semente seca ou absorve umidade.

Também podem ocorrer perdas da qualidade genética nesta fase, resultante de misturas varietais causadas por sementes presentes na colheitadeira, remanescentes de colheita de outras lavouras. Por isso, todo equipamento de colheita e transporte deve ser criteriosamente limpo antes de que seja iniciada a operação.

## MATURIDADE

A maturidade fisiológica da semente marca seu ponto de máxima qualidade fisiológica. A partir deste, iniciam-se os processos deteriorativos, cuja velocidade de progresso depende das condições menos ou mais favoráveis, às quais ela é submetida.

A fim de obter o melhor nível possível de germinação e vigor, a semente deve ser colhida no seu ponto de maturidade, ou tão logo quanto possível, após o mesmo ter sido alcançado.

A obtenção de uniformidade ou elevado nível de germinação e vigor é dificultado em algumas espécies,

pelas características próprias de desuniformidade na maturação, como nas gramíneas forrageiras, por exemplo.

## SECAGEM

O método de secagem ou retardamento desta operação são fatores importantes que podem influenciar o nível de qualidade da semente.

Exposição prolongada ao sol, por exemplo, pode reduzir a germinação por excesso de exposição a temperaturas elevadas. Também na secagem com ar forçado e aquecido, a temperatura deste é fator crucial na determinação dos efeitos que podem ocorrer na qualidade da semente.

Tanto na secagem ao sol, como na secagem em modernos secadores mecânicos, a circulação de ar e a temperatura são fatores críticos em relação à qualidade fisiológica da semente. Na primeira, é necessário prover ventilação adequada pela limitação da camada de sementes e pelo revolvimento freqüente de sementes e o fluxo de ar, associados à temperatura, devem ser adequados ao tipo de semente e de secador, bem como ao teor de umidade em que estas se encontram.

De modo geral, a semente em sí, ou a massa de sementes, não deve ser submetida a temperaturas superiores a 43°C; este limite deve, inclusive, ser menor para sementes muito úmidas.

## CARACTERÍSTICAS DA UBS

A Unidade de Beneficiamento de Sementes (UBS) deve ser projetada de modo a oferecer capacidade suficiente para receber, secar e processar as quantidades de sementes previstas no programa ou previsão de produção. Unidades com capacidade insuficiente causam sobrecarga na recepção, na secagem e no setor de regulagem de fluxo, tornando maiores as chances de misturas varietais e deterioração por atrasos nas operações de secagem e limpeza.

Além disso, iluminação e circulação de ar adequados previnem erros humanos na limpeza a presença de poeira.

Também para prevenir perdas da qualidade genética, deve ser facilitada a limpeza, visando evitar misturas varietais causadas por sementes remanescentes de lotes beneficiados anteriormente, de outras cultivares. Assim, é importante que os pés dos elevadores e as correias transportadoras ao nível do piso, sejam alojados em poços e canais espaçosos, que facilitem a movimentação de operários ao seu redor, para limpeza adequada. Nos elevadores e nas máquinas, devem ser projetadas janelas de observação e de acesso interno para limpeza.

As moegas, cabeças e pés de elevadores devem ser construído de modo tal que sejam eliminados cantos e reentrâncias que possam alojar semente; as paredes das moegas devem ser lisas, sem frestas, rechaduras ou rugosidades, a fim de não permitir o alojamento nem a aderência de sementes.

## EQUIPAMENTO DA UBS

Além de adequadas ao tipo de sementes e com capacidade para processar os volumes produzidos, os equipamentos da Unidade de Beneficiamento devem prever a minimização ou supressão de danos mecânicos.

Também deve-se levar em conta o fato de que, somente a existência dos equipamentos não é suficiente para a obtenção da qualidade especificada. É também imprescindível que cada máquina seja regulada de modo a permitir a melhor separação ou classificação.

## LIMPEZA DA UBS

A limpeza das máquinas e da UBS quando da troca de cultivar, pode influir no enquadramento ou não da semente dentro dos padrões de pureza varietal.

Tanto as máquinas como os elevadores e transportadores possuem reentrâncias e espaços de difícil acesso, nos quais muitas sementes podem ficar

alojadas ao término do beneficiamento. A remoção destas sementes permite evitar a perda de qualidade por mistura varietal.

## UMIDADE DA SEMENTE

A maioria das sementes conservam-se com elevada germinação quando mantidas com baixo teor de umidade. Algumas poucas, como quiabo, alface, pepino e algumas leguminosas, entram em estado de dormência quando secadas a teores muito baixos de umidade (abaixo de 3 por cento).

A umidade da semente é função da umidade relativa do ar e da temperatura. Sendo higroscópicas, as sementes absorvem ou perdem umidade ao ar ambiente, até com o mesmo entrarem em equilíbrio. Esse processo não é imediato, mas leva algum tempo.

De modo geral, o ponto de equilíbrio das sementes oleaginosas é mais baixo que o das albuminosas, quando nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa. Isto porque os componentes oleaginosos da semente não são higroscópicos. Em conseqüência disto, a água somente é absorvida pelos componentes não oleaginosos.

A primeira conseqüência do elevado teor de umidade da semente é o aumento da sua velocidade respiratória.

A respiração, além de liberar calor, causando o aquecimento da semente, e utilizar parte das reservas nutritivas, libera sub-produtos orgânicos e água, que favorecem o desenvolvimento de fungos e bactérias.

A longevidade da semente é prolongada ao máximo, quando a semente é armazenada em ambiente cuja umidade relativa do ar situa-se entre 20-25 por cento. Todavia, por motivo de ordem econômica, armazenamento de grandes volumes sob condições controladas, utilizam umidade relativa do ar de 50 por cento.

## TEMPERATURA

O segundo fator ambiental mais importante na longevidade da semente é a temperatura. Harrington, 1973, sugere uma regra prática como guia para determinar os efeitos do teor de umidade e da temperatura sobre a velocidade de deterioração da semente. Esta regra é a seguinte:

a. Para cada 1 por cento de aumento no teor de umidade da semente, a longevidade da semente é reduzida pela metade. Esta regra é válida para teores de umidade entre 5 a 14 por cento. Abaixo de 5 por cento a velocidade da deterioração pode aumentar devido a auto-oxidação dos lipídios. Acima de 14 por cento o desenvolvimento de funços destroem o poder germinativo da semente; e

b. Para cada 5°C de aumento na temperatura, a longevidade da semente é reduzida pela metade. Esta regra aplica-se entre as temperaturas de 0 e 50°C.

Todas as atividades biológicas, dentro de determinados limites, são influenciadas pela temperatura. Assim, a velocidade respiratória da semente e dos fungos aumenta com o aumento da temperatura. Também a atividade dos insetos é favorecida por um aumento de temperatura.

Baixo teor de umidade e baixa temperatura são os meios mais eficientes de manter a qualidade fisiológica da semente durante o armazenamento.

Delouche **et al.** 1973, recomendam as seguintes condições ambientais para armazenamento de sementes em regiões tropicais e sub-tropicais:

Para armazenamento a curto prazo (até 9 meses):

a. 30°C - 50% UR, sementes com teor de umidade máximo de 12 por cento para cereais e 8 por cento para oleaginosas;

b. 20°C - 60% UR, sementes com teor de umidade máxima de 12 por cento para cereais e 9,5 por cento para oleaginosas; e

c. Outras combinações de temperatura e umidade relativa tão favoráveis como as acima prescritas.

As condições acima recomendadas são mínimas. Sempre que possível, condições mais favoráveis que estas, deverão ser utilizadas.

Para armazenamento a médio prazo para estoques reguladores (18 meses):

a. 30°C - 40% UR, sementes com umidade máxima de 10 por cento para cereais e 7,5 por cento para oleaginosas;

b. 20°C - 50% UR, sementes com umidade máxima de 12 por cento para cereais e 8 por cento para oleaginosas;

c. 10°C - 60% UR, sementes com umidade máxima de 12 por cento para cereais e 9 por cento para oleaginosas; e

d. Outras combinações de temperatura e umidade relativa tão favoráveis como as acima prescritas.

Para armazenamento a longo prazo:

a. Para períodos de 3 a 5 anos, condições de 10°C - 45% UR são satisfatórias para a maioria das sementes de grandes culturas; e

b. Para períodos entre 5 a 15 anos, condições de 0 a 5°C e 30-40% UR são recomendadas.

## LITERATURA CITADA

DELOUCHE, J.C.; MATTHES, R.K.; DOUGHERT, G.M. and BOYD, A.H. 1973. Storage of Seed in Subtropical and Tropical Regions. Seed Science and Technology 1; 671-700.

HARRINGTON, J.C. 1973. Seed-Storage and Longevity. In "Seed Biology" Vol. 3. T.T. Kozlowski, Editor. Academic Press.

POPINIGIS, F. 1985. Controle de Qualidade. Modulo 3. Curso de Especialização por Tutoria à Distância para Engenheiros Agrônomos. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior -ABEAS. Brasília, DF.

# Controle de qualidade fisiológica de sementes - germinação. Dormência e vigor

por Ricardo Carmona *

## INTRODUÇÃO

A qualidade fisiológica de um lote de sementes pode ser definida como o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade (Popinigis, 1977).

Nas fases finais do processo de maturação de sementes, ocorre a paralização do crescimento embrionário, caracterizando um estado de **latência**. Esta paralização pode durar desde algumas horas a até vários anos. As sementes que resistem à dessecação (ortodoxas) são aquelas que resistem maior tempo neste estado.

A latência de sementes é um mecanismo de adaptação das espécies para aumentar as chances de sobrevivência e favorecer a disseminação. A semente latente é normalmente mais resistente do que a planta em relação às adversidades do ambiente em termos de temperaturas extremas e disponibilidade de água.

A latência pode ser causada por alguma restrição ambiental, como por exemplo suprimento inadequado de água, temperatura desfavorável à germinação. Se as sementes encontram-se numa destas situações e apresentam condições intrínsecas normais a germinação, elas são ditas "quiescentes". Assim, as sementes quiescentes quando colocadas em ambiente favorável a germinação, germinam normalmente.

Por outro lado, a latência também pode ser causada por alguma restrição inerente à própria semente. Várias são as causas que podem levar a esta condição e neste caso as sementes são ditas **"dormentes"**. Portanto, dormência seria aquele estado em que a semente viável deixa de germinar mesmo quando são dadas todas as condições ambientais favoráveis.

A maioria das espécies domesticadas e cultivadas pelo homem apresentam pouca ou nenhuma dormência. Durante o processo de domesticação o homem foi selecionando, muitas vezes inconscientemente, aquelas sementes que germinassem prontamente logo após a semeadura. Já nas espécies silvestres este mecanismo é muito comum, pois representa para a espécie uma grande adaptação ecológica para aumentar as chances de sobrevivência.

A dormência pode causar problemas à agricultura por dessincronizar o desenvolvimento das plantas, dificultar testes de qualidade e garantir infestações de plantas indesejáveis à lavoura. As plantas daninhas, principalmente as de ciclo curto, tem na dormência seu principal mecanismo de sobrevivência em ambientes constantemente perturbados.

O encerramento do período de latência, seja por quiescência dormência ou ambos, estabelece o início do processo de germinação.

## GERMINAÇÃO

O conceito de germinação e variável, dependendo por quem é vislumbrado. Assim, o agricultor considera como germinada a semente que emitiu as estruturas do embrião acima do nível do solo. Já o tecnologista de sementes considera como germinada aquela semente

* *Engenheiro Agrônomo, MSc, PhD, Professor Adjunto, Dep. Eng. Agronômica, Universidade de Brasília, Brasília-DF.*

que emitiu uma plântula com todas as estruturas essenciais para a espécie e em satisfatório estado de desenvolvimento e sanidade. Para o fisiologista a emissão das estruturas da plântula é uma conseqüência da germinação, ou seja, uma fase posterior à mesma. Este considera como germinação o conjunto de todos os eventos que ocorrem internamente na semente desde a sua embebição, terminando com a emissão da radícula ou parte aérea da plântula. Qualquer que seja o ponto de vista, a função da germinação é transformar um embrião desidratado com um metabolismo baixíssimo (em sementes ortodoxas) num com vigoroso metabolismo e pleno desenvolvimento.

**Fatores que afetam a germinação**

Para que uma semente germine ela deve dispor de condições internas e externas favoráveis. As condições internas referem-se à viabilidade e dormência. A taxa de perda de viabilidade (longevidade) é variável conforme a espécie, cultivar, vigor da planta progenitora, condições climáticas predominantes durante a maturação da semente, grau de maturação na colheita, grau de injúria mecânica, condições ambientais de armazenagem, condições de secagem. Além disto a semente deve estar livre de dormência.

Os fatores externos que afetam diretamente a germinação de sementes são a água, temperatura e oxigênio. Há vários relatos também sobre o efeito da luz na germinação, entretanto o mais provável é que este efeito seja indireto, ou seja a luz afetaria o estado de dormência de sementes tornando as sementes aptas ou não a germinar.

A água é sem dúvida o fator que exerce maior influência na germinação, ativando o metabolismo e provocando o rompimento da casca (tegumento). A absorção de água ocorre rapidamente durante a fase inicial do processo de germinação. A força desenvolvida pelas sementes para retirar água do solo (pressão de embebição) varia com a espécie e umidade das sementes, mas em geral é muito alta. Pode chegar a um máximo de: 6,5 atm em soja, 12,3 atm em milho e 15 atm em nabo (Carvalho & Nakagawa, 1988). Outros fatores que influenciam a absorção de água pela semente são: disponibilidade de água no solo, área de contato e temperatura. Passada esta fase inicial de intensa absorção de água, o conteúdo de água permanece mais ou menos constante por um período durante os processos metabólicos, voltando a aumentar a absorção durante o crescimento e desenvolvimento do eixo embrionário.

A temperatura exerce uma influência muito grande não só no desencadeamento da germinação, mas também na velocidade da mesma. Vários processos, são afetados pela temperatura, tais como a velocidade de absorção de água, as reações bioquímicas, a síntese, reativação e atividade enzimática, a atividade de organelas. Em temperaturas adequadas a conjunção desses fatores desencadeia a germinação. As temperaturas máxima e mínima limites nas quais o processo de germinação ocorre são referidas como cardeias. Dentro desta faixa, a velocidade de germinação varia de acordo com a temperatura. A temperatura ótima é aquela em que a velocidade é máxima. Isto normalmente ocorre mais próximo à temperatura cardeal máxima do que da mínima (exemplo: soja ao redor de 8°C, 32° e 40°C - mínima, ótima e máxima).

As temperaturas cardeais para uma dada espécie e cultivar podem variar em função do grau de dormência e vigor de sementes. À medida que o vigor decai há uma diminuição da amplitude entre as temperaturas máxima e mínima possíveis para a germinação das sementes. Assim, as sementes mais vigorosas conseguem germinar numa maior gama de temperaturas do que sementes pouco vigorosas. Processo semelhante ocorre com certos tipos de dormência fisiológica do embrião em que a diminuição de dormência implica na ampliação da gama de temperaturas em que ocorre a germinação.

O oxigênio é o principal combustível para "queima" de substâncias de reserva e produção de energia nas células. O consumo de oxigênio pelas sementes durante a germinação é semelhante à absorção de água. Inicialmente ocorre um grande incremento com a ativação do metabolismo, depois permanece mais ou menos constante, vindo a aumentar novamente com o

crescimento do embrião. A maioria das espécies não exige concentração superior a 10 por cento de oxigênio na atmosfera para germinar. Por exemplo, sementes de penino, alface e arroz podem germinar sob concentrações inferiores a 2,5 por cento, já sementes de tomate necessitam de uma concentração ao redor de 10 por cento (Carvalho & Nakagawa, 1988).

## DORMÊNCIA

Como mencionado anteriormente, a dormência pode ser conceituada como a falta de germinação de uma semente viável quando colocada em ambiente propício à germinação. Como função biológica é de extrema importância à maior adaptabilidade das espécies, pois distribui a germinação ao longo do tempo, permitindo maior conquista de espaço pelos indivíduos. A dormência faz com que a espécie consiga sobreviver em ambientes que apresentem condições bastante adversas em determinados períodos, como temperaturas extremas ou déficit hídrico. Normalmente são estas condições adversas as responsáveis pela superação de dormência, fazendo com que as sementes estejam aptas a germinar quando as condições ambientais forem favoráveis. Neste caso a dormência é tida como um "sensor remoto" de sorte que a semente germinaria não só quando as condições ambientais fossem favoráveis à germinação, mas também ao crescimento da planta.

### Tipos de dormência

A dormência pode ser primária ou nata quando se instala nas sementes durante a fase de maturação. É um fenômeno geneticamente programado, apesar de também sofrer influência ambiental. A dormência secundária ou induzida desenvolve-se na semente após o desprendimento da plant-mãe. Este tipo de dormência está intimamente relacionada às condições ambientais as quais são expostas as sementes. Observam-se ciclos de indução/liberação de dormência secundária em sementes de algumas espécies no solo (Carmona, 1992). Estes ciclos são mais pronunciados em regiões que apresentam estações bem definidas e pronunciadas. Além dos ciclos dentro de um mesmo ano, pode ocorrer aumento ou declínio de dormência ao longo de períodos mais prolongados, os quais são também ditados pelo ambiente.

A dormência de sementes não deve ser vista como um fenômeno de resposta quântica, ou seja, com apenas duas possibilidades: sim ou não. De acordo com Baskin & Baskin (1985) durante os processos de superação e indução de dormência fisiológica de embrião há um contínuo de transformações fisiológicas que fazem com que as sementes germinem numa gama cada vez mais ampla ou restrita de condições ambientais, respectivamente.

### Mecanismos de dormência

A restrição a germinação pode situar-se nos tecidos que envolvem o embrião, no próprio embrião ou em ambos. A impermeabilidade ou baixa permeabilidade do tegumento à água é um dos principais mecanismos de dormência em várias espécies das famílias Fabaceae (Leguminosae). Cannaceae, Chenopodiaceae, Convallariaceae, Convolvulaceae, Geraniaceae, Malvaceae, Solanaceae, Anacardiaceae e Rhamnaceae. Isto se deve á estrutura do tegumento bem como à presença de substâncias que conferem impermeabilidade, como: suberina, cutina, tanino, pectina e derivados de quinona. Vários tratamentos podem ser recomendados para superação deste tipo de dormência para fins de semeadura (escarificação). Os mais usuais são: abrasão do tegumento contra superfícies rugosas, como lixas, pedras, cimento, utilização de ácido sulfúrico, alta temperatura e corte.

Além da impermeabilidade à água, as estruturas envolventes do embrião podem interferir nas trocas gasosas do embrião. A entrada de oxigênio e saída de dióxido de carbono podem ficar prejudicadas, inibindo a respiração. Como exemplos podem-se citar sementes de *Sinapis arvensis* que possuem mucilagem envolvendo as sementes e *Xanthium pennsylvanicum*. No caso da beterraba, partes do fruto que envolvem as sementes, assim como a casca de arroz, são estruturas consumidoras de oxigênio, podendo competir com a embrião. A secagem diminui o consumo de oxigênio por estas estruturas. Várias gramíneas forrageiras

podem apresentar impermeabilidade a gases, como: *Brachiaria* spp. *Panicum maximum* etc. A superação deste tipo de dormência pode ser dar através da pré-secagem, remoção de estruturas e escarificação (conforme descrito acima).

As estruturas envolventes do embrião podem ainda prevenir a saída de inibidores (ex: *Xanthium*) ou possuir inibidores de germinação como os ácidos fenólicos no pericarpo da beterraba, ácido abcísico em *Avena fatua*, taninos no pericarpo e testa em trigo e *Rosa canina*.

Outro mecanismo de dormência imposto pelos tecidos recobrindo o embrião é a resistência mecânica à germinação. Isto pode ser observado em vários tipos de nozes que apresentam o tegumento bastante rígido e em sementes de alface onde o endosperma é o tecido que oferece resistência.

A dormência situada no próprio embrião é muito mais complexa e de difícil elucidação, sendo várias as causas e mecanismos. Em algumas espécies, como *Ilex opaca* o embrião encontra-se apenas parcialmente desenvolvido no ponto de maturidade. Ocorre nas famílias Palmae, Araliaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae. A colocação das sementes em substrato úmido sob temperatura adequada por período variável conforme a espécie (10 dias para *Caltha palustris* e alguns meses em *Fraxinus excelsior*) leva ao desenvolvimento do embrião e posterior germinação.

Outra causa refere-se à inadequância embriônica no que tange ao metabolismo para a germinação. Assim, falhas ou bloqueios no metabolismo, como a impossibilidade de produção de certas enzimas pode levar a um estado de dormência. Observa-se que alguns radicais nitrato ou nitrito podem superar a dormência de sementes de várias espécies, em especial em sementes de gramíneas. Roberts (1973) propos que a perda de dormência neste caso seria devido a algumas reações de oxidação, mas não as de respiração convencional. Isto evidenciou-se quando o autor verificou que a maioria dos inibidores da respiração (que inibem a citocromo oxidase) tem um efeito estimulador sobre a germinação. As formas oxidadas de nitrogênio agem no estímulo por serem receptoras de elétrons. Por outro lado, as formas reduzidas (amônia, uréia, aminoácidos etc.) não afetam a dormência. A disponibilidade de nitratos, luz e alternância de temperaturas aumentam com a proximidade do nível do solo, intensificando a germinação de sementes próximas à superfície, o que consiste em adaptação ecológica pois as plântulas tem mais condições de estabelecer-se e originar plantas normais.

O mais complexo dos sistemas de dormência de embrião é o equilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras de crescimento. As giberelinas são os principais estimuladores de germinação, enquanto as cumarinas e ácido abcísico são os principais inibidores (Amen, 1968). Khan (1971) incluiu nesta lista as citocininas cuja função seria a de anular os efeitos dos inibidores. O etileno em concentrações de 10 a 100 ppm tem-se mostrado como um importante agente na superação de dormência em várias espécies. Este hormônio pode ser produzido por vegetais e microrganismos no solo, podendo estimular a germinação de sementes circunvizinhas. Algumas tentativas de aplicação de etileno exógeno no solo foram feitas com sucesso no estímulo de germinação de *Striga* spp nos Estados Unidos, visando a redução de bancos de sementes desta planta daninha. Assim, o balanço de concentrações ativas destas substâncias desencadearia ou não o processo germinativo.

Em algumas espécies como maçã, pêssego e algumas árvores de clima temperado, a dormência pode ser superada por baixas temperaturas e alta umidade. Estudos tem mostrado que a ação dos dois fatores estaria relacionada ao equilíbrio entre hormônios. Vários trabalhos conseguiram evidenciar que o próprio papel do fitocromo, ao ser estimulado pela luz, seria o de modificar o equilíbrio hormonal, de maneira que os estimuladores de crescimento passassem a predominar sobre os inibidores, é importante frisar que o que conta não é presença, mas sim os níveis em que ele é fisiologicamente ativo.

A água apresenta um importante papel na dormência de sementes de várias espécies. Algumas espécies como arroz e sorgo tem a germinação estimulada

quando as sementes dormentes são présecadas numa temperatura ao redor de 45-50°C. Entretanto, o efeito da baixa umidade pode ser confundido com o de altas temperaturas que por si só levam a uma superação de dormência, como ocorre em amendoim.

O excesso de água ao redor das sementes pode provocar a lixiviação de substâncias inibidoras da germinação. Este pode ser um mecanismo de adaptação ecológica a regiões desérticas em que a germinação só ocorreria na época propícia em seguida a fortes chuvas. Este mecanismo pode ser encontrado em espécies não desérticas, como por exemplo beterraba.

## VIGOR

As primeiras observações sobre vigor de sementes de que se tem relato foram feitas por Nobbe em 1876. Este autor notou que entre diferentes sementes germinadas havia distintas "forças de germinação" no que se refere à velocidade do processo e tamanho final das plântulas. Portanto, a simples classificação das sementes em germinadas ou não, não levava em consideração estas diferenças que podiam significar variações em termos de qualidade. A partir daí, outros autores também fizeram menção a este respeito, entretanto os conceitos de vigor ou vitalidade de sementes são foram desenvolvidos mais tarde.

A idéia de vigor ou energia germinativa de sementes parece ter avançado após a 2a. guerra mundial. No congresso da ISTA de 1950 intensificou-se o interesse pelos testes de vigor, sendo o desenvolvimento do teste de frio para milho no mesmo ano a maior contribuição neste sentido.

Há atualmente várias definições para vigor. Aquela adotada pela AOSA - "Association of Oficial Seed Analysts" (1980) é a seguinte: "vigor de sementes compreende todas propriedades que determinam o potencial para emergência rápida e uniforme, desenvolvimento de plântulas normais sob uma variada gama de condições de campo".

O vigor manifesta-se na rapidez de germinação, emergência, crescimento de plântula, uniformidade de resposta, sensibilidade a estresses ambientais durante germinação e emergência, integridade de membranas, atividade metabólica e longevidade. Variações no nível de vigor são causadas por: constituição genética; ambiente e nutrição da planta-mãe; estágio de maturação na colheita; tamanho da semente: peso ou peso específico; integridade mecânica; deterioração e envelhecimento; patógenos.

### Testes de vigor

Os testes de vigor podem ser classificados em diretos e indiretos. Os indiretos tentam reproduzir o estresse ao qual a semente está sujeita no campo. Os indiretos avaliam outras características da semente que podem ser correlacionadas com algum aspecto da performance no campo, como a taxa de respiração, teste de tetrazólio, condutividade elétrica etc. Alguns testes mais comuns de vigor são descritos a seguir:

#### *Classificação do vigor no teste de germinação*

Além da classificação rotineira ao final do teste de germinação, as plântulas normais são classificadas em "fortes" e "fracas". Plântulas "fracas" são aquelas que apresentam desenvolvimento muito reduzido, lesões, quebras, necroses, pequenas torções, fendas ou outras deficiências, mas que não são tão severas a ponto de que as plântulas sejam consideradas anormais. Este teste tem sido sugerido para milho, mas não para soja.

#### *Crescimento de plântulas*

Também pode aproveitar as plântulas normais do teste de germinação. Consiste na determinação do peso seco ou crescimento linear do eixo embrionário. Este teste tem apresentado boa correlação com comportamento no campo em soja (peso seco excluindo-se os cotilédones) e milho.

#### *Envelhecimento acelerado*

As sementes são estressadas sob temperaturas de 40-45°C e umidade relativa de 90 a 100 por cento por períodos variados conforme a espécie (ex: soja de 48 a 72 horas) em seguida procede-se ao teste de

germinação. Sementes mais vigorosas toleram melhor a este estresse.

### *Teste de frio*

As sementes são estressadas em condições que simulam situações adversas de início de primavera como alta umidade do solo e baixa temperatura. As sementes são cobertas com solo úmido e incubadas a 10°C por um período específico. Ao final do período as sementes são germinadas em temperatura normal. A porcentagem de emergência é considerada como uma indicação de vigor. É o teste mais velho e mais usado para milho nos Estados Unidos. Deve-se usar de preferência solo da áreas produtoras de milho com possibilidade de contaminação patogênica.

### *Teste de germinação a frio*

Foi desenvolvido para sementes de algodão, mas também tem sido usado para outras espécies como sorgo e pepinos. Para algodão tem-se utilizado germinar as sementes a 19°C/7 dias. Estas condições podem induzir injúria de radículas, baixa taxa de elongação de hipocótilo e aumento na suceptibilidade a fungos de solo como *Pythium*. Plântulas com 4 cm de comprimento após os 7 dias são consideradas de alto vigor.

### *Teste de tetrazólio*

É um teste que colore de vermelho células vivas em processo respiratório. Através do exame das áreas afetadas e da extensão dos danos, as sementes podem ser classificadas em classes de vigor. É um teste preconizado para soja, sendo possível detectar-se as possíveis causas de queda de vigor, como danos mecânicos, por insetos, oscilações de umidade etc.

### *Condutividade*

Mede a quantidade de eletrólitos perdida pelas sementes em água. A condutividade pode ser medida diretamente por aparelhos específicos ou indiretamente através do pH. Uma maior condutividade da água de embebição deve indicar um lote de baixo vigor, com maior desorganização de membranas. Este teste tem mostrado boa correlação com vigor em ervilha, arroz, milho, feijão, soja, cevada, trevos. Entretanto, sementes muito secas podem originar injúria por embebição, afetando os resultados.

Outros testes de vigor não tão utilizados como os anteriores são:

### *Velocidade de germinação*

Vários métodos tem sido utilizados para determinar a taxa de germinação, como o número de dias para atingir determinada porcentagem de germinação, primeira contagem do teste de germinação, número médio de dias para germinação total etc.

### *Tijolo moído (ou teste de Hiltner)*

Desenvolvido em 1911 para detectar *Fusarium* transmitido por sementes em cereais. As sementes são semeadas em potes em tijolo, moído ou areia e cobertas com camada de 3 cm de tijolo moído e germinadas no escuro a temperatura ambiente. Sementes infectadas por fungos patogênicos, injúrias ou baixo vigor são incapazes de penetrar as camadas de tijolo. Este teste não tem sido muito usado nos Estados Unidos, pois tem falhado em prover informações adicionais sobre o vigor em relação ao teste de germinação.

### *Estresse osmótico*

Esta condição é imposta à semente através da germinação em soluções de alto potencial osmótico. Solutos de alto peso molecular, como o polietileno glicol são adequados, pois não penetram as células nem causam toxicidade. Já soluções como sacarose, cloreto de sódio, glicerol e manitol podem causar toxicidade. Sementes mais vigorosas são mais tolerantes ao estresse hídrico.

### *Respiração*

As sementes mais vigorosas apresentam maior taxa de respiração após embebidas. A medição do

consumo de oxigênio ou produção de gás carbônico pode, portanto, servir como teste de vigor. Estes testes requerem pessoal especializado e equipamento específico e além disto injúrias mecânicas podem aumentar as taxas respiratórias, confundindo o teste.

### *Atividade da descarboxilase do ácido glutâmico*

Altas correlações foram observadas entre a concentração desta enzima e a viabilidade em arroz e armazenabilidade e vigor em sementes de milho. A atividade desta enzima é normalmente medida pela quantidade de dióxido de carbono produzida na presença de ácido glutâmico. Este teste é recomendável para milho, mas não para soja.

### *Conteúdo de ATP*

A energia para as reações bioquímicas em células vivas provem de compostos de alta energia, em especial o ATP. O conteúdo de ATP fornece portanto uma indicação da quantidade de energia disponível que está diretamente correlacionada com o vigor de sementes. Resultados tem mostrado a adequabilidade do teste em espécies como colza, trevo e alface.

## MONITORAMENTO DE VIABILIDADE EM BANCOS DE GERMOPLASMA

A viabilidade de sementes deve ser estimada na recepção do germoplasma e depois re-assessada a intervalos de tempo variáveis conforme a espécie durante o armazenamento. Estes testes provem uma grande quantidade de trabalho durante o armazenamento, devido à grande quantidade de amostras normalmente armazenadas. Durante o armazenamento, sementes individuais de um lote não morrem simultaneamente. Algumas morrem primeiro, o que serve de aviso de que as demais sementes viáveis devem ser regeneradas. Portanto, em algum tempo de armazenamento será necessário remover um acesso, semear uma amostra de sementes e colher sementes novas.

Inicialmente foi proposto pelo IBPGR que os acessos devessem ser regenerados toda vez que o teste de monitoração de qualidade (germinação ou tetrazólio) desse uma diferença de pelo menos 5 por cento em relação à viabilidade inicial. O tamanho da amostra proposta era de 400 sementes. Considerando-se que os acessos não devem conter menos de 4.000 sementes, mas idealmente 12.000 são requeridas. Ellis **et al.** (1980) propuseram um esquema de análise seqüencial de sementes em bancos de germoplasma para testar-se a viabilidade, com menor gasto de sementes. A essência do método é de que o número de sementes a serem testadas não é prédeterminado. A decisão de terminar o teste depende da última observação da seqüência.

Os autores recomendam que pequenas porções de sementes, por exemplo 40, sejam usadas em seqüência no processo de decisão de regeneração de acordo com o proposto no Quadro 1.

Quadro 1. Plano para teste de germinação seqüencial, onde as sementes são testadas em grupos de 40 (extraído de Ellis **et al.**, 1990).

| Sementes testadas (acumulado) | Regenerar se o Nº de sem. por ≤ do que | Continuar teste seq. se o Nº de sem germ por entre | Manter em armaz. se o Nº de sem. germinadas por ≥ do que |
|---|---|---|---|
| 40 | 29 | 30-40 | - |
| 80 | 64 | 65-75 | 76 |
| 120 | 100 | 101-110 | 111 |
| 160 | 135 | 136-145 | 146 |
| 200 | 170 | 171-180 | 181 |
| 240 | 205 | 206-215 | 216 |
| 280 | 240 | 241-250 | 251 |
| 320 | 275 | 276-285 | 286 |
| 360 | 310 | 311-320 | 321 |
| 400 | 345 | 346-355 | 356 |
| 440 | 380 | 381-390 | 391 |
| 480 | 415 | 416-425 | 426 |
| 520 | 450 | 451-460 | 461 |
| 560 | 485 | 486-495 | 496 |
| 600 | 520 | 521-531 | 532 |

Algumas recomendações fornecidas pelo IBPGR para o monitoramento de viabilidade de sementes são:

1. Os contêineres removidos de armazenamento a baixa temperatura não devem ser abertos até que a temperatura das sementes tenha subido acima da temperatura de orvalho da atmosfera ambiente (de laboratório).
2. Sementes removidas para um teste de viabilidade (normalmente germinação, mas algumas vezes teste de tetrazólio) devem ser amostradas aleatoriamente, 1.e. usando procedimentos apropriados de todo o acesso.
3. O número de sementes amostradas (e subseqüentemente testadas) deve ser suficiente para minimizar a probabilidade de erros na decisão subseqüente de regeneração do acesso. Dois tipos de erro são possíveis na decisão. Se a viabilidade é subestimada então o acesso pode ser regenerado sem necessidade. Se a viabilidade é superestimada, então uma necessária regeneração pode ser adiada. Testes seqüenciais de sementes tem sido recomendados para evitar que grandes números de sementes sejam sempre requeridos por um teste com número fixo de sementes se os erros são minimizados.
4. Sementes secas devem ser umidificadas numa atmosfera úmida por um curto período antes da embebição (tanto para germinação como para o teste de tetrazólio) para evitar injúrias por embebição muito rápida.
5. No caso do teste de germinação, as sementes devem ser testadas em condições que permitam a germinação de todas as sementes viáveis. O ambiente não pode causar estresse a sementes de baixa qualidade e também deve ser capaz de promover a germinação de sementes dormentes.

## LITERATURA CONSULTA E CITADA


AOSA. 1983. Seed vigour testing handbook. The Seed Vigour Test Committee of the Association of Official Seed Analysts. 88p.

BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1986. Seeds. Physiology of Development and Germination. New York and London, Plenum Press. 367p.

BRASIL. 1991. Regras para análise de sementes. Brasília, Minstério da Agricultura, 155p.

CARVALHO, N. M. & NAKAGAWA, J. 1980. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. Campinas, Fundação Cargill. 326p.

CHIN, H. F. & ROBERTS, E. H. 1980. Recalcitrant crop seeds. Malaysia, Tropical Press. 152p.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. & WHITEHEAD, J.. A new more economic and accurate approach to monitoring the viability of accessions during storage in seed banks. Plant, Genet., Resour. Newslett., 41, 3-8.

--------; HONG, T. D. & ROBERTS, E. H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Volumes I and II. International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 667p.

FEALQ. 1986. I Semana de Atualização em Produção de Sementes. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, Fundação Cargill, 7 a 11 de julho de 1986. 223p.

FENNER. M. 1992. Seed - The Ecology of Regeneration in Plant Communities. Wallingford. CAB International. 372p.

HEYDECKER, W. (ed.). 1973. Seed Ecology. Univ. Park., USA, Pennsylvania. State University Press. 578p.

KOZLOWSKY, T. T. (ed.). 1992. Seed Biology. New York. Academic Press.

LECK, M. A.: PARKER, V. T. & SIMPSON, R. L. 1989. Ecology of Soil Seed Banks. San Diego, Academic Press Inc., 462p.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M. & TOLEDO, F. F. Manual de análise de sementes. Universidade de São Paulo, Piracicaba 1983. 112p.

MAYER, A. M. & POLIAKOFF-MAYBER. 1966. The germination of seeds. New York. Pergamon Press. 236p.

POPINIGIS, F. 1977. Fisiologia da semente. Brasília, Ministério da Agricultura, AGIPLAN. 298p.

PRIESTLEY, D. A. 1986. Seed Aging. Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil. Ithaca and London, Commstock Publishing Associates. 245p.

TAYLORSON. R. B. 1989. Recent advances in the development and germination of seeds. New york and. London, Plenum Press. 285 p.

THOMPSON, J.R. 1979. An introduction to seed technology. London, Leonard Hill. 252p.

VIEIRA, R. D. & Carvalho, N. M. 1994. Testes de vigor em sementes. FUNEP, UNESP, Jaboticabal. 164p.

# Controle de qualidade sanitária do germoplasma-semente

por Marta Gomes Rodrigues Faiad *

## INTRODUÇÃO

A conservação de coleções de sementes em Bancos de Germoplasma é de extrema necessidade para salvaguardar populações que estão em perigo de destruição física; proteger populações em perigo de deterioração genética; assegurar a disponibilidade de material para melhoramento genético permitindo o desenvolvimento comercial de uma espécie a partir de genótipos de interesse econômico (FAO, 1989).

O Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia conserva a longo prazo, germoplasma-semente de espécies agrícolas, ortodoxas, adotando metodologia recomendada pelo International Board of Plant Genetic Resources-IBPGR, (1976).

Para o armazenamento à temperatura sub-zero necessita-se obter sementes com alta capacidade de germinação e vigor, possuir integridade genética e não ser infectada. Entretanto, muitos patógenos (bactérias, fungos e vírus e nematóides) que causam doenças em plantas são transmitidas por sementes, tornando-as responsável pela introdução de muitas doenças em diferentes países (Baker, 1972 e Neegaard, 1979).

Os fitopatógenos podem acompanhar as sementes externamente ou internamente através dos escleróclos, estruturas de frutificação, estruturas vegetativas, larvas de nematóides ou partículas virais podendo assim ser transmitido da semente para a plântula, da plântula para a semente e da semente para semente. E, dependendo do hospedeiro a taxa de transmissão de patógeno de semente para planta pode variar de 1 a 100 por cento. A transmissão de patógenos por semente é um eficiente método de transportar patógenos através do tempo e do espaço.

Leppick (1970) analisando sementes importadas de 4.489 acessos verificou que 2.0 por cento estavam infectadas com importantes patógenos exóticos, demonstrando assim que os bancos de germoplasma de plantas cultivadas podem servir como centro de diversidade para os seus patógenos.

Existe evidências de que *Phomopsis phaseoli* f. sp. *Meridionalis* da soja *Peronosclerospora sorghi*, *Drechslera maydis* do milho e *Plasmopora halstedii* em girassol tenham sido introduzido no Brasil através de ensaios internacionais, importações para desenvolvimento de novas cultivares e multiplicações de sementes em programas de outros países (Menten, 1990).

## SOBREVIVÊNCIA FÚNGICA

Os fungos fitopatogênicos podem permanecer viáveis, por longos períodos, em diferentes condições de armazenamento, devido à produção de estruturas de resistência ou a presença de hifas no interior das sementes.

Neegard (1977) relatou que a composição fúngica das sementes armazenadas é altamente dependente do seu conteúdo de umidade e da temperatura de armazenamento. E, uma variação tanto qualitativa como quantitativa fúngica pode ocorrer agindo sempre

* *Pesquisadora EMBRAPA/CENARGEN.*

no sentido de acelerar a taxa de deterioração das sementes.

Segundo Neegard (1973) alguns patógenos tem uma vida mais curta que a semente, outros tem a longevidade igual e outros podem sobreviver por muitos anos dependendo das condições de umidade da semente, da temperatura de armazenamento e da localização do patógeno. Arndt (1953), Siddiqui et al (1993) e Warren (1977) afirmam que os patógenos se sementes podem permanecer viáveis por vários anos em condições normais de armazenamento.

As condições que favorecem a longevidade das sementes também favorecem a dos patógenos. Foi demonstrado que fungos fitopatogênicos sobrevivem por até 14 anos em sementes armazenadas a -18°C (Hewett, 1987 e Faiad et al. 1988). De acordo com Mc Gee (1993) a coleção de germoplasma-semente pode servir como a principal fonte de inóculo de patógenos para as plantas.

## MONITORAÇÃO DO GERMOPLASMA-SEMENTE QUANTO À SANIDADE

Área de Conservação de Recursos Genéticos (ACR) visando avaliar a qualidade sanitária das sementes pertencentes de germoplasma do CENARGEN, realiza testes de sanidade para detecção fúngica. Os testes são realizados por amostragem devido a pouca quantidade de semente.

A avaliação inicial é feita por ocasião da entrada do acesso para o armazenamento. A amostra é enviada ao Laboratório de Patologia e a monitoração é feita através de testes de sanidade (papel de filtro e ágar).

Os resultados obtidos são utilizadas para auxiliar a elucidação das causas de deterioração das sementes e a baixa porcentagem de germinação de alguns acessos, promovendo uma maior integração entre a tecnologia e a sanidade de sementes.

Dependendo da necessidade testes sanitários são realizados durante a monitoração da viabilidade da semente.

Quando se fizer necessário enviar o material aos respectivos BAGs para multiplicação ou regeneração, realizar-se-á o teste final de sanidade para informar ao usuário sobre a incidência dos patógenos presentes nas sementes para que seja adotado medidas de controle a fim de evitar a disseminação do patógeno.

As informações obtidas quanto ao produto, a espécie fúngica, número do acesso, metodologia e porcentagem de incidência fúngica são arquivadas no Banco de Dados. Tais dados servirão como fonte de informações para emissão de relatório, seleção de acessos infectados, análise, interpretação de resultados e conclusões sobre o comportamento fúngico no germoplasma armazenado.

## DETECÇÃO DE FUNGOS EM GERMOPLASMA-SEMENTE

Durante o período de 1982 à 1992, 6.885 acessos provenientes de diferentes localidades do país, enviados pelos Bancos Ativos de Germoplasma e Instituições de Pesquisa foram avaliados para verificar a qualidade do germoplasma-semente destinado à conservação a longo prazo.

Importantes patógenos foram detectados e muitos saprófitas estiveram presentes nos diferentes produtos, indicando a necessidade de se produzir germoplasma sadio.

Os fungos que ocorreram com maior freqüência foram os considerados de armazenamento, ou seja, *Aspergillus* e *Penicillium*. Observou-se que muitas sementes deterioradas o plântulas infeccionadas de amendoim, gergelim e soja apresentavam o fungo *Aspergillus*. Berjak (1987) relata que 5-30 por cento de sementes produzidas são perdidas anualmente devido aos fungos de armazenamento, principalmente nos países tropicais e sub-tropicais.

Esses fungos são capazes de proliferar em sementes com um teor de umidade de 12 a 13 por cento e quando são armazenadas num ambiente com UR superior a 60 por cento, provocam fermentações, alterações bioquímicas, modificações celulares e decréscimo na porcentagem de germinação (Cristensen e Kaufmann, 1965; Sinclair, 1982).

Cuidados especiais devem ser tomados para evitar a deterioração das sementes durante o processo de beneficiamento, porque a deterioração é um processo irreversível e progressivo que poderá comprometer sua qualidade fisiológica.

Sabe-se que a alta incidência desses fungos pode ser em decorrência da não observância de várias medidas de controle adequado para evitar o seu desenvolvimento, sobretudo antes do germoplasma ser enviado para a conservação a longo prazo.

Ocorreu também predominância de fungos de campo: *Alternaria* e *Cladosporium* Berjak (1988) relata que esses fungos sofrem uma redução de incidência durante o armazenamento das sementes. Entretanto, os mesmos têm sobrevivido por até 8 anos em sementes armazenadas secas e em baixas temperaturas. (Observações pessoais). Esses fungos apresentam atividade saprofítica acentuada, mas, também podem atuar como fitopatógenos.

De acordo com Sharma (1981) os fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* reduzem a quantidade de óleo e afetam a qualidade das sementes e podem causar a sua morte devido a liberação de enzimas e toxinas.

Os fungos considerados termotolerantes como *Mucor* e *Rhizopus* também foram observados. Nas condições de armazenamento a longo prazo esses fungos podem ser mantidos, e quando dadas condições ideais para o teste de germinação poderão causar podridão de plântulas e sementes.

A maior ocorrência fúngica foi observada em acessos de cereais, principalmente em arroz. Os fungos *Pyricularia oryzae*, *Drechslera oryzae* e *Gerlacha oryzae* estiveram associados freqüentemente as suas sementes. Anormalidades em plântulas de arroz nos substratos papel toalha e areia, decréscimo de germinação, vigor e podridão de sementes podem ser devido a infecção por esses fungos (Guerreiro, 1972; Sader, 1981; Pinto, 1989; Kim **et al.** 1984).

*Drechslera sorokiniana*, *Drechslera teres*, *Drechslera* sp e *Diplodia maydis* foram detectados na sementes de cevada, trigo e milho. Tais fungos podem causar apodrecimento das sementes e a morte das plântulas no estágio de pré ou pós-emergência (Lucca Filho, 1989).

Em acessos de leguminosas, a maior incidência fúngica ocorreu em sementes de soja. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* tem um padrão de tolerância igual a zero nos Programas de Certificação de Sementes (Notícia, 1992) e foi detectado nas amostras de soja e feijão a serem armazenadas. Esse fungo uma vez veiculado por sementes podem permanecer viáveis no solo por muitos anos, mesmo na ausência de hospedeiros, e, posteriormente pode afetar o crescimento das plantas, tornando-se responsável por prejuízos elevados em diversas regiões (Ferreira **et al.** 1981; Nasser **et al.** 1984).

*Phomopsis* sp. foi também detectado em sementes de soja. A sua presença pode tornar o teste padrão de germinação inviável, quando lotes de sementes têm alto índice de infecção, porque causam decréscimo de germinação em laboratório. (Henning & França Neto, 1984). Portanto, o controle de qualidade pode não alcançar o padrão mínimo necessário para o armazenamento de germoplasma a longo prazo.

O fungo *Colletotricum* foi detectado em sementes de feijão e de soja. Embora *C. lindemuthianum* dificilmente afete a germinação, sua ocorrência em sementes é preocupante porque sementes infectadas podem servir como fonte primária de inóculo para as plantas sadias causando perdas inestimáveis. Menten, (1990) relatou que em condições de cerrado, o plantio de lote com 4 por cento de sementes portadoras de *C. lindemuthianum* provocou uma redução de 50 por cento na produtividade. Sementes infectadas com *Colletotrichum dematium* pode causar a morte de pré ou pós-emergência ou produzir plântulas infectadas (Nicholson & Sinclair, 1973).

*Macrophomina phaseolina* e *Aspergillus niger* ocorreram nas culturas de amendoim e gergelim causando murcha em plântulas. Em seguida, houve colonização dos tecidos causando sua morte. Microesclerodios de *Macrophomina* e massas pretas de conídios puderam ser visualizados. Normalmente,

a realização do teste de germinação foi dificultado em conseqüência do grande número de plântulas infeccionadas e anormais. Relatos semelhantes foram descritos por Meyer et al., 1974, Moraes, 1988.

Espécies de *Fusarium* foram detectadas com alta freqüência na maioria dos produtos analisados. Algumas vezes, as sementes infectadas se deterioraram, as raízes das plântulas tornaram-se escurecidas e o hipocótilo encharcados. Testes de correlações feito por Lori & Saradon (1989) demonstraram que ocorre redução de germinação em laboratório quando as sementes de soja estão infectadas por *Fusarium* spp.

## RECOMENDAÇÕES

Baseando-se nos resultados obtidos através dos testes de sanidade as seguintes recomendações são sugeridas:

- Manejo adequado da cultura, colheita cuidadosa, transporte adequado, secagem correta das sementes, equipamentos de colheita e beneficiamento devidamente limpos, manejo preciso da umidade da semente e temperatura adequada de armazenamento para evitar a contaminação do germoplasma-semente de fungos de armazenamento.

- Inspeção sanitária para verificar a qualidade do germoplasma.

- Monitorações periódicas para verificar a sobrevivência fúngica.

- Prescrição de tratamento das sementes quando ocorrer patógenos de importância econômica para cultura e o material for enviado para multiplicação ou regeneração.

Esses procedimentos podem evitar a possível deterioração das sementes e aumentar o potencial de longevidade.

Além disso a produção e a distribuição de germoplasma livre de patógeno é necessário para evitar a introdução de patógenos, reduzir a fonte de inóculo incluindo novas raças de patógenos que poderão ser introduzida em áreas onde a doença ainda não ocorre e evitar a perda de material genético.

## CONCLUSÕES

- Testes de sanidade do germoplasma-semente são essenciais para salvaguardar o germoplasma conservado e garantir um germoplasma sadio.

- A viabilidade do germoplasma pode ficar comprometida uma vez que sua contaminação pode causar perdas irreparáveis.

## LITERATURA CITADA E CONSULTADA

AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B.. 1987. Principles of seed pathology. Boca Raton.: CRC Press. 2v.

BARNETT, H.L. & BARRY, B.H.. 1976. Illustrated genera of imperfect fungi. 2 ed., Burgess Publishing Company.

BERJAK, P. 1987. Stored seeds: The problems caused by microrganisms (With particular reference to the fungi). In: Nasser, L.C.; Wetzel, M.M. & Fernandes, J.M. Seed Pathology; International Advanced Course, Passo Fundo, ABRATES, pt. 1, p. 38-50.

CRISTENSEN, C.M.L. & KAUFMANN, H.H. 1965. Deterioration of stored grains by fungi. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 3:69-84.

DIAZ POLANCO, C.; MAUREZUTT, P.; SALAS DE DIAS. 1978. El hongo *Rhizoctonia solani*, patógeno del frijol *Vigna unguiculata* en Venezuela. Agronomia Tropical, Maracy, 28 (4), 409-18.

DIEHL, J.A. 1983. Reação de espécies de gramíneas à podridão comumm de raízes causada por *Cochliobolus sativus* Fitopatologia Brasileira. Brasília, 8 (1) 9-12.

FAIAD, M.G.R.; WETZEL, M.M.V. da S. & PIAULINO, L.E.V. 1985. Viabilidade de patógenos em sementes de arroz armazenadas. In: Congresso Brasileiro de Sementes, 6, Brasília, 1989. Resumo... Brasília, ABRATES, 1989, p. 118.

FAO. 1989. Recursos fitogenéticos: su conservación "in situ" para el uso Romano. Roma. 38p.

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S. & ALMEIDA, A.M.R. 1981. Moléstias e seu controle. In: Myasaka, A. & Medina, J.C. A soja no Brasil. s. 1., ITAL, p. 603-639.

GUERREIRO, F.C.; MATHUR, S.B. & NEERGAARD, P. 1972. Seed health testing of rice. V. Seed borne fungi associated with abnormal seedlings of rice. Proceeding International Seed. Testing Association, Copenhagen, 37(3); 985-997.

HENNING, A.A. & FRANÇA NETO, J.B. 1980. Problemas na avaliação de germinação de semente de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp.. Reo Bras. Sem., Brasília, 2 (5): 9-22.

IBPGR. 1976. Report of IBPGR Working group on engineering, design and cost aspect of long-term seed storage facilities. Rome, IBPGR.

KIM, W.G.; PARK, J.S. & YU, S.H. 1984. Seed infection and damage to rice seeds and seedlings by seed-borne *Gerlachia oryzae*. Korean Journal of Plant Protection, Suweon, 23 (2): 126-31.

LUCCA FILHO, Q.A. 1985. Importância da sanidade na produção de sementes de alta qualidade. Revista Brasileira de Sementes, 7(1): 113-23.

MENTEN, J.O.M. 1991. Prejuízos causados por patógenos associados as sementes. In: Menten, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba, ESALQ/FEALQ. 321p.

NASSER, L.C.; ANJOS, J.R.N. dos; PERES, J.R.R.; MEDEIROS, A.C. de S.; SPEHAR, C.R.; FILHO, G.V. & SOUZA, P.I. de. 1984. Fungicidas para tratamento de sementes de soja. (Comunicado Técnico nº 40, p. 1-6. EMBRAPA/CPAC).

NEERGAARD, P. 1977. Seed pathology, 2ed. London, The Mcmillan Press. v. 1. 839p.

NOTÍCIA do Comitê de Patologia de Sementes. 1992. COPASEM: padrão de sanidade de semente. Informativo ABRATES V. 2, nº 3, p. 21.

PINTO, H.M.A. 1989. *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram & Jain em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.): quantificação e localização de inóculo, efeitos no estabelecimento da cultura e controle com fungicidas. Dissertação (Mestre). ESALQ-USP, Piracicaba, 102p.

SADER, R.; KRONKA, S.N. & ABRAHÃO, N.C. 1981. Efeito da brusone e do tratamento fungicida na germinação e vigor da semente de arroz. In: Congresso Brasileiro de Sementes, 2, Recife, 1981. Resumos... Brasília, ABRATES p. 23.

SHARMA, K.D. 1981. Biodeterioration of sesamum oil "in situ" by fungi. Indian Phytopathology. 34(1): 50-53.

SILVA, G.S. da. 1983. Incidência de *Macrophomina phaseolina* em feijão de metro, *Vigna sesquipedalis* (L.) Fruwirth Fitopatologia Brasileira, Brasília, 8 (1): 201-203.

SINCLAIR, J.B. 1982. Compendium of Soybean Diseases. 2. ed. Minnesota, American Phytopathological Society. 104p.

SINHA, O.K. & KHARE, M.N. 1977. Site of infection and further development of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium equisetti* in naturally infected cowpea seeds. Seed Science and Technology, Zurich, 5(4): 721-725.

# Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias

por Mirian T. S. Eira *

## INTRODUÇÃO

O armazenamento visa proteger a semente da deterioração e dos danos, minimizar a perda da germinação e do vigor, assim como manter a identidade da semente, a condição física e a pureza.

O objetivo principal de se conservar sementes de plantas de valor econômico é a manutenção de estoques para o plantio no ano seguinte. O homem aprendeu a necessidade dessa prática e desenvolveu métodos para armazenar pequenas quantidades de sementes para uso futuro. Com o desenvolvimento da agricultura os conhecimentos neste assunto foram se expandindo tanto com relação às condições de armazenamento como às variações ambientais que influem na qualidade da semente armazenada. Já numa fase posterior, o agricultor começou a dar maior importância em manter sementes vivas por períodos mais prolongados, pois em alguns casos era vantajoso conservá-las por dois anos ou mais, diminuindo assim as chances de perdas em anos de baixa produção.

Outro objetivo de se conservar sementes veio posteriormente, com o aumento do conhecimento e utilização da genética e do melhoramento de plantas. Foi a necessidade de se conservar por longos períodos pequenas quantidades de diversos materiais, possuidores de uma carga genética especial e que podem ser úteis em futuros trabalhos de melhoramento. Para atender esta necessidade existem os Bancos de Germoplasma, que possuem os seguintes objetivos, segundo Ellis **et al** (1985) e Goedert (1988):

a) Conservar fontes genéticas para uso futuro em melhoramento e estudos em genética.

b) Manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para utilização nos programas de melhoramento.

c) Prevenir e evitar perdas de valiosos recursos genéticos.

A idéia da conservação genética é relativamente recente e até o momento ainda não sensibilizou todos os países do mundo. Hoje algumas espécies selvagens, tanto animais como vegetais, certamente já foram irremediavelmente perdidas e outras correm sérios riscos. A adoção de novas cultivares resultou em uma erosão genética acelerada ao longo do tempo o que também significa perda de genes.

Existem pelo menos dois motivos importantes para a conservação de germoplasma. O primeiro é de caráter moral: a simples destruição de uma espécie vegetal é quase sempre algo brutal pelo fato de se estar destruindo irremediavelmente um ser vivo. O segundo motivo reveste-se de caráter prático: talvez um dia o homem necessite dessas plantas que ele hoje está destruindo.

## COMPORTAMENTO DAS SEMENTES NO ARMAZENAMENTO

Para se conservar sementes a longo prazo é necessário manter a atividade respiratória em níveis bastante baixos, o que é conseguido baixandose a temperatura ambiente e o grau de umidade das sementes. Porém as sementes de algumas espécies

* *Pesquisador da EMBRAPA/CENARGEN*

possuem comportamentos diversos quando tratadas desta maneira.

A longevidade natural das sementes pode variar de poucos dias a centenas de anos, existindo relatos de sementes que se mantiveram viáveis por mais de 3.000 anos (Roos, 1986; Chin, 1988).

A maior parte das espécies estudadas possui sementes cujo período de longevidade pode ser extendido através da redução da temperatura e conteúdo de umidade durante o armazenamento. Nessas sementes, o grau de umidade pode ser reduzido para 2-5 por cento ou até menos. Segundo Roberts (1973) essas sementes têm um comportamento de viabilidade dito ortodoxo. Há, no entanto, outro grupo de espécies em que essa regra não se aplica. Nessas sementes, referidas como recalcitrantes, a redução do conteúdo de umidade abaixo de alguns valores relativamente altos -algo entre 12 e 31 por cento de umidade, dependendo da espécie- tende a reduzir o período de viabilidade.

Recentemente, foi relatada na literatura a existência de espécies que não se comportam inteiramente nem como ortodoxas, nem como recalcitrantes, entre as quais o café e o mamão (Ellis, **et al.**, 1990; Ellis **et al.** 1991). Nesse caso, as sementes só podem ser secas até um grau de umidade próximo a 10 por cento, sendo sensíveis a danos de secagem além desse valor. A viabilidade é perdida mais rapidamente a temperaturas e umidades baixas que sob temperaturas e umidades altas. E sementes secas podem, ainda, sofrer injúria de frio.

A classificação da espécie em ortodoxa, recalcitrante ou intermediária é de extrema importância para a definição da estratégia de conservação, já que sementes ortodoxas podem ser conservadas a longo prazo, intermediárias somente a médio prazo e recalcitrantes a curto prazo.

A diagnose do comportamento das sementes durante o armazenamento nem sempre foi correta, e em muitos casos, sementes que originalmente foram classificadas como recalcitrantes, hoje são consideradas ortodoxas, como é o caso dos citrus, mandioca, etc. (Roberts **et al.**, 1884; Chin, 1988). Uma diagnose correta é fundamental para determinar a metodologia de conservação que pode ser aplicada com sucesso.

## SEMENTES ORTODOXAS

As sementes ortodoxas são aquelas que podem ser desidratadas a baixos graus de umidade e armazenadas em temperatura subzero sem que ocorram danos fisiológicos. É o caso da maior parte das espécies conhecidas, entre elas as culturas alimentares, como os cereais.

A longevidade das sementes ortodoxas é mantida (incrementada) de uma maneira específica e previsível, dentro de uma gama de condições ambientais, através de redução da temperatura e umidade das sementes (Roberts, 1973; King & Roberts, 1979; Ellis **et al.**, 1985).

Assim, foram desenvolvidas equações para predizer a longevidade durante a conservação (Ellis **et al.**, 1990). A aplicação dessas equações de viabilidade nem sempre é possível, uma vez que estão sujeitas a efeitos de diferenças genotípicas intra-específicas, efeitos de condições pré-armazenamento, efeitos da pressão de oxigênio durante a conservação e a problemas de precisão na determinação do grau de umidade.

As sementes ortodoxas são comumente conservadas a longo prazo nos Bancos de Germoplasma com graus de umidade entre 4 e 8 por cento no interior de embalagens herméticas e em câmaras com temperatura de -18 ou -20°C.

Atualmente também vem sendo conservadas em botijões de nitrogênio líquido sob temperatura de -196°C, procurando-se prolongar ainda mais a sua longevidade.

## SEMENTES RECALCITRANTES

Sementes recalcitrantes perdem a viabilidade quando seu grau de umidade é reduzido abaixo de valores relativamente altos. Não podendo ser secas,

também não podem ser conservadas a temperaturas subzero, quando cristais de gelo podem se formar e romper as células. Além disso, algumas semente recalcitrantes de espécies tropicais são suscetíveis à injúria de frio e sementes úmidas perdem a viabilidade a temperaturas entre 10 e 15°C. Esses aspectos fisiológicos limitam os ambientes para a conservação da viabilidade (Roberts,, 1973; King & Roberts, 1979; Chin, 1988).

Algumas de nossas culturas, fruteiras e espécies florestais, como o abacate, a manga, a seringueira, possuem sementes recalcitrantes. Normalmente as sementes são grandes e oriundas de ambientes aquáticos ou tropicais.

Nas últimas décadas, muitos métodos diferentes foram propostos para a conservação a longo prazo das sementes recalcitrantes mas todos eles apresentaram uma série de problemas. Na melhor das hipóteses, as sementes recalcitrantes podem ser armazenadas por períodos máximos de um ano, de modo que sua conservação em Bancos de Germoplasma é impraticável.

Existem algumas referências à conservação de sementes com alto grau de umidade, mas os problemas dessa técnica, tais como a prevenção da germinação, controle de fungos e manutenção da umidade relativa ainda não foram superados; e todos esses fatores contribuem para o rápido declínio da viabilidade (Chin, 1988).

Por outro lado, têm-se obtido algum progresso na conservação de germoplasma usando métodos "in vitro", ou seja, manutenção sob crescimento normal, limitação de crescimento e criopreservação.

## SEMENTES INTERMEDIÁRIAS

A categoria intermediária foi recentemente descrita na literatura (Ellis et al, 1990; 1991) e engloba aquelas espécies que não se comportam totalmente nem como ortodoxas nem como recalcitrantes. São espécies como o café e o mamão, que só suportam baixas temperaturas quando desidratadas a níveis não inferiores a 10 por cento.

Já foram observadas porém, espécies que possuem grau de umidade inferior a 10 por cento, sofrem redução da viabilidade ao serem desidratadas e morrem ao serem submetidas à temperaturas subzero, estando secas ou não. É o caso das sementes de cumaru *Dipteryx odorata*, uma leguminosa nativa da Amazônia.

São ainda necessários estudos para determinação das metodologias de conservação das sementes dessa categoria. Atualmente só podem ser conservadas a médio prazo, sob temperatura de 5 - 10°C.

## METODOLOGIA PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS SEMENTES

Diversos testes devem ser realizados para a correta classificação das sementes em ortodoxas, intermediárias ou recalcitrantes:

### Teste de germinação

Para cada espécie procurar otimizar as condições de substrato, temperatura, luminosidade e necessidade de pré-tratamento. Comparar substratos de rolo de papel (RP), sobre papel de filtro (SP) e vermiculita. Avaliar temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C e alternadas de 20-30° e 20-35°C. Em caso de dormência, métodos para superá-la devem ser testados.

### Sensibilidade à secagem

As sementes devem ser submetidas à secagem lenta em câmara a 15% UR (ou semelhante) por diferentes períodos de tempo, de acordo com a espécie. Após cada período, devem ser realizados testes de umidade e germinação. Serão obtidas curvas de viabilidade x teor de umidade onde será indicado o ponto crítico de umidade, abaixo do qual a semente perde sua viabilidade.

### Sensibilidade à baixa temperatura

Sementes secas até atingir o ponto crítico de umidade e sementes não secas devem ser arma-

zenadas em temperatura ambiente, 10°C, 5°C e -20°C durante determinados períodos após os quais realizar testes de germinação.

A partir dos resultados desses testes, a semente poderá ser classificada de acordo com seu comportamento no armazenamento:

- Se as sementes não sofrem danos de secagem ou baixa temperatura, elas são ortodoxas e podem ser conservadas a longo prazo.
- Se as sementes perdem a viabilidade ao serem secas ou expostas à temperatura subzero, elas são recalcitrantes.
- Se as sementes sofrem danos de secagem ou baixa temperatura, porém permanecem viáveis, elas pertencem à categoria intermediária.

A seguir serão relatados os resultados obtidos nos testes em laboratório para três espécies de família Leguminosae nativas da Amazônia. (Quadro 1)

## LITERATURA CITADA

CHIN, H.F. 1988. Recalcitrant seeds - a status report. Rome, IBPGR, 28 p.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks - Volume II. Rome, IBPGR.

--------; HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. Journal of Experimmental Botany, 41: 1167-1174.

--------; HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. 1991. Effect of storage temperature and moisture on the germination of papaya seeds. Seed Science Research, 1: 69-72.

GOEDERT, C.O. 1988. Conservação de germoplasma-semente. In: Encontro sobre Recursos Genéticos, Jaboticabal, 1988. Anais... Jaboticabal, FCAV, p. 78-95.

KING, M.W. & ROBERTS, E.H. 1979. The storage of recalcitrant seeds-achievements and possible approaches. Rome, IBPGR. 96p.

ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology, 1: 499-514.

--------; KING, M.W. & ELLIS, R.H. 1984. Recalcitrant seed: their recognition and storage. Crop genetic resources: conservation and evaluation. In: Holdin, J.H.W. & Williams, J.T. (eds.).London, George Allem and Unwin, p. 38-52.

ROOS, EE. 1986. Precepts of successful seed storage. Physiology of seed deterioration. In: McDonald Jr., M.B. & Nelson, C.J. (eds.). Madison, CSSA, p. 1-25 (CSSA Special Publication, 11).

Quadro 1. Resultados obtidos nos testes em laboratório para três espécies da família Leguminosae nativas da Amazônia.

| Tratamento | Espécie / % Germinação (% Umidade) | | |
|---|---|---|---|
| | *Copaifera langsdorfii* | *Dipteryx odorata* | *Derris urucu* |
| Controle | 95 (10,9%) | 95 (8,1%) | 95 (51,6%) |
| Secagem 15% UR/72 h | 100 (5,4%) | 38 (4,2%) | Zero (6,2%) |
| Arm + 5°C | 99 | 88 | - |
| Arm -20°C | 99 | Zero | Zero |
| Secagem + Arm. + 5°C | 98 | 20 | - |
| Secagem + Arm. - 20°C | 99 | Zero | Zero |
| Categoria | **ORTODOXA** | **INTERMEDIÁRIA** | **RECALCITRANTE** |

# Métodos alternativos para conservação de germoplasma-semente

por Rozane da Cunha *

## INTRODUÇÃO

O avanço e a modernização da agricultura originou uma dependência cada vez maior na diversidade genética das plantas e na habilidade de se usar esta diversidade para aumentar a produção e qualidade das plantas agrícolas. A coleta e conservação de germoplasma é, portanto, fundamental ao processo de melhoramento genético vegetal.

No entanto, a manutenção da diversidade biológica dos diferentes Biomas não é importante somente para o resgate de genes interessantes para a produção de genótipos especiais. Populações inteiras de espécies florestais de grande valor para a sobrevivência da humanidade têm desaparecido devido a fatores climático e antrópicos, tornando a conservação "ex-situ" destes recursos uma prioridade incontestável.

A conservação de germoplasma-semente a longo prazo já está estabelecida para algumas espécies mas poderia ser uma estratégia mais permanente para a conservação de muitas outras espécies se a tecnologia de armazenamento pudesse ser otimizada.

Superar a deterioração fisiológica de uma amostra de semente armazenada é uma das mais difíceis e importantes tarefas no processo de conservação. Sistemas de refrigeração mecânica, que mantêm a semente desidratada sob temperatura de -20°C aumentam o período de armazenamento. Entretanto a deterioração e a perda de viabilidade ainda podem ocorrer nestes sistemas com o aumento do período de armazenamento, resultando na perda de precioso material genético.

Dentre as técnicas alternativas para a conservação do Germoplasma de espécies agrícolas, hortícolas e florestais que estão sendo desenvolvidas atualmente, a criopreservação e a ultra-secagem despontam como as mais promissoras.

## CRIOPRESERVAÇÃO

A técnica de criopreservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido (NL, - 196°C), proporciona o potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralizada, (Kartha, 1985). Os outros métodos de conservação somente adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico de acordo com o material e a espécie em questão.

Além disso, esta técnica apresenta as vantagens de oferecer maior segurança quanto à perda de viabilidade e do baixo custo de armazenamento, uma vez que não exige sistemas de refrigeração e de eletricidade.

Até o presente mais de 50 espécies já foram criopreservadas com sucesso (Chin, 1988), através do congelamento em NL de protoplasto, pólen, suspensão celular, calo, ápice caulinar, meristema e embrião (Withers, 1980).

Embora seja possível criopreservar várias partes da planta, Henshaw **et al.** (1980) alertam para o fato de

* *Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisadora, Conservação de Recursos Genéticos, CENARGEN/ EMBRAPA, Brasília, DF, Brasil.*

que sistemas organizados como sementes e embriões são os mais adequados para a conservação de Recursos Genéticos.

A utilização do NL como um meio de armazenamento pressupõe que as sementes sobrevivam à exposição do NL sem sofrer danos à sua viabilidade.

As sementes podem ser classificadas en três grupos de acordo com sua sensibilidade ao dessecamento e sua tolerância ao NL (Stanwood, 1985).

**Sementes tolerantes ao dessecamento e ao NL**

As sementes da maioria das espécies agrícolas e hortícolas são tolerantes ao dessecamento (ortodoxas) e ao congelamento em NL.

A partir de uma relação de 155 espécies e 455 acessos apresentada por Stanwood (1985) cujas sementes mantiveram sua viabilidade após o armazenamento em NL, são apresentadas no Quadro 1, as mais importantes do ponte de vista econômico.

Embora a criopreservação de sementes de muitas espécies ortodoxas já seja uma realidade, durante o estabelecimento da metodologia para cada espécie, alguns fatores devem ser observados com atenção para o sucesso da operação: o teor de umidade da semente, a velocidade de congelamento e de descongelamento, e danos físicos à semente.

***Teor de umidade***

O teor de umidade da semente é, provavelmente, o mais crítico fator para o sucesso da criopreservação.

Quadro 1. Espécies cujas sementes sobreviveram ao congelamento em NL. (Dados retirados de Stanwood, 1985).

| Espécie | Teor de umidade % | Período de armazenamento | Germinação % | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Antes | Depois |
| *Allium cepa* | 8,8 | 2m | 80 | 94 |
| *Apium graveolens* | 10,2 | 3a | 89 | 90 |
| *Arachis hypogaea* | 7,3 | 30d | 100 | 100 |
| *Asparagus officinalis* | 8,6 | 600d | 82 | 86 |
| *Avena sativa* | 8,4 | 180d | 94 | 97 |
| *Beta vulgaris* | 6,8 | 3a | 88 | 90 |
| *Brassica oleracea* | 5,5 | 3a | 95 | 97 |
| *Copsicum annum* | 4,3 | 3a | 98 | 98 |
| *Cucumis melo* | 6,0 | 3a | 96 | 95 |
| *Cucumis sativus* | 6,3 | 3a | 97 | 96 |
| *Cucurbita pepo* | - | 48h | 100 | 97 |
| *Daucus carota* | 6,8 | 3a | 81 | 86 |
| *Glycine max* | 7,1 | 3a | 84 | 57 |
| *Gossypium hirsutum* | <13 | 180d | 92 | 90 |
| *Lactuca sativa* | 4,6 | 3a | 97 | 98 |
| *Lycopersicon esculentum* | 7,2 | 3a | 90 | 89 |
| *Manihot esculenta* | 6,3 | 3h | 80 | 80 |
| *Medicago sativa* | 6,5 | 3a | 86 | 90 |
| *Nicotiana tabacum* | 4,7 | 3a | 95 | 92 |
| *Oryza sativa* | 9,7 | 3a | 96 | 92 |
| *Phaseolus vulgaris* | 7,1 | 3a | 97 | 99 |
| *Pisum sativum* | 27 | 1m | 100 | 94 |
| *Raphanus sativus* | 5,1 | 3a | 98 | 98 |
| *Solanum melongena* | 6,2 | 180d | 95 | 92 |
| *Spinacea oleracea* | 7,5 | 3a | 95 | 97 |
| *Triticum aestivum* | 8,8 | 3a | 87 | 83 |
| *Zea mays* | 8,9 | 3a | 98 | 93 |

Se a umidade da semente é muito alta, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e/ou descongelamento.

Em algumas espécies, como o *Sesamum indicum* (Stanwood, 1985), um nível muito baixo de teor de umidade, pode causar a perda parcial da viabilidade da semente, dependendo do método de congelamento.

Existe um limite máximo de teor de umidade para o congelamento (High Moisture Freezing Limit-HMFL), acima do qual a viabilidade de uma amostra de semente é reduzida durante o congelamento (Stanwood, 1985). Este limite crítico é normalmente uma faixa relativamente estreita de teor de umidade dentro da espécie mas pode variar entre espécies. Exemplos de teor de umidade crítico que vai de 9,6 por cento para sementes de sesamo até 28,5 por cento para feijão são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Limite máximo de umidade para congelamento (HMFL) de sementes de algumas espécies. (Dados retirados de Stanwood, 1985).

| ESPECIE | GERMINAÇÃO | | |
|---|---|---|---|
| | HMFL | Umidade abaixo de HMFL | Umidade acima de HMFL |
| *Hordeum vulgare* | 20,8 | 98 | 18 |
| *Phaseolus vulgare* | 27,2 | 99 | 84 |
| *Brassica oleraceae* | 13,8 | 90 | 0 |
| *Cucumis sativus* | 16,4 | 98 | 1 |
| *Festuca* sp. | 23,0 | 98 | 2 |
| *Allium cepa* | 24,7 | 70 | 0 |
| *Raphanus sativus* | 16,8 | 99 | 4 |
| *Sesamum indicum* | 9,3 | 97 | 0 |
| *Lycopersicon esculentum* | 18,5 | 93 | 0 |
| *Triticum aestivum* | 26,8 | 96 | 25 |

### *Velocidade de congelamento e de descongelamento*

Para a maioria das espécies a velocidade de congelamento e de descongelamento não é um fator significante para a sobrevivência de sementes expostas ao NL. No entanto, algumas exceções podem ser exemplificadas com sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) que, a 19 por cento de teor de umidade mantiveram a viabilidade somente quando sob alta velocidade de congelamento (200°C/min.) e sementes de sesamo (*Sesamum indicum* L.) que, com baixa velocidade de congelamento apresentaram 100 por cento de viabilidade independente do teor de umidade. No entanto, a 200°C/min. a viabilidade foi reduzida junto com o teor de umidade (Stanwood, 1985).

Assim, para algumas espécies a velocidade de congelamento tem o potencial de reduzir a viabilidade dependendo do nível de umidade da semente.

### *Danos físicos*

O processo de congelamento e descongelamento, passando por extremos de temperatura, impõe grande estresse físico sobre a semente.

Algumas espécies como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) quando expostas diretamente ao NL, apresentam danos físicos, predominando a separação longitudinal dos cotilédones. No entanto, quando a semente foi imersa na fase de vapor do NL não foi observado nenhum tipo de dano físico. Outras espécies também apresentaram problemas: *Linum usitatissumum, Glycine max, Medicago sativa* e *Raphanus sativus* (Stanwood, 1985).

Procedimentos práticos para implementar a criopreservação de sementes tolerantes ao dessecamento e ao NL (Stanwood, 1984):

a. É necessário, inicialmente estabelecer os níveis ótimos de teor de umidade e as taxas de congelamento e descongelamento para cada espécie.

   Utilizar de 10 a 100 sementes e um curto período de exposição ao NL (24h). Se ao final do teste de germinação a semente não apresentar danos fisiológicos, toda a amostra pode ser colocada na fase de vapor do NL (-150°C) com um alto nível de certeza de que a amostra será conservada com segurança.

   A maioria das sementes tolerantes ao dessecamento e ao NL apresenta porcentagem

total de sobrevivência ao NL quando seu teor de umidade se situa entre 5-10 por cento e a taxa de congelamento varia de 1 a 30°C/min. que é a velocidade de congelamento verificada durante a imersão na fase de vapor no NL.

b. Equipamento e embalagens: O sucesso da criopreservação depende do uso de um bom equipamento. O tanque de NL adequado deve conter o reservatório de NL e a amostra de semente na mesma cavidade. Estes tanques podem manter a temperatura por um período de tempo de 30 a 120 dias sem necessitar de adição de NL.

A maioria das sementes pode suportar a imersão direta em NL. No entanto, existem indicações de que as sementes armazenadas no vapor acima do NL não sofrem danos físicos, talvez porque a velocidade de congelamento seja mais lenta (em torno de 30°c/minuto) do que na fase liquida (200°C/minuto).

c. Monitoração da Viabilidade: Teoricamente se uma amostra de semente pode ser congelada em NL e descongelada sem reduzir sua viabilidade, o período de tempo em que a semente pode ficar armazenada em NL, dias, semanas, meses, anos ou séculos é insignificante. No entanto, a prudência recomenda que o controle de qualidade do acesso seja realizado anualmente, pelo menos no início do estabelecimento da metodologia para a espécie em questão.

**Sementes tolerantes ao dessecamento mas sensíveis ao NL**

Muitas sementes de espécies frutíferas tais como *Prunus* spp, *Juglans* spp, *Corylus* spp. e *Coffea* spp., apresentam este comportamento durante a criopreservação.

Estas sementes podem ser desidratadas a níveis de umidade menores do que 10 por cento mas não podem suportar temperaturas abaixo de -40°C.

Sementes desta categoria normalmente apresentam grande quantidade de lipídeos de reserva, atingindo até 60 a 70 por cento em algumas espécies.

O desenvolvimento de técnicas adequadas de criopreservação para estas espécies seria a solução para a conservação do seu germoplasma e conseqüentemente daria origem a métodos eficientes de melhoramento e propagação.

**Sementes sensíveis ao dessecamento e ao NL**

As sementes sensíveis ao dessecamento, denominadas de recalcitrantes por Roberts (1973), normalmente também apresentam vida curta e são sensíveis a extremos de temperatura.

Muitas tentativas já foram feitas, sem sucesso, para desenvolver uma técnica de preservação a longo prazo para esta categoria de sementes. O desenvolvimento de técnicas criogênicas é o que provavelmente apresenta maior potencial para a conservação do germoplasma de espécies, com sementes recalcitrantes.

A regeneração da planta através do cultivo de meristema e ápices caulinares conservados em NL já foi obtida para as seguintes espécies: *Dianthus caryophyllus* (Vemura & Sakai, 1980), *Cicer arietinum* (Kartha & Gamborg, 1978), *Pisum sativum* (Kartha et al., 1979), *Solanum tuberosum* (Bajaj, 1978), *Fragaria* x *ananassa* (Kartha **et al.**, 1980) e *Malus* sp. (Katano **et al.**, 1983).

A criopreservação de embriões zigóticos, embora envolvendo o mesmo princípio básico que aquela utilizada para células ou tecidos oferece a vantagem de que o embrião se desenvolve diretamente em plântula. Embriões zigóticos, somáticos e nucleares ou mesmo eixos embrionários têm sido congelados com sucesso para algumas espécies vegetais.

Normah **et al.**, (1986), obteve regeneração de plantas de seringueira a partir de eixos embrionários em NL, o que ilustra o enorme potencial desta técnica para a conservação de germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes. Embora a semente recalcitrante seja intolerante ao dessecamento e armazenamento sob baixas temperaturas, seu embrião pode ser desidratado a níveis menores de umidade do que a semente e assim criopreservado com sucesso.

Isto já foi parcialmente obtido e relatado por Grout et al., (1983) para *Elaeis guinensis*, Pritchard e Prendergast (1986) para *Araucaria hunsteinii*, Chin et al. (1988) para *Veitchia merrillii* e *Houvea fosteriana* e Krishnapillay et al (1990) para *Artocarpus heterophyllus*.

## ULTRA-SECAGEM

É fato conhecido que o teor de umidade da semente e da temperatura de armazenamento são os mais importantes fatores que afetam a longevidade da semente durante o armazenamento e o mais comum e seguro método para a conservação de germoplasma é o armazenamento frio, com a semente apresentando teor de umidade entre 5 e 10 por cento a 20°C de temperatura.

Se a redução do teor de umidade abaixo de 5 por cento pode induzir efeitos negativos sobre a germinação e vigor de semente ainda é passível de controvérsias.

Recentes experimentos realizados na University of Reading, UK, mostraram que a ultra-secagem de sementes ortodoxas, abaixo de 5 por cento de teor de umidade não prejudicou sua viabilidade e aumentou sua capacidade de armazenamento.

Esta técnica poderia ser desenvolvida para os países mais pobres, uma vez que os gastos com câmaras a temperaturas de -20°C seriam eliminados. As sementes poderiam ser desidratadas a níveis abaixo de 5 por cento e hermeticamente acondicionadas em embalagens impermeáveis e armazenadas sob temperatura ambiente.

Embora bastante promissora esta nova tecnologia ainda está em fase experimental para determinar se distúrbios genéticos, citológicos ou fisiológicos poderiam ocorrer a longo prazo.

Os principais resultados de experimentos realizados durante 2,5 anos em Beijing, na China, por Guang-Hua (1991) são apresentados a seguir:

1. Entre os vários métodos utilizados para secar as sementes, o mais efetivo, seguro e econômico foi a sílica gel em dessecadores sob a temperatura ambiente.

2. Para prevenir danos à morfologia e estrutura da célula em algumas espécies é necessário fazer um pré-tratamento antes da ultra-secagem. Este tratamento consiste na hidratação e desidratação da semente, sendo que o tratamento repetido foi mais eficiente que um único tratamento.

3. Testes com sementes oleaginosas com diferentes espécies de *Brassica* sp., *Arachis* sp., *Sesamum* sp. *Glycine* sp. confirmaram que a ultra-secagem não induziu nenhuma significante modificação na germinação e vigor. Além disso as sementes ultra-secas foram mais tolerantes ao envelhecimento acelerado do que as sementes do controle.

4. Sementes de *Brassica* spp., *Beta vulgaris*, *Glycine max*, *Eucommia ulmoides*, *Arachis hypogaea*, *Asparagus officinalis* *Oenothera odorata*, *Sesamum indicum*, *Sorghum vulgare*, *Ulmus pumila*, *Populus* spp. etc. foram submetidas à ultra-secagem e nenhum efeito deletério foi detectado, após análises ultra-estruturais, bioquímicas e fisiológicas.

## LITERATURA CITADA

BAJAJ, Y.P.S. 1980. Tuberization in potato plants regenerated from freze preserved meristems. Crop. Impr. 5: 137-40.

CHIN, H.F.; KRISHNAPILLAY, B. & ALANG, G.G. 1988. Cryopreservation of Veitchia and Houwvea palm embryos: non-development of the haustorum. Cryoletters. 9:372-379.

GROUT, B.W.W.; SHELTON, K. & PRITCHARD, H.W. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. Ann. Bot. 52: 381-384.

GUANG-HUA, Z. 1991. Research on ultra-dry seeds. 4th Progress report. IBPGR, Rome, Italy.

HENSHAW, G.G. ; STAMP, J.A. & WESTCOTT, J.J. 1980. Tissue cultures and germplasm storage. In: Sala, F; Parisi, B.; Cella, R & Ciferri, O. (eds.). Plant Cell Cultures: results and perspectives: 277-282. Elsevier, Amsterdan.

KARTHA, K.K. & GAMBORG, O.L. 1978. Meristam culture techniques in the production of disease-free plants and freeze-preservation of germplasm of tropical tuber crops and grain legumes. In: Maraite, H. & Mayer, J.A. (eds.) Diseases of Tropical Food Crops, Université Catholique, Louvain, Belgium.

--------; LEIVNG, N.L. & GAMBORG, O.L. 1979. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequente plant regeneration. Plant Sci. Lett., 15: 7-16.

--------;LEIVNG, N.L. & PAHL, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlests. J. Am. Soc. Hort. Sci., 105(4): 481-484.

KATANO, M.; ISHIHARA, A. & SAKAI, A. Cryopreservation of shoot apices of apple winter buds. Hort. Sciences, 18: 707-8.

KRISHNAPILLAY, B.; MARZALINA, M. & YAP, S.K. 1990. Is long term storage of forest seeds possible? Malaysium forestry and forest products research. p. 66-78.

NORMAH, M.N.; CHIN, H.F. & HOR, Y.L. 1986. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Pertanika, 9(3): 299-303.

PRITCHARD, H.W. & PRENDERGAST, F.G. 1986. Effects of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. J. Exp. Bot. 37: 1388-1397.

ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology, 1: 499-514.

STANWOOD, P.C. & BASS, L.N. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. Seed Sci. Technol. 9: 423.

--------. 1984. Cryopreservation of seeds. IBPGR report second meeting, IBPGR Advisory Committee on Seed Storage, Appendix III. IBPGR Secretariat, Rome.

--------. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: Cryopreservation of Plant Cells and Organs, K.K. Kartha, ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

VEMURA, M. & SAKAI, A. 1980. A survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperatura of liquid nitrogen. Plant Cell Pysiol, 21 (1): 85-94.

WITHERS, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Technical Report. IBPGR Secretariat. Rome.

# Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal

por Rui Américo Mendes e Marisa de Goes *

## INTRODUÇÃO

Desde o início do século, a multiplicação de vegetais *in vitro* tem despertado o interesse de vários pesquisadores. Quem pela primeira vez tentou mostrar a totipotência (isto é, todas as informações que uma célula contem que a capacita a desenvolver um novo organismo idêntico) de células vegetais, foi Haberlandt no ano de 1902. Ele não obteve sucesso em seus experimentos de cultivo de células e tecidos somáticos em solução nutritiva, porque as células não se dividiam pela ausência de fito-hormônios ou substâncias de crescimento no meio de cultura. Estas substâncias eram desconhecidas naquela época. Os primeiros fito-hormônios foram identificados em 1934 (Krikorian & Berquan, 1969.

A partir da década de 30, White conseguiu desenvolver *in vitro* pontas de raízes de tomateiro em meio líquido por ele desenvolvido e a cultura de tecidos vegetais realmente teve seu início.

Já na década de 50, Morel & Martin conseguiram, com o cultivo de ápices caulinares, recuperar plantas de dalia livres de virus causador da doença do mosaico. Também foi no final desta década que Morel, recuperando plantas de orquídea da espécie *Cymbidium* contaminadas por virus, demonstrou a potencialidade do uso comercial da multiplicação *in vitro* (Morel, 1960).

Na década de 60, com a publicação de um meio de cultura para tabaco, desenvolvido por Murashige & Skoog com base no meio de White, a cultura de tecidos vegetais se desenvolveu mais rapidamente. Principalmente quando se considera o aspecto comercial de mudas de plantas obtidas pela multiplicação *in vitro* (Murashige & Skoog, 1962).

Quando o IBPGR (atualmente IPGRI) iniciou suas atividades de conservação de germoplasma, o foco principal era conservação de sementes ortodoxas de culturas como cereais e legumes. Mais tarde, foram incluidas forrageiras, fruteiras e vegetais que, por serem na sua maioria propagadas assexualmente, teve a estratégica de conservação mudada. Por isto, em 1979, foi nomeada uma comissão de especialistas em cultura de tecidos para estudar e avaliar o potencial do desenvolvimento de métodos de armazenamento *in vitro*. Com o trabalho desta comissão foi reconhecido o valor potencial da conservação de cultivos de meristemas/ápices *in vitro* a temperatura baixa e a utilização de criopreservação de cultura de células embriogênicas (Withers & Williams, 1986).

## CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

Algumas espécies tropicais como fruteiras e essências florestais como dendê, café, seringueira, citrus, manga, cacau entre outras, por possuirem sementes recalcitrantes, têm sua viabilidade perdida em um espaço de tempo muito curto, sob os métodos convencionais de conservação em câmara fria. Já as espécies de propagação vegetativa como batata, mandioca, batata-doce, banana, inhame, entre outras, são mantidas a campo na forma vegetativa, com propagação sistemática e a um risco muito grande de perdas. Muitas vezes estas culturas perderam a capacidade de produzirem grande número de sementes ou quando as produzem, elas são recalcitrantes ou

* *Engenheiros Agrônomos, PhD, Pesquisadores de CENARGEN/EMBRAPA.*

apresentam um alto grau de heterozigose. O cultivo de uma coleção de propagação vegetativa a campo, ano após ano é cara e corre uma série de riscos como doenças, pragas, fenômenos naturais, roubo, mistura, perda de identificação, problemas políticos e econômicos. Como conseqüência, alguns genótipos podem ser perdidos.

E muito difícil manter a campo plantas propagadas vegetativamente livres de viroses e isto representa a maior ameaça fitopatológica para este tipo de conservação de germoplasma. A infecção por virus leva a degeneração do estoque clonal. Doenças causadas por fungos e bactérias são mais facilmente controladas por medidas fitossanitárias adequadas. (CIAT, 1982).

A manutenção de grandes coleções a campo exige grande área de terra e muita mão de obra. Para estas coleções, a documentação e identificação são extremamente importantes e a expectativa é de que ocorra o mínimo de erros. Para estes casos, a técnica de cultura de tecidos *in vitro* pode ser utilizada como uma forma mais segura de conservação do germoplasma em coleção ativa.

Atualmente é reconhecida a técnica de conservação *in vitro* com crescimento lento para muitas espécies, na chamada coleção ativa de germoplasma *in vitro*. Também, pelo uso da criopreservação, há potencial para conservação de germoplasma na denominada coleção de base de germoplasma *in vitro*. Porém, neste último caso, apesar de várias pesquisas em progresso, ainda não existe protocolo seguro que permita seja o germoplasma conservado por esta técnica (IBPGR, 1986; Withers & Williams, 1986).

Dependendo das características específicas de cada germoplasma vegetal, pode ser utilizada uma ou mais formas de conservação. De uma maneira bem geral e para melhor situar a conservação de germoplasma *in vitro* é apresentada as várias formas pelas quais ela pode ser feita.

**Conservação de germoplasma:**

- "In situ" - quando populações silvestres são conservadas em seu próprio habitat em reservas genéticas.

- "Ex situ" - se presta tanto para espécies domesticadas como silvestres. Ela pode ser de um só tipo ou em combinação de duas ou mais formas de conservação, dependendo das características da espécie.

***Conservação de sementes***

E possível para espécies cujas sementes são denominadas ortodoxas, por suportarem a desidratação até 7 por cento de umidade e temperaturas baixas.

*Coleção de base*

Quando as sementes são armazenadas em câmara frigoríficas a -20°C de poder germinativo e vigor e esporádica multiplicação.

*Coleção ativa*

Sementes conservadas a 5°C positivos por um período relativamente curto com multiplicação constante e indexação dos acessos. Suas funções principais são a multiplicação, caracterização, distribuição de amostras dos acessos e alimentação da coleção de base.

***Conservação a Campo***

Aplicada para espécies de elevada heterozigose e que possuem sementes recalcitrantes. Este tipo de conservação demanda muita mão-de-obra e espaço, principalmente quando se trata de espécies arbóreas. Além disto, o germoplasma pode sofrer a ação de falta de recursos financeiros, pragas, doenças, granizo, descarga elétrica, enchente, fogo e roubo.

*Coleção clonal*

Utilizada para espécies de propagação vegetativa, cada parcela é plantada com um genótipo ou acesso e assim mantida por multiplicações sucessivas, a curto, médio ou longo espaço de tempo, dependendo das características da espécie.

*Jardim evolutivo*

Deve ser utilizado para espécies em processo de domesticação e silvestres oriundas de coletas. Amostras são plantadas agrupadas em um mesmo

local, com possibilidades de introgressão, permitindo que as sementes germinadas cresçam e venham a fazer parte da coleção. Por este sistema o processo evolutivo não é interrompido, porém com o passar do tempo, a coleção se estabilizará em uma população adaptada às condições ambientais onde ela está instalada. Com certeza, muitos alelos que não apresentam vantagens dentro do ecossistema se perderão. Uma forma de contornar em parte este problema, é o plantio de vários jardins evolutivos de uma mesma espécie em diferentes ecossistemas.

***Conservação* In vitro**

Como o próprio nome indica, é uma coleção dependente de laboratórios específicos e bem equipados. É utilizada para espécies de sementes recalcitrantes e com elevada heterozigose, quando queremos ter uma segurança maior na conservação, sem os possíveis riscos da coleção a campo.

*Coleção de base*

Se refere a criopreservação de material biológico a ultra-baixas temperaturas em nitrogênio líquido (-196°C). O conceito da criopreservação é a de que sob temperaturas extremamente baixas, todos os processos metabólicos são paralizados e as partes ou propágulos utilizados são mantidos em estado latente. Teoricamente a conservação se daria por um período indefinido, desde que mantido o nível ideal de nitrogênio líquido no bujão. No entanto, até o presente momento não existem protocolos definidos para a utilização desta técnica para um grande número de espécies, mas é inegável o potencial futuro que ela representa.

*Coleção ativa*

Coincide com a técnica da cultura de tecidos ***in vitro* e é mais uma opção para a conservação daquelas espécies de sementes recalcitrantes com elevada heterozigose e de propagação vegetativa. Alguns fatores ajudam no prolongamento da conservação *in vitro*, sem a necessidade de repicagens em espaço de tempo muito curto entre uma e outra, induzindo o retardamento do crescimento da plântula.**

A maior vantagem da conservação de uma coleção ativa *in vitro*, usando cultura de tecidos, é se ter mais uma alternativa para as culturas de propagação vegetativa, para aquelas de sementes recalcitrantes e para espécies com elevado grau de heterozigose nas sementes. Como desvantagens, este sistema apresenta a necessidade de sub-cultivos periódicos, risco de perda por contaminação ou por danos aos equipamentos de controle ambiental, possibilidades de variação genética ao longo do cultivo, o germoplasma não estar prontamente disponível ao melhorista, mão de obra especializada, elevados custos de instalação e manutenção.

Atualmente, pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de definir um melhor protocolo, específico para cada espécie, que possibilite o prolongamento da conservação da coleção ativa *in vitro*, induzindo nas plântulas um crescimento lento, sem a necessidade de repicagens em um espaço de tempo muito curto entre uma e outra. Desta forma, a conservação é realizada por período que vai de curto a médio prazo.

O crescimento lento pode ser induzido por diferentes técnicas como:

1. A temperatura reduzida é o mais comum fator físico utilizado. Geralmente culturas tropicais não toleram uma redução da temperatura como as culturas temperadas. Culturas como batata, maçã e morango podem ser armazenadas de 0 a 6°C, porém culturas como a mandioca e batata-doce suportam temperaturas que variam de 15 a 20°C.

2. Diminuição da intensidade luminosa na câmara de crescimento.

3. Alteração do meio de cultura básico pela omissão ou redução de alguns fatores essenciais para o crescimento normal das plântulas, tem sido utilizado para algumas culturas.

4. O uso de retardantes do crescimento como ácido abscísico, hidrazina maleica, manitol ou sorbitol.

5. Submersão do explante em óleo mineral (parafina liquida) ou silicone liquido, com redução no suprimento de oxigênio.

6. Combinação de duas ou mais técnicas de indução do crescimento lento.

Além da conservação por cultura de tecidos ou por criopreservação é conveniente e seguro manter uma grande coleção de culturas propagadas vegetativamente no seu centro de diversidade (Ford-Lloyd & Jackson, 1986).

Teoricamente, a cultura de tecidos pode ser mantida sob condições normais indefinidamente, desde que nutrientes sejam fornecidos e acidentes evitados. Porém um sistema deste com elevada taxa de multiplicação não é adequado para a conservação de germoplasma, porque exige uma constante atenção e manutenção, com o perigo de perdas de acessos. A técnica do armazenamento da coleção ativa *in vitro* é comente um componente de uma estratégia de conservação que também envolve a propagação e a movimentação de germoplasma.

A conservação *in vitro* permite que explantes, de preferência meristemas das plantas, sejam introduzidos em meios de cultura assépticos mantendo-os livres de patógenos e pragas e tornando-os disponíveis para uso futuro (CIAT, 1980). No entanto existem muitos sistemas de cultivo de tecido que vão da cultura de protoplastos, células e calos, aos organizados embriões, plântulas e brotações.

Porém, do ponto de vista da estabilidade genética e conservação de germoplasma, é preferível o uso de sistemas organizados multiplicados por uma via não adventícia (isto é, começando a cultura pelo cultivo de meristema e multiplicando com o uso das gemas laterais e apicais da plântula).

Pela Figura 1 pode-se perceber a movimentação dos acessos dentro de um banco de germoplasma *in vitro* e a sua relação com o banco de germoplasma a campo ou acessos conseguidos de fontes externas.

A escolha do método de conservação vai depender das características da espécie a ser conservada e dos aspectos econômicos e de facilidades de equipamentos. Assim, espécies que possuem sementes ortodoxas, serão conservadas sob a forma de sementes em câmaras frias. No entanto, algumas espécies de propagação vegetativa com elevada heterozigose, devem ser necessáriamente conservadas como clones. Quando formas de conservação de germoplasma convencionais não muito caras, atenderem as necessidades da conservação com segurança, não deverão ser utilizadas técnicas laboriosas e caras.

A técnica *in vitro* para a utilização e conservação de germoplasma tem grande potencial, mas deve ser utilizada com prudência. Seus benefícios devem ser comparados em relação a outros métodos de conservação. Tentativas têm sido feitas para comparar o custo relativo de plantas propagadas convencionalmente com a técnica *in vitro* de multiplicação. Em alguns casos esta relação é de 1:2-10 vezes. Não se justifica a utilização de uma técnica altamente sofisticada e cara, quando já existem práticas adequadas e seguras para a conservação da cultura. Um julgamento imparcial por parte dos interessados deve ser realizado, para saber se realmente é necessário o uso da técnica da conservação *in vitro* (Withers, 1989; IBPGR, 1983; IBPGR, 1984; IBPGR, 1986a; IBPGR, 1986b).

## INSTALAÇÕES EN UM LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS

Em cultura de tecidos, a manutenção da assepsia é de fundamental importância porque todo meio de cultura contem nutrientes que permitem o desenvolvimento de bactérias e fungos. Com isto, estes organismos crescem muito mais rapidamente e destrói o tecido da planta, que possui crescimento mais lento. Assim, os orgãos das plantas devem ter sua superfície esterilizada quimicamente quando do início da cultura e os instrumentos e frascos com o meio de cultura devem ser esterilizados antes de serem utilizados. Outro fator importante na manipulação asséptica é a rapidez com que o trabalho é realizado, não permitindo a contaminação por microrganismos existentes no ambiente.

Um laboratório para cultura de tecidos, com o objetivo de conservação de germoplasma, deve ter as seguintes dependências:

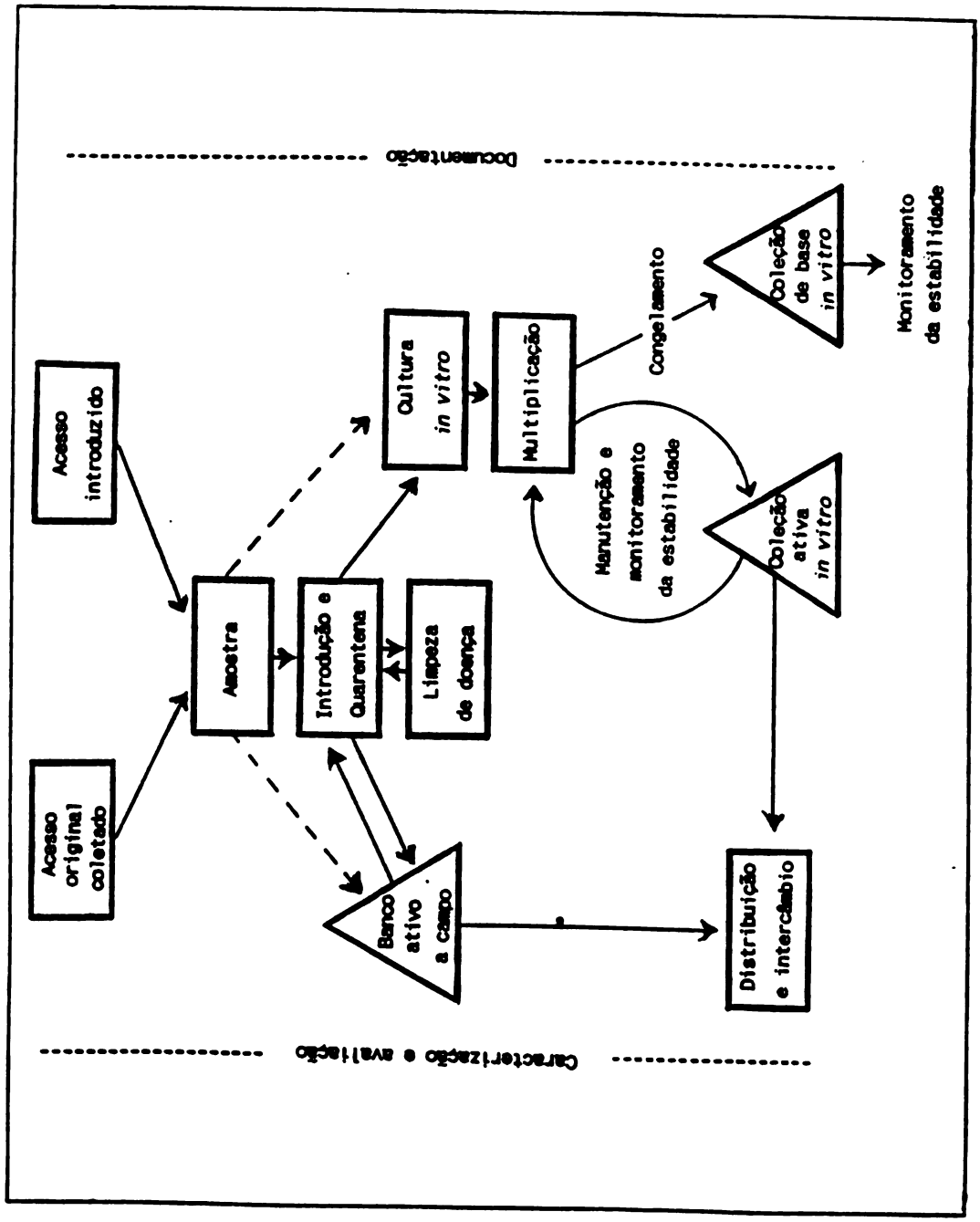



*Figura 1. Esquema de funcionamento de um Banco de Germoplasma in vitro. Modificado de IBPGR, 1986a.*

1. Area para lavagem e esterilização, com equipamentos para lavar e secar vidraria, autoclave para esterilização de meios, destilador de água.
2. Area para o preparo de meios de cultura com geladeira, pH-metro, agitador magnético, chapa aquecedora e estantes para guardar substâncias, instrumental e vidraria, além de um pequeno almoxarifado.
3. Area para trabalhos assépticos de inoculação, transferência e repicagens com câmara de fluxo laminar contínuo, prateleiras para conservar meios de cultura já preparados, vidraria esterilizada, água esterilizada e microscópio estereoscópico.
4. Area para incubação de cultivos, com ambiente controlado quanto a temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo.
5. Casa de vegetação para cultivo de plantas fornecedoras de explantes e aclimatação de plântulas produzidas *in vitro* no caso de monitorar a estabilidade genética de conservação.

Quando da instalação do laboratório, o mais importante é a disposição das diversas áreas e equipamentos, de maneira a torna-lo o mais funcional possível facilitando a movimentação de pessoal e materiais, mas com um menor acesso e circulação de pessoas às áreas de incubação de cultivos e trabalhos onde se exigem condições assépticas (Handro & Floh, 1990; Street, 1977).

## EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS A CULTURA DE TECIDOS *IN VITRO*

### Vidraria

Com muitos tipos de frascos que podem ser usados para o desenvolvimento de culturas. Eles devem ser providos de vedação hermética que impeça a contaminação microbiana, mas que permita uma livre troca de gases. Além dos frascos para cultura, há necessidade de pipetas, buretas, erlenmeyers, placas de petri e beckers em vários tamanhos.

### Instrumental

Deve ser de aço inoxidável e para a cultura de tecidos há necessidade de: bisturi cirúrgico, tesoura, pinça, agulha, estilete. Além disto, para a esterilização do instrumental, por calor, há necessidade de lamparina ou bico de Bunsen na câmara de fluxo laminar contínuo.

### Autoclave

Utilizada para a esterilização da água destilada, vidraria e meio de cultura. Ela segue o mesmo princípio da panela de pressão utilizada nas cozinhas domésticas.

### Destilador de água

Com opção também para produção de água bi-destilada.

### Deionizador ou purificador de água por troca iônica.

### Estufa

Utilizada para a secagem de vidraria e mesmo instrumentos de trabalho.

### pH-metro

Para medir o pH e permitir a sua correção. Ele é muito mais prático de usar do que os indicadores de papel.

### Balança analítica

Para pesagem das substâncias no preparo das soluções estoque.

### Balança de prato

Para pesagem de quantidades maiores de açúcar, agar ou carvão ativado.

### Chapa aquecedora

Pode também ser um fogareiro elétrico ou forno de micro-ondas para a fusão do agar no meio de cultura.

### Agitador magnético

Para homogeneização do meio de cultura.

**Microscópio estereoscópio**

Para trabalhos de extração do explante para início da cultura de tecidos, constituido do meristema mais primórdios foliares.

**Geladeira**

Para a conservação das soluções estoque e de substâncias como fitoreguladores de crescimento.

**Câmara de fluxo laminar contínuo**

Para todo trabalho asséptico de inoculação e transferência de explantes (Handro & Floh, 1990).

## MEIOS DE CULTURA

O início dos estudos de meios nutritivos para cultura de tecidos *in vitro* tinha por objetivo a identificação dos compostos essenciais para o cultivo de células e orgãos isolados das plantas.

Por muito tempo, o meio de cultura, que foi desenvolvido por White para o cultivo de raízes de tomate, foi muito utilizado. Com base no meio de White e por testes de suplementação com extrato de folha de fumo, Murashige & Skoog definiram em 1962 um meio básico, para cultura de tecidos vegetais (conhecido como meio MS em homenagem a eles). Gamborg, Miller & Ojima, trabalhando com suspenção de células de raízes de soja, definiram em 1968 o denominado meio básico B5. Atualmente, os meios básicos MS e B5, com algumas adaptações, são os mais utilizados em laboratórios de cultura de tecidos para a maioria das espécies. Algumas companhias que fornecem produtos para laboratório, tem condições de fornecer as formulações básicas destes meios de cultura já preparadas e em pequenas porções.

Os meios de cultura tem por objetivo suprir as exigências das plantas quanto aos nutrientes, visando atender as condições do explante no seu crescimento *in vitro*. As substâncias químicas com estes elementos devem ser em um elevado grau de pureza e de preferência na qualidade analítica (p.a.). O pH dos meios de cultura deve ser ajustado com o uso de HCl ou NaOH, para deixar o meio ligeiramente ácido. A exigência quanto ao pH pode variar de cultivo para cultivo e de espécie para espécie, porém de uma maneira geral ele é sempre corrigido para pH=5,7.

Quando do preparo do meio de cultura, se constitui em uma perda de tempo muito grande a pesagem de cada constituinte do meio, toda vez que uma determinada quantidade for preparada. Por isto, é conveniente e prático armazenar os componentes do meio de cultura em soluções estoque concentradas. Na formulação das soluções estoque, cada laboratório pode adotar um sistema particular. O ideal é que quando do preparo do meio, as quantidades em volume, das soluções de macronutrientes sejam iguais e dos micronutrientes também, evitando com isto erros na formulação do meio de cultura. Especial atenção deve ser tomada quando do preparo das soluções estoque, onde alguns sais podem ser misturados em uma mesma solução, enquanto que outros devem ser mantidos em solução estoque pura, com somente aquela substância. As soluções estoque devem ser colocadas em frascos de vidro escuro com tampa e armazenadas em geladeira a 4-5°C.

## COMPONENTES BÁSICOS DO MEIO DE CULTURA

### Água

É o maior constituinte, em quantidade, do meio de cultura. É fundamental uma atenção especial à qualidade da água. Toda solução deve ser preparada com água destilada e se possível deionizada, devido os cultivos serem muito sensíveis a contaminantes químicos tóxicos que por ventura estejam no meio de cultura.

### Macronutrientes

São os elementos químicos necessários em maiores quantidades para o desenvolvimento das plântulas *in vitro*. Entre os macronutrientes citamos: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e ferro. Este último atua ora como macronutriente, ora como micronutriente.

### Micronutrientes

São aqueles elementos químicos essenciais e em pequenas quantidades para os vegetais em cultivo. São eles: manganês, zinco, boro, cobre, cloro, molibdênio, cobalto e iodo.

### Vitaminas

Foram definidas pelos primeiros estudos com o cultivo de raízes e consiste de tiamina (vitamina $B_1$), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (vitamina $B_6$), adicionadas de amino-ácido glicina.

### Mio-inositol

É um composto que vem sendo utilizado desde os estudos pioneiros de meios de cultura. Ele é estimulador do crescimento em cultivos de calos.

### Carboidratos

No cultivo *in vitro*, as plantas não encontram concentrações adequadas de $CO_2$ e nem iluminação adequada para realizar a fotossíntese que permita o seu desenvolvimento como um ser autotrófico. Por isto, há necessidade do fornecimento de um carboidrato

Quadro 1. Alguns meios recomendados e usados em cultura de tecidos vegetais.

| Componentes | B5(1) mg/l | H(2) mg/l | LS(3) mg/l | MS(4) mg/l | White(5) mg/l | WPM(6) mg/l |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MACRONUTRIENTES | | | | | | |
| $CaCl_2$ | - | 166 | - | - | - | - |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 150 | - | 440 | 440 | - | 96 |
| $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ | - | - | - | - | 300 | 556 |
| KCl | - | - | - | - | 65 | - |
| $KH_2PO_4$ | - | 68 | 170 | 170 | - | 170 |
| $KNO_3$ | 2.500 | 950 | 1900 | 1900 | 80 | - |
| $K_2SO_4$ | - | - | - | - | - | 990 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 250 | 185 | 370 | 370 | 720 | 370 |
| $NaH_2PO_4.H_2O$ | 150 | - | - | - | 19 | - |
| $Na_2SO_4$ | - | - | - | - | 200 | - |
| $NH_4NO_3$ | - | 720 | 1650 | 1650 | - | 400 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 134 | - | - | - | - | - |
| MICRONUTRIENTES | | | | | | |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0,025 | - | 0,025 | 0,025 | - | - |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,001 | 0,25 |
| $Fe(SO_4)_3$ | - | - | - | - | 2,5 | - |
| $H_3BO_3$ | 3 | 10 | 6,2 | 6,2 | 1,5 | 6,2 |
| KI | 0,75 | - | 0,83 | 0,83 | 0,75 | - |
| $MnSO_4.H_2O$ | 10 | - | - | - | - | - |
| $MnSO_4.4H_2O$ | - | 25 | 22,3 | 22,3 | 7 | 22,3 |
| $MoO_3$ | - | - | - | - | 0,0001 | - |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | - | 0,25 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 2 | 10 | 8,6 | 8,6 | 3 | 8,6 |
| FeEDTA: | | | | | | |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27,8 | 27,8 | 27,8 | 27,8 | - | 27,8 |
| $Na_2EDTA.2H_2O$ | 37,2 | 37,2 | 37,2 | 37,2 | - | 37,2 |
| ORGANICOS | | | | | | |
| Acido fólico | - | 0,5 | - | - | - | 2,0 |
| Acido Indol Acético | - | 0,1 | - | - | - | - |
| Acido nicotínico | 1,0 | 5,0 | - | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Biotina | - | 0,05 | - | - | - | - |
| Glicina | - | 2,0 | - | 2,0 | 3,0 | - |
| Mio-inositol | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Piridoxina.HCl | 1,0 | 0,5 | - | 0,5 | 0,1 | 0,5 |
| Tiamina.HCl | 10,0 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,1 | 1,0 |
| Sacarose (g/l) | 20 | 20 | 30 | 30 | 30 | 20 |

*(1) Gambor et al., 1968; (2) Nitsch & Nitsch, 1969; (3) Linsmaier & Skoog, 1965; (4) Murashige & Skoog, 1962; (5) White, 1963; (6) Wood, 1982.*

que a planta possa utilizar. O carboidrato mais utilizado é a sacarose.

**Reguladores de crescimento ou fito-hormônios**

Basicamente são utilizadas auxinas (AIA, AIB, 2, 4-D) e citocininas (BAP, KIN, 2iP). O desenvolvimento de raízes, brotações e calo em cultura de tecido, é regulado pela presença e pela interação destes dois grupos de substâncias reguladoras de crescimento. Outras substâncias como ABA (ácido abscísico) e $AG_3$ podem também ser incorporadas ao meio de cultura.

**Anti-oxidantes**

Como carvão ativado e ácido ascórbico, são utilizados principalmente para aqueles explantes que produzem compostos fenólicos que são tóxicos a eles.

**Suporte para os explantes**

O mais comumente utilizado é o agar, que quando adicionado ao meio confere consistência semisólida. Outros artifícios podem ser utilizados, como ponte de papel de filtro ou fibra de celulose.

A esterilização do meio de cultura é feita em autoclave, que pode ser horizontal ou vertical, a 120°C de temperatura e pressão de 1 kg/cm² por 15 a 20 minutos.

Vários são os meios de cultura que podem ser utilizados em um laboratório, (Quadro 1) dependendo da melhor e maior adequação para determinada finalidade. Também, dependendo do objetivo da cultura de tecido e da espécie trabalhada, são utilizadas modificações dos meios básicos. No Quadro 1 podem ser vistos os principais meios de cultura desenvolvidos e suas composições (Caldas et al., 1990).

## LITERATURA CITADA

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & Ferreira, M.E. 1990. Meios nutritivos. In: Torres, A.C. & Caldas, L.S. (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília. p 37-70.

CIAT. 1980. El cultivo de meristema de yuca - guía de estudio. CIAT, Cali, Colombia. 40 p. (Série 04SC-02.02).

CIAT. 1982. El cultivo de meristema para el saneamiento de clones de yuca - guía de estudio. CIAT, Cali, Colombia. 45 p. (Série 04SC-02.05).

FORD-LLOYD, B. & JACKSON, M. 1986. Plant genetic resources - an introduction to their conservation and use. Edward Arnold, Londres. 146p.

GAMBOR, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exptl. Cell Res., 50: 151-158.

HANDRO, W. & FLOH, E.I.S. 1990. A organização de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: Torres, A.C. & Caldas, L.S. (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília. p 29-36.

IBPGR. 1983. IBPGR advisory committee on *in vitro* storage report of the first meeting. 16-20 Agosto de 1982. Fort Collins, EE.UU. 11p. (AGPG: IBPGR/82/84).

--------. 1985. IBPGR advisory committee on *in vitro* storage report of the second meeting. 10-12 Setembro de 1984. Leuven, Belgica. 15p. (AGPG: IBPGR/84/133).

--------. 1986a. Desing, planning and operation of *in vitro* genenanks report of a subcommittee. 29-31 Julho de 1985. St. George, Barbados. 17p.

--------. 1986b. IBPGR advisory committee on *in vitro* storage report of the third meeting. 4-6 Junho de 1986. Valencia, Espanha. 33p. (AGPG: IBPGR/86/98).

KRIKORIAN, A.D. & BERQUAM, D.L. 1969. Plant cell and tissue culture: the role of haberlandt. The botanical Review, 35:59-88.

LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 18:100-127.

MOREL, G.M. 1960. Producing virus-free *Cymbidium*. American Orchid Society Bull. 29: 495-497.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473-497.

NITSCH, J.P. & NITSCH, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 163 (3862): 85-87.

STREET, H.E. 1977. Laboratory organization. In: Street, H.E. (ed.). Plant tissue and cellculture. 2ª edição. University of California Press. p 11-30. (Botanical Monographs - volume 11).

TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. 1990. Histórico da cultura de tecidos de plantas. In: Torres, A.C. & Caldas, L.S.

(eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília. pp 15-18.

WHITE, P.R. 1963. A handbook of plant tissue culture. Lancaster, The Jacques Cattell Press.

WITHERS, L.A. 1989. *In vitro* conservation and germplasm utilisation. In: Brown, A.H.D., Frankel, O.H., Marshall, D.R. & Williams, J.T. (eds.). The use of plant genetic resources. Cambridge University Press. pp 309-334.

WITHERS, L.A. & WILLIAMS, J.T. 1986. *In vitro* conservation - IBPGR research highlights. IBPGR, Roma. 21p.

WOOD, D.W. 1982. *In vitro* proliferation of pecan shoots. HortScience, 17 (6): 890-891.

# Conservação de germoplasma *in vitro* - Criopreservação

por Marisa de Goes e Rui Americo Mendes *

## INTRODUÇÃO

A sobrevivência de material vegetal depois de ter sido submetido a temperaturas ultra baixas é um fato constatado a cada chegada da primavera em regiões de clima frio e temperado. No entanto, só no século XX é que foram publicados os primeiros relatos sugerindo possibilidades de uso prático desta característica dos vegetais (Kartha, 1985; Withers, 1987). Nos últimos 20 anos a técnica de congelamento de partes de plantas e células se tornou aceita como forma ideal para a conservação destes materiais, aliada a cultura de tecidos. Durante este período tem havido grande progresso no estudo destas duas áreas e hoje, vários tipos de material vegetal incluindo meristemas e pontas de ápice e raízes, células em cultura, protoplastos, pólem e anteras, embriões somáticos e zigóticos e sementes inteiras de várias espécies, tem sido regenerados com sucesso após congelamento em nitrogênio líquido (NL) por períodos de tempo que variam de algumas horas até alguns anos (Kartha, 1985; Withers, 1987; Goes, 1993).

Apesar da criopreservação ter sido testada preliminarmente em diversas espécies, ainda não existe uma rotina de laboratório que possa garantir a conservação de germoplasma vegetal. Isto se deve a complexidade, tanto técnica como biológica, que envolve os processos de congelamento e des-congelamento dos seres vivos. Além disso, diferentes espécies reagem de maneira diversa a criopreservação, de tal forma que torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam as exigências de cada espécie (Withers e Williams, 1990).

## CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é, em teoria, o método perfeito para a conservação de germoplasma porque consegue reduzir a níveis baixissimos as atividades fisico-quimicas das células, garantindo segurança máxima contra variação genética a longo prazo (Morris, 1980; Henshaw, 1982; Kartha, 1985). Outras vantagens da criopreservação se relacionam com: 1) o pequeno espaço a ser ocupado por um banco de germoplasma mantido em NL, 2) a simplicidade de manuseio das coleções, basta manter o nível de NL nos botijões, reabastecendo a cada 40-60 dias, 3) o baixo custo do processo, Stanwood **et al.** (1986) relatam que custo médio da conservação de uma amostra de sementes de cebola por um período acima de 100 anos e estimado em US$ 1,65/ano quando técnicas convencionais são usadas e somente US$ 0,42/ano usando técnicas de criopreservação.

Pouquíssimos materiais biológicos suportam temperaturas abaixo de zero em seu estado natural, sem a proteção de um produto químico adequado (crioprotetor) ou condicionamento prévio. Os mecanismos de crioproteção são complexos e não completamente conhecidos. Sabe-se que os crioprotetores baixam a temperatura na qual o congelamento ocorre e reduzem a água intracelular mudando o tamanho dos cristais de gelo. Suas propriedades coligativas diminuem a ação do aumento de concentração de eletrólitos resultante da conversão da água em gelo (Nash, 1966; Mazur, 1969). Alta solubilidade e baixa toxidez são características essenciais para o sucesso de um crioprotetor.

---

* *Engenheiros Agrônomos, PhD, Pesquisadores de CENARGEN/EMBRAPA.*

Glicerol foi o primeiro composto quimico a ser usado como crioprotetor (Polge et al., 1949), seguido por dimetil sulfoxido (DMSO) (Lovelock e Bishop, 1959). Nos dias de hoje existe uma grande variedade de compostos sendo usados como crioprotetores, porém glicerol e DMSO continuam entre os mais usados (Morris, 1980; Kartha, 1987).

A maioria dos crioprotetores apresenta certa toxidez em concentrações mais altas. Há diversas formas de contornar o problema, uma delas é fazer misturas de crioprotetores ou mesmo fazer uma pré-cultura do explante em meios nutritivos contendo compostos osmóticos ou a temperaturas mais baixas. Outra opção e reduzir a temperatura de adição do crioprotetor.

São dois os procedimentos mais comuns em criopreservação, o primeiro envolve congelamento ultra-rápido e no outro o congelamento é lento até certa temperatura seguido de ultra-rápido (ver Figura 1).

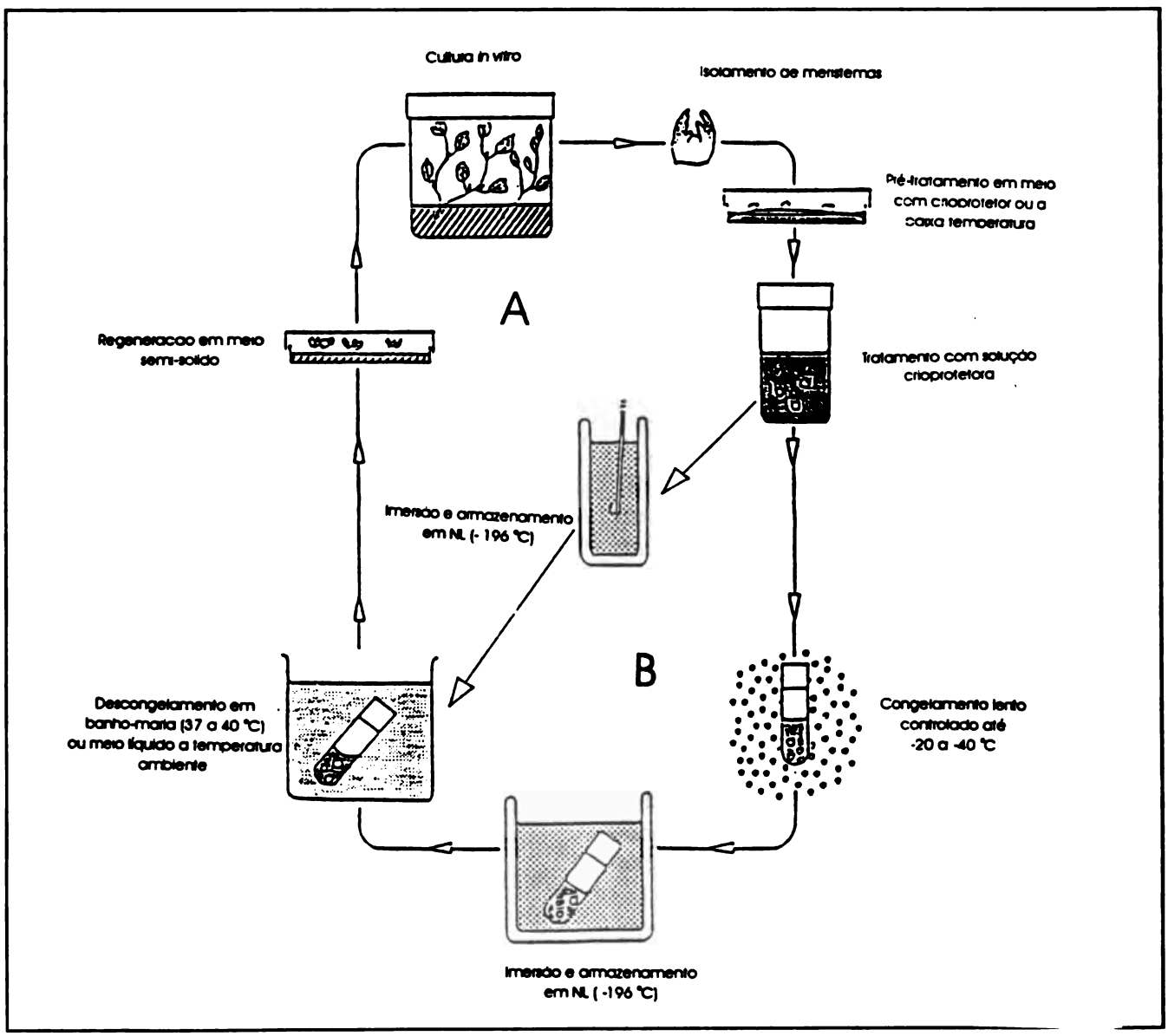



*Figura 1. Criopreservação de meristemas: congelamento ultra-rápido (A) e lento seguida de ultra-rápido (B). (Adaptado de Withers e Williams, 1990).*

O congelamento ultra-rápido foi usado com sucesso pela primeira vez em brotação apical de batata por Grout e Henshaw (1978), os explantes eram colocados na ponta de agulhas hipodérmicas e introduzidos diretamente em nitrogênio líquido. Este método consiste basicamente em evitar, pela rapidez, o desenvolvimento de cristais de gelo intracelulares, os quais são responsáveis pela ruptura da parede celular e conseqüente morte dos explantes. A grande vantagem deste método é a simplicidade. O congelamento ultra-rápido foi experimentado por vários anos em outras espécies sem grande êxito; porém recentemente foi adaptado com sucesso na vitrificação.

A vitrificação vem se destacando como o mais promissor dos métodos de criopreservação desenvolvidos até agora (Bourtron e Mehel, 1990). A diferença entre vitrificação e congelamento ultra-rápido é que no primeiro método o explante passa por um pré-tratamento antes da imersão em NL; o qual consiste basicamente em desidratar o explante com misturas de crioprotetores em altas concentrações, de modo que durante o congelamento ocorre uma vitrificação do material e não uma cristalização de água como acontece em métodos mais lentos (Armitage e Rich, 1990). Apesar de ser extremamente simples, na prática o método ainda apresenta problemas a serem superados. Se por um lado o uso de altas doses de crioprotetores assegura a resistência do material ao congelamento, por outro, provoca reações tóxicas no mesmo, baixando a taxa de sobrevivência após o congelamento. Um exemplo de sucesso na vitrificação são os resultados publicados por Towill e Jarret em 1992, quando obtiveram 64 por cento de sobrevivência de ápices de batata doce tratados com uma solução de 30 por cento (v/v) de glicerol, 15 por cento de etileno glicol e 15 por cento (v/v) de DMSO adicionada gradualmente durante uma hora.

O congelamento gradual seguido de imersão rápida em NL tem sido largamente usado para muitas espécies e vários tipos de explante com relativo sucesso. Como já foi dito, a técnica tem dois estágios bem definidos: o primeiro envolve o congelamento gradual controlado até uma temperatura crítica entre -20 a -45°C, com a velocidade de congelamento variando entre 0,5 e 2°C por minuto. A formação do gelo é extracelular, a água se move gradualmente devido ao gradiente de pressão do vapor entre a água intracelular e os cristais de gelo extracelular, isto ocorre desde que as células tenham permeabilidade suficiente para tanto. Nestas condições a formação de gelo intracelular, que seria responsável pelas crioinjurias é mínima. O segundo estágio é o congelamento ultra-rápido que normalmente consiste em mergulhar o explante, já congelado diretamente em NL a -196°C (Meryman et al., 1977; Withers, 1980 e Kartha, 1985).

A conservação de explantes congelados é feita a baixas temperaturas para prevenir gelo de recristalização, deve ser abaixo de -120°C, mas o ideal é que seja feita em NL (-196°C) ou em se vapor (150°C) (Withers, 1987).

O descongelamento é tão crítico quanto todas as fases anteriores pelo risco de recristalização da água em cristais grandes, o que causaria a ruptura das células. A forma mais indicada é o aquecimento ultra-rápido, introduzindo os explantes em banho-maria a 37°C ou então em meio de cultura à temperatura ambiente.

A eficácia do método de congelamento pode ser medida pelo uso de testes de viabilidade como o de tetrazolio (TTZ) ou o de diacetato de fluoresceina (FDA), ou pela regeneração dos explantes em meio de cultura. O ideal é fazer tanto o teste de viabilidade como a recuperação dos explantes pois desta forma pode-se constatar também a eficiência do método de regeneração.

O procedimento para regeneração dos explantes varia de acordo com o tipo de material, mas geralmente é necessário um meio de cultura especial e condições ambientais controladas adequadas para cada espécie.

## CONCLUSÃO

Por hora a criopreservação deve ser vista como uma técnica com grande potencial para a conservação de recursos genéticos. Muita pesquisa ainda tem que ser feita tanto na busca de um aperfeiçoamento dos

métodos já existentes, como na busca de novos métodos que se adaptem as necessidades das diferentes espécies a serem conservadas. Só então a criopreservação poderá ser usada na rotina de laboratórios de conservação de coleções de base de germoplasma.

## LITERATURA CITADA

ARMITAGE, W.J. & RICH, S.J. 1990. Vitrification of organized tissues. Cryobiol., 27: 483-491.

BOURTRON, P. & MEHEL, P. 1990. Theoretical prediction of devitrification tendensy: determination of critical warming rates without using finite expantions. Cryobiol., 27: 359-277.

GOES, M. 1993. Studies on the conservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) germplasm. Bath: Universidade de Bath, UK. Tese de PhD.

GROUT, B.W.W. & HENSHAW, G.G. 1978. Freeze preservation of potato shoot-tip cultures. Ann. Bot., 42: 1227-1229.

HENSHAW, G.G. 1982. Tissue culture methods and germplasm storage. In: Proceedings of the 5th. international congress of plant tissue and cells culture. pp. 789-792. IAPTC.

KARTHA, K. K. 1985. Meristem culture and germplasm preservation. In: Cryopreservation of plant cells and organs. Kartha, K.K (ed.). pp. 115-134. Boca Raton: CRS Press.

--------. 1987. Advances in the cryopreservation technology of plant cells and organs. In: Plant tissue and cell culture. Thorpe T.A. (ed.) pp. 447-458. Alan R. Liss, Inc.

LOVELOCK, J.E. & BISHOP, M.W.H. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimetyl sulfoxide. Nature (London), 183: 1394.

MAZUR, P. 1969. Feezing injury in plants. Ann. Rev. Pl. 20: 419-448.

MERYMAN, V.H.; WILLIAMS, R.J. & DOUGLAS, J. St. J. 1977. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. Cryobiol., 14: 287-302.

MORRIS, G.J. 1980. Plant cells. In: Plant cells and low temperature preservation in medicine and biology. Ashwood, M.J. & Farrant, J. (eds.) pp. 253-284. Kent: Pitman Medical.

NASH, T. 1966. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: Cryobiology. Meryman, H.T. (ed.) London: Academic Press.

POLGE, C.; SMITH, A.U. & PARKER, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature, 184: 666.

STANWOOD, P.C.; ROOS, E.E. & TOWILL, L.E. 1986. Cryopreservation of plant germplasm: a pilot research project. Plant Gen. Res. Newslett., 65: 18-19.

TOWILL, L.E. & JARRET, R.L. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) shoot-tips by vitrification. Plan Cell Rep., 11: 175-178.

WITHERS, L.A. 1980. Preservation of germplasm. In: International review of cytology. Supplement 11B. J. Miflin (ed.) p. 101-136. Oxford University Press.

--------. 1987. Long-term preservation *in vitro*: present state of research and its application. In: Crop genetic resources: conservation & evaluation. Holden, J.H. & Williams, J.T. (eds.) p. 121-145. London: Allem & Unwin.

-------- & WILLIAMS, J.T. 1990. Germplasm conservation *in vitro* and cryopreservation. In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Torres, A.C. & Caldas, L.S. (eds.) p. 267-286. Brasilia:IAPTC/EMBRAPA-CNPH.

# Genebank management

por Jane Toll *

## INTRODUCTION

The linking of environment and development issues and the call for the conservation and sustainable use of biological diversity, that are embodied in the Convention on Biological Diversity and Agenda 21, have lead to a broadening of view as to what plant genetic resources should be conserved by whom, for whom and how. Countries are required to develop strategies, plans and programmes for the conservation and sustainable use of biological diversity, incorporate these in their overall development agendas and develop the capacity to manage and utilise the resources. As a consequence, national plant genetic resources programmes are expanding in number and scope, and although the Convention views the "in situ" approach as primary and "ex situ" conservation as complementary, the number and variety of "ex situ" genebanks is also set to increase because of their special value in the conservation of plant genetic resources for food and agriculture, by providing a readily accessible source of genetic diversity for use in crop improvement programmes and relatively secure long-term conservation.

What do these developments mean for genebanks, their management and design?. "Ex situ" conservation and the operations of genebanks are coming under increasing scrutiny as "in situ" approaches gain attention. Greater attention must be paid to effectiveness and efficiency in genebanks operation and at the same time to a broadening of scope in order to link with "in situ" conservation and farming communities. The design and management of genebanks must be tailored to local conditions for efficiency of operation. No one model of a genebank will suit all situations. In many developing countries where financial and human resources are often limited, low cost methodologies and efficient management procedures are critical to a genebank's sustainability.

Genebanks conserve genetic resources "ex situ" and make them available to users. The nature of the resources conserved and how they are maintained depends on the objectives of the genebank, its responsibilities, policies and users. A genebank may have an institutional, national or international mandate and store material as seed, whole plants in the field or as tissue cultures "in vitro". It may be conserving genetic resources for use today and tomorrow, or may additionally have a more long-term insurance conservation mandate. Implications of policy, objectives and the material held, on the management and design of the genebank, are discussed later. First the paper explores the scientific and practical factors underlying the effectiveness of genebank operations. Comments relate primarily to seed banks, but the concepts may also apply to "in vitro" and field genebanks.

## GENEBANK FUNCTIONS

The principal functions of a genebank are the acquisition of germplasm through collecting expeditions or by introduction or exchange from other institutions; its conservation, including the preparation of material for storage, monitoring in storage and regeneration when needed; the distribution of samples to users; study of the conserved resources, their characterization and preliminary evaluation; and the documentation o

* *M. Sc. Birminghan University, England. IBPGR. Head Quarter, Germplasm Management Germplasm Maintenance and use Group.*

characterization, evaluation and management of the accessions in the genebank.

A genebank may have additional functions associated with responsibilities at national and international level. It may have additional research activities such as cataloging national biodiversity, germplasm enhancement and technology development, and duties such as plant quarantine. As a lead institute in the national programme, it may be involved in administrative and policy responsibilities such as setting priorities and legislation for germplasm acquisition and exchange, coordinating activities across the national programme and participating in international networks and activities.

## CONSERVATION

The central function of a genebank is the conservation of the individual accessions. It comprises a number of steps from receipt and registration of accessions; their preparation for storage including threshing, cleaning, health inspection, drying, viability testing, measuring quantity and packaging; their storage and the monitoring of viability and quantity in storage; and their regeneration when required. These conservation procedures are sequential, interdependent and governed by scientific principles. The accessions pass through the procedures in a systemmatic step-wise manner. Successive procedures depend on the results from the preceding step, for example regeneration proceeds according to the results from monitoring sample viability and quantity.

The principles governing the conservation procedures are maintenance of the viability, vigour and genetic integrity of the accession in order to keep the seeds alive and capable of growing into plants and to retain as far as possible the genetic character of the original sample. Maintaining high sample viability, vigour and genetic integrity depends on how the samples are processed for storage, the conditions of storage, the frequency and methods by which it is regenerated and the initial quality of the seed on receipt at the genebank.

Most arable and forage crops have seeds which naturally undergo a drying phase at maturity. The seeds are tolerant of desiccation and their life spans can be extended by drying to low moisture content and storage a low temperature. Seeds of this type are termed orthodox and the comments in this paper relate to the management of the conservation of orthodox species. Seed viability and vigour is controlled by intrinsic genetical, biochemical and physiological characteristics and influenced by external factors of temperature and humidity, and also by the presence of pathogens. Seeds of different species and composition, particularly in oil content, have different longevities. However, for all species the rate of loss of viability and vigour increases as viability decreases and a small decline in initial viability results in a significant reduction in storage life. Although lowering temperature and humidity will extend seed storage life, seed ages and seed death eventually occurs. Genotype differences in seed survival give rise to different storage lives among samples of the same species and among individual seeds within a sample. As viability drops and individual seeds die off, the genetic integrity of the sample declines.

In order too minimise the loss of sample viability, vigour and genetic integrity during conservation, the seed must be of high initial viability and vigour, free of diseases and pests, and this high quality must be maintained during storage. It is important that seed vigour as well as viability is kept high since plant emergence in the field can often be much lower than laboratory germination percentage and this will have significant consequences for the genetic integrity of samples on growing out.

### Control of initial seed quality

The initial quality of the seed is affected by the climate, incidence of pests and diseases, growing conditions of the plants in the field and maturity stage at harvest. Small, diseased or immature seed has poor viability and vigour. Recent research indicates that the optimum harvest stage is 10 to 15 days after physiological maturity. Other causes of poor quality are mechanical damage to the seed during harvesting

and threshing, and prolonged exposure to unfavourable climatic conditions after harvest and between the field and genebank. The higher the temperature and humidity, the more rapid the decline in viability. Therefore, samples must be quickly transferred from the field to facilities for drying.

Once at the genebank, retention of high initial seed quality is favoured by the rapid processing of the samples and the use of appropriate drying methods of low humidity and moderate temperature (10-12% RH and 20°C is recommended). On arrival at the genebank, the longer the seed stays at less than optimal moisture content and temperature, the greater the loss of initial viability and therefore, the shorter the storage life. For this reason, the samples should be cleaned, tested and dried as quickly as possible. If there are or have to be interruptions in the passage of samples through the different processing procedures (cleaning, testing, drying, etc.), then the temporary storage should be at favourable humidity and temperature; low %RH and low °C.

Investigation of growing and handling procedures that optimise the quality of the seed produced for storage, has received little attention in comparison to the research effort on the improvement of techniques in the genebank for drying and storing samples. Yet, since just a very small drop in initial viability can reduce storage life up to 50%, lack of attention to the condition of material prior arrival at the genebank jeopardises the expense and efforts of storage. Furthermore, there has been little attention paid to the management of the field to genebank part of the conservation process. In countries where ambient temperatures and humidities are high, procedures should be in place to either dry the samples on site, at the regeneration field or during collection, or quickly transfer them to a location for immediate drying.

## Control of viability, vigour and genetic integrity during storage

Maintaining high sample viability and vigour during storage depends on the storage environment and the frequency of regeneration. Reducing humidity and temperature increases storage life and the current recommended standards for long-term storage are 3-7% seed moisture content, depending on species, at -18°C or lower. The relative benefits to seed longevity of reducing moisture as compared to lowering temperature, differ, becoming greater for successive reductions in moisture, but less as temperature is reduced. For this reason, it is logical to maximise the benefit to longevity of desiccation, by drying seed to low moisture level and keeping it dry in hermetic packaging, thereby diminishing the need for cooling. The storage period chosen and option selected to either reduce seed moisture content and or temperature, will depend on the genebank's operating situation (climate, equipment, electricity costs, ...) and will be a balance between what is desirable and what is feasible.

Even under optimum storage conditions, seeds age, viability declines and along with it, the samples loose genetic integrity. Therefore the viability of the stored samples must be regularly checked and the samples regenerated when it begins to drop. Since the lower that viability falls the more rapid its decline and greater the genetic change in the sample as mutations accumulate exponentially and seeds die, it is important that the sample is regenerated before viability drops far. The recommended threshold for regeneration is 85% of the initial sample viability. In practice, the thresholds applied will be set according to the storage behaviour of the species (oily seeds are poor storers), the significance of the sample (its uniqueness and genetic structure), the conditions of storage and practical considerations of workload and funding. The monitoring period and frequency of regeneration required to prevent sample viability dropping below the permitted threshold is dependent on the storage behaviour of the species, initial viability of the sample, temperature and humidity of storage. Furthermore, since there can be appreciable genotype difference in the rate of viability loss, each individual accession should be monitored.

The regular germination tests carried out to monitor accession viability during storage, use up the supply of seed. Non-destructive techniques for viability testing are being researched. The sequential germination

testing method can minimise the seed needed for the tests and is routinely used in several genebanks.

## REGENERATION

The importance of maintaining viability as high as possible to limit accumulation of mutations in the seeds and genetic changes (genetic drift) within the samples, has already been stressed. However, when viability does decline below the permissible threshold or when the stock of seed becomes low, the sample has to grown out.

Regeneration carries with it a number of risks to the genetic integrity of the sample. Pests, diseases, other natural selection pressures and genotype competition cause selective death or poor growth of plants and thus result in changes to the genetic composition of the sample, termed genetic shift. Reduction of these effects can be managed by providing optimum growing conditions with protection against biotic and abiotic stresses. There is also the risk of loss or mixing of samples during planting and harvesting, and in the case of allogamous species, some type of barrier is required to prevent genetic contamination of samples from cross pollination.

In taking a subsample for regeneration, there is a narrowing and bias in the genetic composition of the subsample in relation to the original population, since there will be some loss of alleles and changes in gene frequencies. These effects, termed genetic drift, cannot be completely avoided, but can be minimised by making the sample for regeneration as large as possible and using pollination methods that optimise the effective size of the population. There are practical constraints to maximising sample size, but the heterogeneity, uniqueness, and breeding system of the accession should be taken into consideration when deciding the number of plants to use. Out-breeding species, original collections that have never been multiplied and heterogenous accessions of wild species and landraces, require maximum plant numbers in the regeneration cycle and optimum growing conditions.

The frequency of regeneration must be managed to keep it to a minimum because of the risks of genetic shift, drift and contamination which are compounded with each generation. Furthermore, it is a costly process. However, the regeneration interval is determined not only by the sample's longevity in storage, but also by the quantity of seed held and demands on it for distribution to user, study and testing. When the sample stock falls below a permissible level, the sample must be regenerated. This level and the minimum quantity stored, will depend on the genetic character of the sample and the demand on the sample. Heterogeneous samples are held in greater seed number to be genetically representative of the original population.

Popular accessions will have a regeneration frequency according to the need to replenish seed stocks rather than to rejuvenate their viability. The regeneration of "active" collections, which are used for distribution and study, is usually managed according to the needs for replenishing seed stocks.

## MANAGEMENT DOCUMENTATION

Maintenance of sample viability, vigour, seed quantity and genetic integrity throughout the conservation process depends not only on meeting accepted standards in the individual procedures, but also on the systemmatic and timely passage of the samples trough the sequence of procedures from introduction or regeneration to storage and their maintenance in storage. Interruptions in the handling of the accessions in transit to the genebank and during processing, storage and regeneration, which exposure them to suboptimal conditions or delay regeneration for example, con give rise to significant loss of viability and genetic identity. There must, therefore, be management control over the passage of accessions through the sequence of procedures. The procedures are interdependent and the control over the individual accessions is provided by the information generated by each procedure in the sequence with the outputs of the preceding procedure necessary for the execution of the subsequent step. For example when to regenerate a sample depends on the results from the monitoring of sample viability and quantity.

of sample viability and quantity.

For this management control of over the sequence of procedures, it is important to document the flow of information generated and used by the individual steps. Data with management importance are: sample viability, sample size, date of storage, date of regeneration, etc., and these descriptors should form a specific file or descriptor set within the documentation system as an inventory or management file.

## CONSERVATION OBJECTIVES AND POLICY

The first part of the paper examined the scientific and practical factors underlying the conservation of germplasm accessions in a genebank. This second section will discuss the implications of conservation objectives and policies and the nature of the material conserved, on genetic resources' management in general and genebank management in particular.

Decisions on what genetic resources should be conserved, how they should be maintained and for what purpose or whose use, determine the conservation approach and method, type of genebank, germplasm held, study and documentation, and in turn, the scale and scope of germplasm management.

### Breeders' needs

Many genebanks have a focus on crop genetic resources; they have evolved alongside formal plant breeding programmes with breeders as the primary users. Decisions on the type of samples to be held, the conservation methods employed, studies undertaken and information maintained, are biased to meeting the needs of breeders. Typically, these genebanks hold landraces and old cultivars, some advanced cultivars and breeding lines, and sometimes wild species related to crops. The genebank may be part of a specific research institute working on food crops, forestry, industrial crops, etc., or it may have a national mandate and encompass the conservation of a range of plant groups. The studies carried out on the germplasm principally focus on the description and documentation of features of individual accessions which have potential interest in plant improvement, so that the material is more easily selected by the breeder. This characterization is often undertaken in conjunction with the breeder. Distribution of the germplasm is also targeted to the breeders.

### Farmers' needs

The integration of environmental and developmental concerns and the call for the conservation and sustainable use of genetic resources in the Convention on Biological Diversity and Agenda 21, has broadened perspectives on what should be conserved, for whom and by whom. Farmers are considered as both users and conservers and genetic resources programmes must expand their conservation and use strategies accordingly. This necessitates attention to the inclusion of "in situ" on-farm conservation and the conservation of germplasm in a form that is more readily usable to farmers, ie.as landraces, adapted genotypes, adaptive gene complexes, documented with local knowledge and evaluated according to farmers' needs, preferably together with them.

### Conservation and use

The Convention and Agenda 21 call on conservation for use now in development, giving emphasis to a conservation for use link. "Ex situ" conservation in genebanks has been criticised in the past for being a museum of diversity poorly linked to use. On-farm conservation provides the strongest of linkages with the diversity conserved through use by the farmers. However, the need for longterm conservation as an insurance against unforeseen future needs, remains valid. For this, "ex situ" conservation has a key role since it provides relatively safe and secure conditions, for orthodox seed and some "in vitro" cultures, with the germplasm protected against loss and genetic change in the field.

### National and global responsibilities

The Convention and Agenda 21 see the conservation and sustainable use of genetic resources as primarily a national responsibility, but recognising that it is a common concern of humankind. Countries are granted sovereignty over their biological resources and the authority to determine access to them. The Convention envisages that access to the resources and the sharing of benefits derived from their use, will be managed through a bilateral arrangement between the donor and the recipient of the resources. It does, however, recognise the need for international cooperation and the role of international organisations in the aspects of mutual interest or in cases of resources falling outside of national jurisdiction.

In the case of plant genetic resources for food and agriculture, there are particularly strong arguments for international cooperation in their conservation and use. It is the responsibility of all to alleviate poverty for which access to a wide range of genetic diversity is a prerequisite for increasing productivity thereby increasing agricultural growth, economic growth and development. Consequently, it is in the global interest to maintain as much diversity as possible as insurance and a pool of resources for possible future needs, despite there being no immediate incentive or benefit to conserve the resource. Perhaps one of the most powerful arguments is the interdependence of countries on genetic resources. No country is self sufficient. North America is completely dependent upon species originating in other regions. Africa relies on other parts of the world for 87% of its plant genetic resources needs. Finally, existing "ex situ" collections, including those held internationally, fall outside of the Convention. An international system will allow access to these collections.

## MANAGEMENT STRATEGIES: DECISIONS AND OPTIONS

It is against the background of national policy on the issues outlined above, that the genebank manager has to organise and manage the germplasm collections to meet the objectives in the most effective and economical manner under taking account of the local operating conditions. Some management strategies, and the decisions and possible options facing managers, are explored here, but it is an area that requires more study. There has been a tendency to have one model of a genebank and one approach to the management of germplasm collections. With more and more varied national programmes and genebanks being established, it is crucial that management strategies are accordingly tailored to specific objectives and policies.

### Complementary conservation strategies

Different conservation methods fulfill different needs. "in situ" approaches allow for continued evolution of the resources and easy access for exploitation and use by local communities. "Ex situ" methodologies provide more secure but less dynamic conservation with easier access to the resources for use in plant breeding. The different "ex situ" technologies for seeds, "in vitro" cultures, pollen, whole plants, have differing but complementary advantages in terms of utility, practicality, economics and security. An efficient conservation strategy for a particular genepool will integrate the different methods according to their complementarity. This has particular relevance for the conservation of problem species, such as those with no or short-lived seeds and vegetatively propagated crops. The conservation in the field which is risky and costly, of the limited number of clones or phenotypes needed for use, can be complemented by and integrated with the conservation of accessions needed only on the longterm, in a more secure seed or "in vitro" culture form.

### Options on storage period and conditions

Matching storage conditions to required storage life has practical and economic benefits. If conservation is for the longterm, then optimum storage conditions must be applied. However, if for regeneration of other reasons maximum storage life is not the aim, but some shorter period, then the conditions of storage can be relaxed to correspond to the period desired.

Different combinations of temperature and seed moisture content give the same storage period. For example for barley, 20 years predicted storage with a

benefits to seed longevity of reducing moisture content, relative to temperature, can be maximised by drying the seed to very low moisture level and packing it hermetically, thereby diminishing the need for cooling, al least for medium-term storage. The conditions chosen, either to reduce seed moisture content and/or temperature, will depend on the local situation, the climate, equipment, electricity costs, and will be a balance between what is desirable and what es feasible.

### Active base concept

When the regeneration interval is set according to needs to replenish seed stock then the conditions of storage can be less rigorous and costly and set to give the storage period that corresponds to the regeneration interval. This strategy applies the base active concept where the collections are divided on a functional basis. The active collection serves seed requirements for distribution, study, etc. and is regenerated to meet these seed supply needs. The base collection is for longterm insurance conservation and drawn on only when the active collection needs replenishment and thus it is regenerated only when viability declines or seed is needed for the active collection. This strategy can help reduce genetic change from too frequent regeneration. To avoid the active collection drifting too far from the base, it is necessary to periodically use seed from the base collection to regenerate the active collection. This is recommended every 2 or 3 cycles. Accessions need only be represented in the active collection if their seed is in demand and their regeneration undertaken to meet supply needs.

### Ensuring the quality of germplasm holdings

The issue of quantity versus quality of the germplasm accessions held is central to the managers decisions and to the economy of the genebank operation. The greater the volume of material maintained, the larger must be the physical facilities, network of stations for regeneration and characterisation, staff and operational budget. Handling a wide range of species requires a correspondingly wide range of specialist know-how, equipment and specific procedures. It may be practical to organise the genebank into different sections for handling different groups of species.

Different types of germplasm demand different strategies and methods of maintenance. Wild species and landraces are sources of greatest diversity and necessitate rigorous procedures and optimum conditions for storage (longterm) and regeneration. Locally developed cultivars, current or obsolete, warrant long-term conservation since they may not be held elsewhere, but there are strong economic arguments against adopting the same strategy for introduced advanced cultivars which are easily available elsewhere. Original samples collected in the field by the genebank are unique, unknown and not conserved elsewhere, and therefore command stringent maintenance procedures, comprehensive study and duplication in another genebank.

Genebank managers, therefore, need to know the uniqueness of an accession, the amount of variation in a collection and the location of desirable genes or gene complexes. They need tools by which to assess these measures of quality. It may be possible from the passport data or easily determined by characterisation of morphological features. It may however, require the use of gene markers. It is particularly important to be able to identify duplicates in the case of problem species such as vegetatively propagated species which must be held in costly field genebanks.

# Curadores e curadorias no CENARGEN

por Antonio Carlos Guedes *

Curadores de germoplasma de produtos são pesquisadores do CENARGEN, designados pelo Chefe do Centro, com atribuições de assessoramento à Chefia Técnica, em relação ao germoplasma considerado relevante para a agricultura e pecuária nacionais. Atuam a nível nacional e internacional em assuntos relativos ao enriquecimento, conhecimento e conservação do germoplasma dos produtos objeto da curadoria, contando com o suporte da estrutura de suas áreas técnicas para estas atividades.

A função de curador no CENARGEN data do início das atividades da Unidade quando os pesquisadores foram sendo convidados e designados para assumir a responsabilidade interna sobre o germoplasma de um ou mais produtos. Como não havia definição oficial da função os curadores eram designados a medida que as necessidades apareciam sendo alguns curadores encarregados por produtos e outros por grupos de produtos, ocasionando um desbalanço entre as diferentes curadorias em relação ao volume de trabalho e também à demanda. Reconhecendo a importância do papel do curador para a Empresa e para a agricultura nacional, a Diretoria Executiva da EMBRAPA baseada em estudo apresentado pelo CENARGEN resolveu em 07/06/93, através da deliberação nº028, oficializar o **Sistema de Curadoria de Germoplasma**, com a finalidade de definir e sistematizar todas as atividades técnicas e administrativas indispensáveis ao manejo, conservação e uso de germoplasma, no âmbito da Empresa e no contexto do Programa de Recursos Genéticos, atendendo assim as necessidades de:

a) Definição de procedimentos pertinentes ao manejo, uso e conservação de germoplasma.

b) Indicação oficial de responsáveis permanentes pelas atividades relacionadas ao manejo, uso e conservação de germoplasma de produto ou grupo de produtos;

c) Uma estrutura adequada para que as ações citadas em **a** e **b**, pudessem acontecer na EMBRAPA e nas instituições integrantes do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária - SNPA.

A estrutura organizacional do Sistema de Curadoria ficou então, assim definida.

## COORDENAÇÃO INSTITUCIONAL: EMBRAPA/ CENARGEN

### Organização

- Gerência do Sistema (Gerente).
- Curadorias de Germoplasma de Grupo de Produtos (Curadores de Produtos e Curadores Adjuntos de Produto).
- Curadorias de Bancos de Germoplasma de Produtos (Curadores de Banco).
- Curadores "Ad hoc".

A deliberação definiu também que as curadorias seriam ocupadas por "Curadores de Germoplasma de Produto", baseados no CENARGEN e designados pelo Chefe da Unidade e que os curadores de Banco

* *Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisador, Gerente de Curadorias, CENARGEN/EMBRAPA, Brasília, Brasil.*

seriam pesquisadores ou técnicos basedos na Unidade onde se encontra o Banco de Germoplasma do Produto e designados para a função pelo Chefe da Unidade respectiva. A Gerência do Sistema ficou no CENARGEN e será exercida por um pesquisador da Unidade.

As atribuições delegadas a cada um dos participantes do Sistema também foi definida na deliberação, da seguinte forma:

***Ao gerente do sistema caberá:***

- Coordenar todos os assuntos e ações relacionadas ao manejo, conservação e uso de germoplasma.
- Coordenar a Base de Dados de Recursos Genéticos, responsabilizando-se pela qualidade dos dados e pela sua atualização.

***Aos curadores de germoplasma de produto caberá:***

- Coletar e manter informações sobre a disponibilidade de germoplasma e sugerir a ampliação de sua variabilidade genética.
- Promover, acionar e acompanhar as atividades relativas à introdução, intercâmbio, quarentena, coleta, caracterização, avaliação, multiplicação, conservação "in-situ" e "ex-situ" e regeneração de germoplasma.
- Providenciar a identificação e codificação de acessos de germoplasma.
- Promover a elaboração e atualização de inventários de germoplasma existentes no país e, quando necessário, no exterior.
- Promover a elaboração e/ou aplicação de manuais de descritores e catálogos de germoplasma.
- Assessorar as entidades integrantes do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária-SNPA e outras instituições, na organização e manejo de bancos ativos de germoplasma.
- Promover a capacitação de pessoal, quanto ao manejo, conservação e uso de germoplasma.
- Assessorar a Chefia Adjunta Técnica do CENARGEN e das demais Unidades Descentralizadas da EMBRAPA e de outras instituições, nos assuntos relativos ao germoplasma de determinado produto ou grupo de produtos.
- Manter estreito intercâmbio técnico com os Curadores dos Bancos de Germoplasma de Produto ou Grupo de Produtos.

***Aos curadores de Bancos de Germoplasma de Produto ou de grupo de produtos caberá:***

- Zelar pela preservação das coleções de base de plantas perenes, ou de germoplasma animal, ou de germoplasma de microorganismos.
- Zelar pela manutenção das coleções de plantas anuais.
- Coletar e manter informações sobre a disponibilidade do germoplasma do Banco e sugerir a ampliação de sua variabilidade genética.
- Fazer ou promover a multiplicação e/ou regeneração, avaliação e caracterização do germoplasma do Banco.
- Elaborar, em conjunto com o correspondente Curador de Germoplasma de Produto ou do Grupo de Produtos do CENARGEN, manual de descritores e catálogos de germoplasma do Banco, mantendo com o mesmo estreito intercâmbio técnico.
- Proceder a aplicação dos descritores para o germoplasma do produto.
- Promover e colaborar com o CENARGEN na capacitação de pessoal, em distintos aspectos do manejo, conservação e uso do germoplasma.

- Assessorar a Chefia de sua Unidade ou Instituição, nos assuntos relativos ao Banco de Germoplasma sob sua responsabilidade.
- Manter disponível o germoplasma para intercâmbio e para melhoramento.
- Enviar, sempre que for o caso, os acessos do germoplasma multiplicado e/ou regenerado, para a coleção de base, localizada no CENARGEN, visando sua preservação a longo prazo.
- Alimentar a Base de Dados de Recursos Genéticos (SIRG) com os dados coletados do germoplasma.

***Aos curadores "Ad hoc" caberá:***

- Atuar, a pedido dos curadores e a convite do Chefe do CENARGEN, como especialista e conselheiro técnico do Curador de Germoplasma ou do Curador do Banco de Germoplasma do Produto.

Obs.: O Curador "Ad hoc" de produto deverá ser um cientista, com ou sem vínculo de emprego com a EMBRAPA, de notório conhecimento do produto.

As curadorias atualmente definidas são um número de 21 e tiveram designados para ocupá-las como curadores os seguintes pesquisadores do CENARGEN:

Arthur da Silva Mariante - **Animais dom. de grande porte.**

Silvia T.J. Ribeiro - **Animais dom. de pequeno porte.**

Clara O. Goedert - **Cereais de inverno.**

José Ronaldo Magalhães - **Cereais de verão.**

Terezinha A.B. Dias - **Corantes e condimentares.**

José Nelson da Fonseca - **Estimulantes e adoçantes.**

Antônio R. de Miranda - **Fibrosas.**

José Alves da Silva - **Florestais nativas e exóticas.**

Eduardo Alberto Vilela Morales - **Fruteiras de clima temperado.**

Francisco R. Ferreira - **Fruteiras de clima tropical e sub tropical.**

José F.M. Valls - **Gramíneas forrageiras.**

Antônio Carlos Guedes - **Hortaliças.**

Afonso Celso Candeira Valois - **Laticíferas.**

Maria Magaly Velloso da Silva Wetzel - **Leguminosas de grão.**

Lidio Coradin - **Leguminosas forrageiras.**

Roberto Fontes Vieira - **Medicinais, aromáticas e inseticidas.**

João Batista T. da Silva - **Microrganismos.**

Euclides Kornelius - **Oleaginosas.**

Luciano de Bem Bianchetti - **Ornamentais.**

Eduardo Lleras Perez - **Palmeiras.**

Ivo Sias Costa - **Raízes e tubérculos.**

A partir de 1º de agosto de 1994 os Pesquisadores: Marco Aurélio Althoff e Marta Camargo de Assis, substituiram os curadores colegas Maria Magaly Velloso da Silva Wetzel e Luciano de Bem Bianchetti nas suas respectivas curadorias, em virtude da incorporação destes ao programa de pós-graduação.

Para ocupar a Gerência do Sistema foi designado em 05-08-93 o curador Euclides Kornelius que em 06-09-94 foi substituido pelo curador Antônio Carlos Guedes que permanece na função até esta data (Out/94).

# Medidas legislativas no controle de doenças de plantas. Quarentena vegetal

por José Nelson Lemos Fonseca *

## PRINCIPAIS OBJETIVOS

- Proteger o meio ambiente e a agricultura regional, nacional ou mesmo continental de danos causados por organismos introduzidos inadvertidamente pelo homem na maioria das vezes.
- Retardar tanto quanto possível a introdução dessas praças e doenças exóticas.

## JUSTIFICATIVA PARA QUARENTENA

- Prevenir a introdução e disseminação de organismos nocivos em novas áreas.
- Justifica-se ainda mais, se o organismo tem pouca ou nenhuma chance de disseminação natural. (Nematoides).
- Mais efetiva quando o hospedeiro, ou material inerte (solo embalagem, etc.) podem atuar como transportadores das formas ativas ou de sobrevivência dos organismos (semente, nematoide cisto).

## QUARENTENA VEGETAL COMO MEDIDA DE CONTROLE

Contrôle prevenir ou reduzir infecção.

Principais categorias de controle:

1. Evitar. 2. Exclusão. 3. Resistência. 4. Erradicação. 5. Proteção e 6. Terapia.

Quarentena para germoplasma normalmente são utilizadas duas formas de contrôle: exclusão e erradicação. (Figura 1)

Exclusão: a entrada do organismo é prevenida pelos métodos de inspeção e tratamento; ou ainda o produto é proibido ou restrito pela legislação.

Erradicação: o germoplasma infectado é incinerado ou submetido o tratamento ou terapia.

## PRINCÍPIOS NOS REGULAMENTOS DE QUARENTENA

Em resumo para a maioria dos países, os regulamentos de quarentena tem os seguintes itens em comum:

1. Especificação de proibições.
2. Exceções as proibições quando para fins de pesquisa.
3. Necessidade de permissão de importação.
4. Necessidade de Certificado Fitossanitário e/ou Certificado de Origem.
5. Prescrição de inspeção na chegada.
6. Prescrição de tratamento para eliminação de algum risco potencial.
7. Prescrição de quarentena, quarentena de pós-entrada, isolamento, ou outras medidas de segurança.

## PERMISSÃO DE IMPORTAÇÃO

Embora alguns melhoristas encaram a "Permissão de Importação" como mais um impedimento

---

* *Versão em português, resumida e adaptada do trabalho de Hewitt, W.B.; Chiapappa, L. Plant health and quarantine in International transfer of genetic resources. Cleveland: CRC Press. Cap. 25. P. 289-307 (resumo em português dos principais tópicos)*

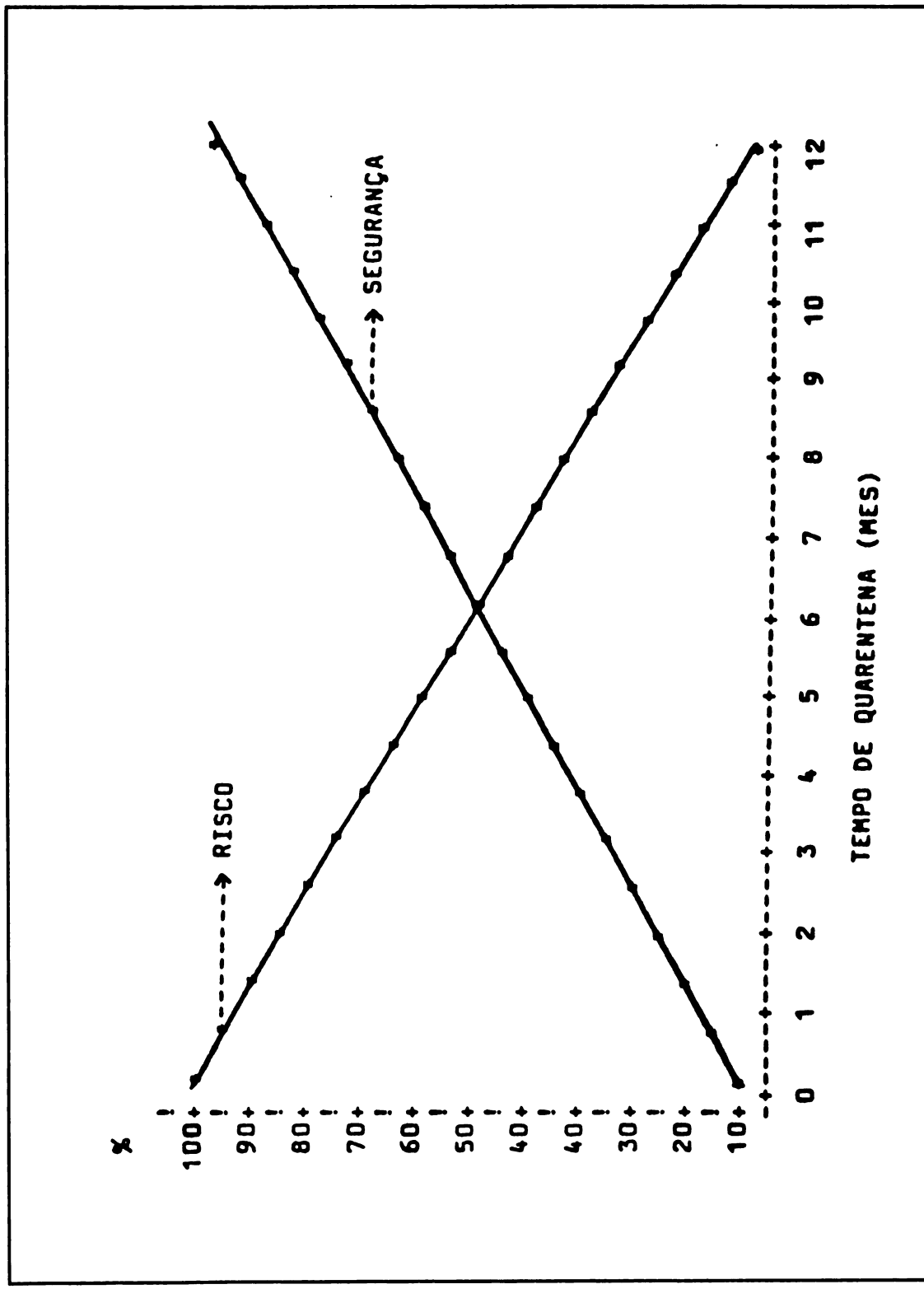



*Figura 1. Relação hipotética entre o tempo de quarentena de germoplasma, a frequência do risco e da segurança antes da liberação.*

burocrático, este é na verdade o documento que facilita a entrada do germoplasma no país. Ela vai evidenciar a entrada do germoplasma para fins científicos, que seria proibido caso a finalidade fosse comercial.

A etiqueta de importação é mais usada para direcionar a entrada do germoplasma, isto é, onde êle vai ser inspecionado e/ou quarentenado.

Pequeno segmento da comunidade científica pratica algumas contravenções de burlar o regulamento dificultando o intercâmbio de germoplasma.

## HIPÓTESE DO ESTABELECIMENTO INEVITÁVEL

Alguns melhoristas e oficiais da área de quarentena aderem a esta hipótese para todos os organismos nocivos. A quarentena irá apenas adiar a introdução.

Mesmo sabendo que esta hipótese não está confirmada, existe um número significativo de organismos nocivos que ainda não estão distribuidos em diversas regiões. Se entretanto esta hipótese for válida, a agricultura deve se beneficiar com os procedimentos corretos de quarentena, uma vez que deverá haver tempo para que resistência seja incorporada as novas linhagens. Seria apenas o responsável pela introdução de novas doenças? Ex. *H. vastatrix.*

## ENTRADA E ESTABELECIMENTO DE DOENÇAS E PRAGAS EXÓTICAS

Para que um organismo seja considerado exótico é necessário:

- Ser introduzido pelo homem ou natureza.
- Estabelecer-se.

Fatores que afetam:

- Intervalo de variação ecológica da praga ou patógeno comparado com o intervalo de variação ecológica do hospedeiro (condições climáticas x ciclo de vida x inimigos naturais x população de hospedeiro suscetível etc.)
- Facilidade de colonização.
- Práticas culturais - manejo.

## ANÁLISE DE RISCO DE PRAGAS E DOENÇAS

Evidências biológicas devem prevalecer no estabelecimento de regulamento da política de quarentena.

A análise de risco é baseada em dois conceitos gerais: a) Os benefícios de interação de um germoplasma deverão exceder o risco (novas culturas ou novas cultivares). b) Estes benefícios deverão exceder os custos (indexação, cultura de meristema, quarentena por dois anos).

Para conceder a entrada de germoplasma estimando o risco de pragas e doenças, muitos fatores estão envolvidos:

1. Eficácia de inspeção do germoplasma.
2. Disponibilidade e eficiência dos tratamentos.
3. Conhecimento sobre o ciclo de vida de organismos de importância quarentenária no país de origem.
4. Consciência por parte do importador sobre os riscos associados a movimentação de germoplasma.

## DIVERSOS REGULAMENTOS DE QUARENTENA VEGETAL

### Pelo tamanho, idade e tipo de material

Os riscos associados a introdução de germoplasma podem ser diminuidos, se forem regulamentados por exemplo: a) O volume a ser enviado. b) Idade do germoplasma a ser enviado. c) A parte do vegetal a ser enviado. Para este último caso, os riscos em forma crescente podem ser delineados: 1) Sementes sem polpa ou impurezas. 2) Plântulas "in vitro". 3) Estacas dormentes e sem raízes. 4) Plântulas com raízes e sem solo. 5) Plântulas com raízes e solo.

No regulamento de germoplasma de elevado risco:

1. Preferência por sementes.

2. Plantas propagadas vegetativamente usar estacas sem raízes.
3. Na introdução de mudas de espécies lenhosas, estas deverão ter no máximo dois anos de idade.
4. Enviar pequena quantidade do germoplasma solicitado, particularmente se propagado vegetativamente.
5. Se a espécie do germoplasma apresenta elevado risco de organismos transmitidos por semente produzir "Seed to seed".

**Tipos de entradas de elevado risco**

Os regulamentos existentes nos diversos países apresentam estas categorias de riscos tais como:

1. **Proibido** - o risco é muito grande e as condições de segurança existentes não são adequadas.
2. **Quarentena de Pós-entrada** - o risco é grande, mas a passagem por uma estação de quarentena fornece segurança na introdução.
3. **Restrito** - embora uma permissão é necessária a qual estipulará as condições de entrada/ Declaração adicional.
4. **Restrito** - permissão não é necessária porém sujeito a inspeção e tratamento na chegada.
5. **Sem restrições**.

**Entrada de hospedeiros alternativos, secundários ou de reserva**

O risco de introdução de pragas e doenças pode ser reduzido também pela proibição de **plantas hospedeiras**.

**Estipulação de determinados requerimentos para entrada**

Nesses casos a Permissão de Importação especificará por exemplo: a) Entrada permitida em determinados períodos. b) Através de determinados portos ou aeroportos. c) Tipo de material vegetal, etc. cacau.

**INFRA ESTRUTURA DE QUARENTENA-ISOLAMENTOS**

**Isolamento geográfico ou climático**

Esta é outra forma de se aplicar medidas de segurança para minimizar riscos. Prescreve-se o plantio do germoplasma em áreas isoladas, quando não há disponibilidade de estação de quarentena apropriada. Esta forma pode ser:

a) Requer o plantio do material fora da estação adequada.

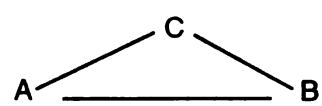
b) Em áreas geograficamente estratégicas evitando-se plantios domésticos, hospedeiros alternativos.

**Estação de quarentena**

Estes são mantidos sob elevados padrões fitossanitários para isolar germoplasma de elevado risco das áreas de cultivo por um período aceitável de detenção, normalmente numa estação de crescimento. Este período deve ser suficiente para: a) Quebrar o ciclo de vida das principais doenças e pragas potencialmente associadas. b) Extender-se além do período de incubação desses organismos no hospedeiro em quarentena.

**Quarentena intermediária ou terceiro país**

Cooperação internacional




No país C as plantas são indexadas, mantidas por determinado período para que infecções latentes possam se expressar. Tratamento visando erradicação ou quebra do ciclo de vida do patógeno. O país C não corre o risco - não há cultivo similar, -os organismos nocivos possuem um número restrito de hospedeiros, -clima desfavorável ao estabelecimento.

## Sugestões

### *Melhoristas*

1. Planejamento adiantado.
2. Evitar duplicação de introduções (Base de dados).
3. Avaliar os pedidos (importar coleção mundial, importar por partes, ou selecionar).
4. Centralizar operações de introdução - contatos no exterior.
5. Reanálise das necessidades (melhoristas reclamam das gerações que perdem quando passam pela quarentena $F^1$).
6. Inventário dos recursos genéticos disponíveis (CENARGEN).
7. Estabelecer prioridades para o país. A quarentena deverá estar na escala de alta prioridade.
8. Estabelecer um sistema de acesso as introduções e assim todo germoplasma fica devidamente documentado (IBM).
9. Trabalhar em conjunto com o Sistema de Defesa Sanitária Vegetal.

### *Inspetor de quarentena*

1. Processar o mais rápido possível - qualquer demora deverá ser devido a razões biológicas - jamais administrativas.
2. Fornecer soluções de tratamento ou quarentena, do que simples proibição a entrada.
3. Cientificar-se das verdadeiras e respeitadas fontes de germoplasma certificado e testado para maioria dos patógenos.
4. Desenvolver mais e eficientes métodos de inspeção (Bacteriologia). Pesquisa.
5. Se a análise de risco sugere "atividade conservadora" sugerir a alternativa para inspeção do germoplasma (Universidades - Instituições de Pesquisa).
6. Contribuir para troca de informações a nível internacional sobre a distribuição geográfica de pragas e doenças.
7. Trabalhar sempre em conjunto com os profissionais (pesquisadores, cientistas, professores, etc.), da área de introdução de plantas.

Sugestões para ambas as partes

1. Atuar sempre como membro de uma equipe (nacional, regional, etc.)
2. Comunicar-se com outros membros da equipe.
3. Comunicar-se sempre que possível com o profissional da mesma área e, outros países, regiões...

## LITERATURA CONSULTADA

AUSTRALIA. 1975. Department of Health. Cargo containers and unit loads quarantine aspects and procedures. Canberra. Australian Government Publ. Serv., 33p.

BRASIL. 1987. Ministério da Agricultura. Delegacia Federal de Agricultura do Estado do Rio de Janeiro, R.J. Manual de inspeção fitossanitária do trânsito internacional e interestadual. Rio de Janeiro, 332p.

--------. 1980. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Vegetal. Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal. 4. ed. Brasília, 34p.

ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 1. 1980. Campinas, S.P. 1980. Anais. Campinas, CATI, 200p.

FAO. 1976. Post-entry plant quarantine station and training centre, Ibadan. Roma, 61p. (FAO. AG/NIR/70/540).

HEWITT, W.B. & CHIAPAPPA, L. 1977c. Plant health and quarantine in international transfer of genetic resources. Cleveland, CRC Press, 346p.

PLANT quarantine in Japan. s.n.t. 36p.

SMEE, L. & SETCHELL, P.J. 1973. Post-entry quarantine for imported plants. Canberra, Australian Government Publishing Service. 20p.

# Lista de Participantes

## ARGENTINA

*Altuve, Stella Maris*
EEA Mercedes/INTA
Casilla de Correo 38-3470 - Corrientes
Tel.: 54 - 773- 20392
Fax: 54 - 773 - 20054

*Sánchez, Roberto*
EEA Manfredi/INTA
5988 Manfredi, Córdoba
Tel.: (0572) 93053 / 93061
Fax: (0572) 93061

## BOLIVIA

*Muñoz Oller, Adolfo*
Estación Experimental Algarrobal /
IBTA, Tarija
San Pedro esq. Arguedas, Yacuiba
Casilla 43, La Paz
Tel.: 0682 - 2188

*Rojas, Wilfredo*
Estación Experimental de
Patacamaya /IBTA
Casilla 5783
La Paz, Bolivia

## BRASIL

*De Carvalho, Jose Edmar Urano*
CPATU/EMBRAPA
Caixa Postal 48
66095 - 100 Belém, PA
Tel.: (091) 226 - 6622
Fax: (091) 226 - 9845

*Do Prado, María Aparecida*
CENARGEN/EMBRAPA A C R
Caixa Postal 02372
70749- 970, Brasília, D.F.

*Figueiredo, Lucio Flavio de Alencar*
CENARGEN/EMBRAPA/ACAV
Caixa Posta 02372
70749-970, Brasília, D.F.

*Pessoa, Homero B. Salazar Da V.*
CNPH/EMBRAPA
Caixa Posta 0218
CEP 70359- 970, Brasília, D.F.
Tel.: (061) 556 - 5011
Fax: (061) 556 - 5744

*Santos, Maria de Fatima*
CENARGEN/UNB
Campus UNB - Fitotecnia
CEP 70910 - 970, Brasília, D.F.
Tel.: (060) 348 2191

*Vieira, Valdemir de Macedo*
CPAC/EMBRAPA
Caixa Postal 08223
70301 - 970, Planaltina, D.F.
Tel.: (061) 389 - 1171

## CHILE

*Matus Tejos, Iván Ariel*
EE Quilamapu/INIA
Casilla 426, Chillán
Tel.: (042) 211177

*Pezoa Cancino, Angela Ema*
Subestación Experimental Vicuña/INIA
Casilla 73, Vicuña, IV Región
Tel. 56 - 51 - 411012
Fax: 56 - 51 - 411006

## COLOMBIA

*Silva, Carlos*
Instituto Colombiano Agropecuario
(ICA)
Apartado Aéreo 7984
Tel.: 232 4692
Santa Fé de Bogotá

*Zuluaga Ríos, Marta Luz*
CORPOICA
Antigua, Ríonegro, La Selva
Llanogrande, Medellín
Tel.: 337 0004

## COSTA RICA

*Jiménez Fernández, Marta Liliana*
Ministerio de Recursos Naturales,
Energía y Minas
Apartado Postal 8 - 5810 - 1000
San José
Fax: (506) 24 05 717

## PARAGUAY

*Cardozo Cabral, José María*
IAN
Ruta 2, Km 48 y 1/2
Caacupé
Tel. (0511) 2255

*Ferreira M. Ruben Genciano*
CRIA
Calle C. Ruta VI, Capitán Miranda
Itapuá
Tel.: (071) 3799

## PORTUGAL

*Rocha Marcelino, Filomena Alexandra dos Santos*
Banco Portugués de Germoplasma
Vegetal
Dirección Regional de Agricultura de
Entre Douro y Minho
Quinta dos Peões, Gualtar
4700 Braga
Tel.: (053) 575761
Fax: (053) 577328

## URUGUAY

*Rabaiotti Bottaro, Enrique*
Facultad de Agronomía
Cátedra de Botánica
Av. E. Garzón 780
12900 Montevideo
Tel.: (00598) 2 39 71 91
Fax: (00598) 2 39 30 04

*Rostan Bo, Caisiv*
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km 11, La Estanzuela
Colonia
Tel.: (00598) 522 4060
Fax: (00598) 522 4061

## VENEZUELA

*Varela Rodríguez, José Alberto*
Centro Nacional de Conservación de
Recursos Fitogenéticos
Callejón La Ceiba, Av. Universidad
Limón, Apartado 4661
Maracay, Aragua 2101-A
Tel./Fax: 58 - 43 - 831932

# Lista de Instructores

## BRASIL

*Carmona, Ricardo*
*Da Cunha, Rozane*
*Da Eira, Miriam Terezinha Souza*
*De Goes, Marisa*
*De Miranda, Antonio Rodrigues*
*Dias, Braulio F. de Souza*
*Faiad, Marta Gomes Rodrigues*
*Ferreira, Francisco Ricardo*
*Guedes, Antonio Carlos*
*Imaculada, Izulme Rita*
*Mendes, Rui Americo*
*Morales, Eduardo Alberto Vilela*
*Perez, Eduardo Lleras*
*Popinigis, Flavio*
*Valls, José Francisco Montenegro*
*Valois, Afonso Celso Candeira*

CENARGEN/EMBRAPA
Caixa Postal 02372
70749-970 Brasília, D.F.
Tel.: (061) 273-0100
Fax: (061) 274-3212

## COLOMBIA

*Toll, Jane*
IBPGR - Head Quarter, Germplasm
Management, Germplasm
Maintenance and Use Group
Apartado Aéreo 6713
Cali
Colombia

# Nota del Editor

Una de las temáticas importantes del Subprograma Recursos Genéticos del PROCISUR es la conservación del germoplasma vegetal.

Precisamente, este DIALOGO XLV, reproduce las disertaciones realizadas en el Curso sobre "Conservación de Germoplasma Vegetal", que se realizó en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN) de EMBRAPA, Brasilia, Brasil, del 19 al 30 de setiembre de 1994.

Investigadores de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Paraguay, Portugal, Uruguay y Venezuela se beneficiaron de esta capacitación, en la cual se abordaron, entre otros temas, los aspectos principales que hacen a la conservación y manejo del germoplasma, calidad de las semillas (fisiológica, sanitaria), clasificación de las semillas y documentación en recursos genéticos vegetales.

Hemos respetado el idioma original de las distintas presentaciones, y como la mayoría de los disertantes fueron técnicos de CENARGEN, casi todos los trabajos están en portugués, a excepción de la conferencia en inglés del Dr. Jane Toll.

Confiamos que la información aportada por esta publicación será de suma utilidad para los técnicos que desarrollan sus trabajos en el ámbito de los recursos genéticos.

**Dr. Juan P. Puignau**
*Especialista en Comunicación*

| FECHA DE DEVOLUCION | | | |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Esta publicación constituye el número XLV de la Serie DIALOGO del PROCISUR, tiene un tiraje de 500 ejemplares y se terminó de imprimir en la ciudad de Montevideo, Uruguay, en el mes de abril de 1996.

Diagramación, composición y armado: Sra. Cristina Díaz

Impresión, encuadernación y portadas: Impresora S & D S.R.L.

Comisión del Papel. Edición amparada al Artículo 79 de la Ley 13.349.

Depósito Legal Nº 300.405

IICA - PROCISUR
DIALOGO-45

Autor

Título
Conservación de germoplasma vegetal

| Fecha Devolución | Nombre del solicitante |
| --- | --- |

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA
Andes 1365, P. 8 - Tel. (598) 2 92 04 24 - Fax (598) 2 92 13 18 - Casilla de Correo 1217
Montevideo - Uruguay