

Procedimentos para conservação de germoplasma vegetal na Coleção in Vitro do Banco Genético



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 398

Procedimentos para conservação de germoplasma vegetal na Coleção in Vitro do Banco Genético

*Patrícia Silva Flores
Jonny Everson Scherwinski Pereira
Márcia José Ribeiro*

Exemplar desta publicação disponível gratuitamente no link: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília / Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970, Planaltina, DF
Fone: (61) 3388-9898
Fax: (61) 3388-9879
embrapa.br/cerrados
embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Unidade

Presidente
Lineu Neiva Rodrigues

Secretária-executiva
Alessandra Duarte de Oliveira

Secretária
Alessandra S. Gelape Faleiro

Membros
*Alessandra Silva Gelape Faleiro;
Alexandre Specht; Edson Eyji Sano;
Fábio Gelape Faleiro; Gustavo José Braga;
Jussara Flores de Oliveira Arbues;
Kleber Worsley Souza;
Maria Madalena Rinaldi;
Shirley da Luz Soares Araújo*

Supervisão editorial
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Revisão de texto
Jussara Flores de Oliveira Arbues

Normalização bibliográfica
Shirley da Luz Soares Araújo (CRB 1/1948)

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Wellington Cavalcanti

Foto da capa
Jonny Everson Scherwinski Pereira

Impressão e acabamento
Alexandre Moreira Veloso

1ª edição
1ª impressão (2022): tiragem (30 exemplares)

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

F634p Flores, Patrícia Silva.

Procedimentos para conservação de germoplasma vegetal na coleção in vitro do Banco Genético / Patrícia Silva Flores, Jonny Everson Scherwinski Pereira, Márcia José Ribeiro. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2022.

22 p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, ISSN online 2176-5081, 368).

1. Germoplasma. 2. Banco genético. 3. Melhoramento genético vegetal. 4. Recurso fitogenético. I. Flores, Patrícia Silva. II. Pereira, Jonny Everson Scherwinski. III. Ribeiro, Márcia José. IV. Título. V. Série.

CDD 333.953 4 (23 ed.)

Autores

Patrícia Silva Flores

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

Jonny Everson Scherwinski Pereira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Márcia José Ribeiro

Engenheira-agrônoma, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Apresentação

Apesar de as abordagens da cultura de tecidos de plantas serem comumente usadas para propagação em larga escala, a técnica é uma importante ferramenta para armazenamento de recursos fitogenéticos, a curto e médio prazo.

A partir da década de 1980, a conservação *in vitro* de plantas foi intensificada mundialmente, surgindo grandes coleções mantidas por instituições como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Com o crescimento dessas coleções, fez-se necessário o desenvolvimento de padrões internacionais de referência, procedimentos operacionais padrão e sistemas de gerenciamento de qualidade para garantir a conservação *in vitro* eficaz, segura e eficiente dos recursos genéticos vegetais. Na Embrapa, o Sistema de Qualidade em Coleções de Recursos Fitogenéticos visa sistematizar e padronizar as atividades das coleções e Bancos Ativos de Germoplasma. Alguns desses procedimentos são descritos a seguir, com o intuito de contribuir para a padronização de normas, dos procedimentos e das orientações metodológicas em coleções de germoplasma vegetal conservadas *in vitro*.

Sebastião Pedro da Silva Neto
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução.....	9
Conservação in vitro de plantas – conceito.....	10
Recebimento e preparo dos acessos na Coleção in Vitro.....	11
Incorporação dos acessos.....	15
Armazenamento das coleções	17
Controle de qualidade dos acessos conservados in vitro	17
Fornecimento dos acessos.....	20
Referências	21

Introdução

No Banco Genético, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, são mantidas cópias de segurança ou duplicatas de germoplasma animal, vegetal e microbiano provenientes de bancos ativos de germoplasma (BAGs) ou coleções. A função principal desse banco é assegurar a conservação da variabilidade genética das espécies e, com isso, permitir a continuidade de pesquisas e/ou programas de melhoramento genético para melhorias dos cultivos agrônômicos que garantem a segurança alimentar das populações.

No Banco Genético, o germoplasma vegetal é conservado em uma das três coleções existentes: Coleção Base de Sementes, Coleção Criogênica e Coleção in Vitro. Para as espécies em que é importante a manutenção do genótipo, que não seja possível a manutenção por meio de sementes (por serem recalcitrantes ou produzirem pouca ou nenhuma semente) e que não possuam protocolo de criopreservação, a conservação in vitro representa a melhor estratégia de conservação. A manutenção de uma coleção por meio da cultura de tecidos é considerada de custo elevado, quando comparada à conservação de sementes e criogênica, apesar de imprescindível para a conservação de cópias de segurança de espécies com as características mencionadas. Além disso, em termos de tempo de armazenamento, quando comparada com as demais técnicas, a conservação in vitro de plantas é considerada uma estratégia de médio prazo, pois é possível manter a planta de 6 meses até 2 anos sem que seja necessária a renovação da cultura. Esse período varia conforme a resposta da espécie às condições de cultivo. Na conservação por meio de sementes, é possível conservar o germoplasma vegetal por 20 anos e, na conservação por tempo indeterminado. Por conta desses aspectos, é de suma importância avaliar se a espécie vegetal atende os critérios para a conservação in vitro.

Atualmente, além de manter cópias de segurança de plantas de Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) da Embrapa, na Coleção também são conservados acessos de instituições nacionais e internacionais, como no caso do germoplasma de batata, proveniente do Centro Internacional de La Papa (CIP), mantido por meio de cooperação técnica entre o CIP e a Embrapa.

A Coleção in Vitro de Germoplasma Vegetal faz parte do Sistema de Qualidade da Embrapa (Projeto QualiRegen), implementado a partir de 2016. O Sistema de Qualidade em Coleções de Recursos Fitogenéticos visa sistematizar e padronizar as atividades das coleções e BAGs (Santos et al., 2018). De fato, o processo de conservação de germoplasma vegetal na Coleção in Vitro, atualmente envolve várias instruções técnicas e procedimentos operacionais, conforme preconizado no documento referência *Requisitos Corporativos de Qualidade das Coleções de Recursos Fitogenéticos do Banco Genético* (Santos et al., 2018). Todos os procedimentos gerenciais e técnicos foram definidos conforme metodologias adotadas nos principais centros internacionais de conservação. Alguns desses procedimentos são descritos a seguir, com o intuito de contribuir para a padronização de normas, procedimentos e orientações metodológicas em coleções de germoplasma vegetal conservadas in vitro.

Conservação in vitro de plantas – conceito

A conservação in vitro de plantas compreende a manutenção de amostras de germoplasma vegetal por meio de técnicas que permitem o crescimento lento ou reduzido. O princípio do método consiste em minimizar o metabolismo da planta por meio da redução da intensidade luminosa e/ou temperatura de incubação, pela suplementação do meio de cultura com agentes osmóticos e inibidores da síntese de etileno, bem como reduzindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (Pereira; Costa, 2010). Normalmente, combinam-se dois ou mais métodos para a conservação por crescimento reduzido (Pathirana; Carimi, 2022).

A redução do metabolismo das plantas e consequente aumento no intervalo entre as transferências das plantas para o novo meio de cultura reduz os riscos de variação somaclonal, que consiste em alterações genéticas e epigenéticas em plantas como resultado de vários fatores, incluindo o número de subcultivos (Parisa et al., 2020). A variação somaclonal pode resultar em mudanças (transitórias ou não) em características agrônômicas importantes e perda da viabilidade da cultura. O aumento no intervalo de subcultivo das culturas também permite a redução na demanda de trabalho e no custo para a manutenção dos acessos (Shahzad et al., 2017).

Grande parte do material depositado na Coleção in vitro é proveniente de BAGs de espécies vegetais mantidas a campo. A conservação de cópias desses materiais em condições in vitro oferece vantagens como menor risco de perdas além da possibilidade de preservar mais acessos em um menor espaço físico, uma vez que os propágulos são relativamente pequenos (meristemas, ápices caulinares, gemas axilares, embriões zigóticos, etc). A conservação in vitro também apresenta a vantagem de possibilitar a rápida retomada da capacidade de multiplicação, tornando ágil a propagação clonal dos materiais, quando necessária. Ressalta-se que, por medidas de segurança, estratégias de conservação ex situ também devem ser complementares para a manutenção segura de germoplasma, evitando-se possíveis riscos de perda de materiais (FAO, 2014), já que, na conservação in vitro, esses riscos também ocorrem, porém, em menor proporção que em coleções mantidas a campo.

Recebimento e preparo dos acessos na Coleção in Vitro

A Coleção in Vitro do Banco Genético mantém exclusivamente cópias de segurança de acessos de germoplasma conservados em BAGs nacionais e internacionais e está credenciada como fiel depositária para conservar subamostras de patrimônio genético remetidos ao exterior.

Para iniciar o processo de depósito na coleção, o curador do banco deve entrar em contato com a Coordenação do Sistema de Curadorias da Embrapa pelo e-mail cenargen.nsc@embrapa.br para manifestar interesse. O coordenador do sistema encaminha a solicitação de depósito para o curador da Coleção in Vitro do Banco Genético analisar a viabilidade de atendimento da demanda. Para ser aprovada, são verificados os seguintes parâmetros: (1) se a espécie em questão faz parte da lista de prioridades do acervo da Coleção In Vitro do Banco Genético; e (2) se existe espaço suficiente nas câmaras de conservação para a quantidade de materiais que se planeja conservar.

Uma vez que a demanda seja considerada viável, o depositante deve preencher e providenciar as assinaturas no formulário da guia de depósito, e enviar ao solicitante pelo curador. Nesse formulário, deve constar a lista de acessos

e seus dados de passaporte, tais como, nome científico, data de entrada no BAG, forma de obtenção e código BRA, caso o material seja proveniente de BAG pertencente ao sistema de curadoria da Embrapa. O código BRA consiste em uma sequência numérica, precedida do prefixo “BRA”, desenvolvido pela Embrapa para documentar dados e registros de acessos conservados em BAGs, na Plataforma Alelo Recursos Genéticos. O não fornecimento das informações, no momento da entrega ou posteriormente, acarretará devolução ou descarte do material. Materiais provenientes de outros países, além de documentos com as informações acima, devem fornecer declaração, certificado fitossanitário e alvará de importação da Embrapa.

Na chegada do material ao laboratório, é feita a conferência de todos os dados dos acessos com a listagem anexada e encaminhada pelo depositante. Caso algum dos acessos não esteja na listagem ou sua denominação/identificação não corresponda com a listagem/relatório, o material é separado do processo e os dados são encaminhados para a solicitante do depósito ou o responsável da coleção de produto para a sua definição/correção.

Os acessos podem ser recebidos na forma de sementes, estacas ou em culturas in vitro já estabelecidas em tubos de ensaio. As estacas e os frascos contendo as culturas devem ser acondicionados de maneira segura, em caixa de poliestireno estendido para o envio. As sementes devem ser enviadas em envelope de papel. As estacas e as sementes são avaliadas visualmente com relação à presença de pragas e doenças e registradas suas informações em formulário próprio. Materiais em que sejam constatados problemas fitossanitários (doenças ou presença de pragas) são incinerados. Problemas fitossanitários que não sejam possíveis de verificar visualmente (contaminação com bactérias ou fungos endógenos e vírus), bem como, a integridade genética do material enviado (variação somaclonal), são de inteira responsabilidade do depositante.

No caso do envio de estacas, solicita-se que sejam enviadas pelo menos dez estacas de cada acesso. Para o envio de sementes, a quantidade a ser enviada dependerá da espécie e do potencial germinativo, o qual deverá ser informado pelo depositante. Quando culturas já estabelecidas in vitro são enviadas, solicita-se que sejam de três a seis tubos de ensaio contendo uma planta em cada.

Uma vez recebidas, as estacas são limpas em água corrente e detergente, identificadas por placa de PVC presas com arame e plantadas em substrato em casa de vegetação, onde permanecem até a emissão de brotações. As brotações jovens são então coletadas com auxílio de tesoura de poda e levadas para o laboratório, onde as folhas são removidas. Em seguida, segmentos caulinares, com pelo menos uma gema, são seccionados em tamanhos de aproximadamente 2 cm, lavados em água destilada e transferidos para câmara de fluxo laminar.

Para a assepsia dos propágulos que serão estabelecidos in vitro, realiza-se a imersão dos mesmos em solução de álcool (70%) e, depois, em solução de hipoclorito de sódio e Tween 20 (3 gotas/100 mL). Os tempos de imersão em cada uma das soluções, bem como a concentração de hipoclorito a ser utilizada, são adotados conforme o tipo e características dos propágulos. Após passarem pela solução de hipoclorito, realiza-se tríplice lavagem dos propágulos em água destilada e estéril, sendo as extremidades deles removidas com auxílio de bisturi, visando eliminar os tecidos danificados durante a assepsia (Figura 1). Com a redução do tamanho, os explantes alcançam o comprimento de 1 cm, quando então, são inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura específico. Para o estabelecimento da cultura, é inoculado um explante por tubo e cerca de 30 explantes de cada acesso. O meio de cultura utilizado para o estabelecimento das culturas pode variar conforme a espécie, mas geralmente é o meio de MS (Murashige; Skoog, 1962) ou o meio Wood Plant Medium (WPM) (Lloyd; Mc Cown, 1981), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel. Este agente solidificante é utilizado para facilitar a visualização de possíveis contaminações bacterianas, por ser mais translúcido que os meios de cultura solidificados com ágar.

Uma vez inoculadas, as culturas são transferidas para sala de crescimento a 25 °C e permanecem nela até que os explantes emitam brotações de parte aérea. Nesse período, são verificadas também a ocorrência de contaminações fúngicas e bacterianas e a sobrevivência dos explantes. Em seguida, os ápices caulinares saudáveis das novas brotações são seccionados e transferidos para meio de conservação específico. A utilização de ápices caulinares para a conservação in vitro é um aspecto importante, pois se observa que estes têm maior capacidade de sobrevivência em meios de cultura contendo retardantes de crescimento. Nessa fase, são inoculados dois ápices por tubo de

ensaio de um total de dez tubos. As culturas são então incubadas na sala de crescimento a 25 °C até que seja observado o crescimento vegetativo. Agora, apenas seis tubos de cada acesso são selecionados para compor o acervo da Coleção in Vitro de Germoplasma Vegetal do Banco Genético. As culturas são transferidas para câmaras de conservação a 20 °C ou 10 °C e aquelas contaminadas ou que não apresentam desenvolvimento vegetativo são eliminadas por meio de autoclavagem à 120 °C por 30 minutos e descartadas em lixo comum.



Fotos: Kazumiso Matsumoto

Figura 1. Estabelecimento in vitro de germoplasma vegetal para conservação na Coleção in Vitro do Banco Genético.

Quando os acessos são recebidos na forma de sementes, é feita sua assepsia conforme protocolos disponíveis na literatura e inoculados no meio de cultura descrito anteriormente. Para o recebimento de culturas já estabelecidas, assim que as caixas do transporte são recebidas no laboratório, álcool (70%)

é borrifado sobre elas antes da retirada dos tubos contendo os acessos e checagem da relação do material enviado. Após a checagem, dependendo do número de repetições, do estado da planta e do meio de cultura em que estão mantidas, elas podem ser diretamente transferidas para as salas de conservação, para o meio de multiplicação ou para o meio de conservação.

Incorporação dos acessos

Assim que o material é transferido para as salas de conservação, é checado se as informações do acesso constantes na guia de depósito correspondem com as informações no cadastro do acesso na Plataforma Alelo, para não ocorrer erros de identificação. Se não forem verificadas inconsistências nas informações, o código BRA do acesso é cadastrado na Plataforma Alelo¹ como cópia de segurança na Coleção in Vitro (Figura 2).

Os acessos são identificados com um código interno sequencial e BRA apresentados por um código de barras em etiquetas coladas nos tubos de ensaio com os acessos. Além da identificação, esses códigos de barras contêm informações importantes para o manejo na coleção.

¹ <https://alelo.cenargen.embrapa.br>

seguro | aleobag.cenagen.embrapa.br/Acessar/NEWBAG#nogo

BRASIL

aleo VEGETAL

PATRICIA FLORES
ADMIN-LOCAL [Sair]

ABCB 30

Personalize o Sistema

In vitro Mentha

Passaporte > Cadastro > Incluir ou atualizar - (Português-Brasil)

Selecionar Acesso Identificação Dados Compartilhados Dados do BAG

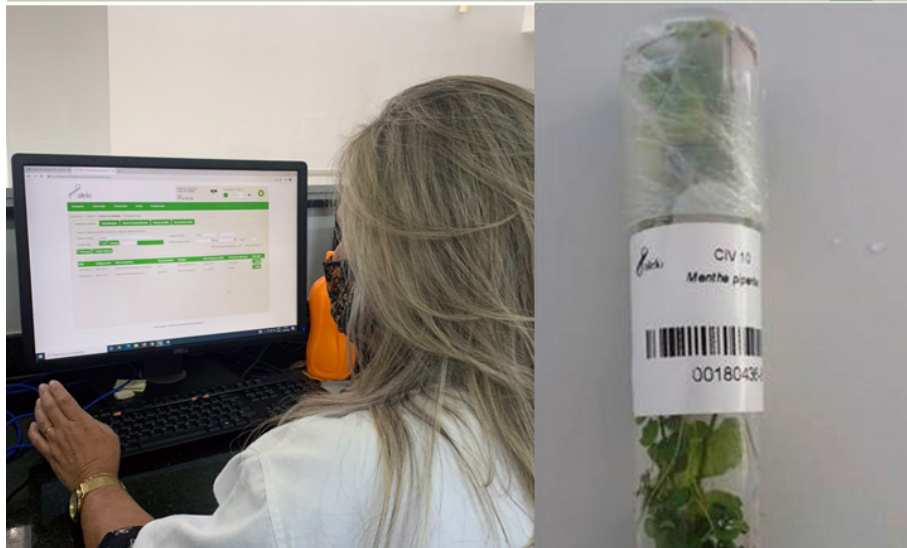
Informe dados para filtrar pesquisa a base de dados de acessos

Palavra Chave: Código no BAG: Mentha a

Código BRA: Data Entrada no BAG: até Filtrar: 50

Total de acessos nesse Banco: 24 Pesquisa retornou: 24

BRA	Código Local	Nome Científico	Denominações	Outros Códigos	Data Entrada no BAG	Forma de Obtenção	Operação
00055712-4	Mentha 1	Mentha aquatica L.	CM 1.Lime Mint	CM 1.BMA 3	20/11/2017	Introdução	<input type="button" value="Editar"/>
00180416-0	Mentha 2	Mentha suaveolens Ehrh.	Apple Mint,CM 2	CM 2.BMA 261	21/12/2017	Introdução	<input type="button" value="Editar"/>
00180417-8	Mentha 3	Mentha x piperita L.	Chocolate Mint,CM 3	CM 3.BMA 262	21/12/2017	Introdução	<input type="button" value="Editar"/>
00180418-6	Mentha 4	Mentha suaveolens Ehrh.	CM 4.Pineapple Mint	CM 4.BMA 263	21/12/2017	Introdução	<input type="button" value="Editar"/>
00180419-4	Mentha 5	Mentha canadensis L.	Chinese Mint,CM 5	CM 5.BMA 264	21/12/2017	Introdução	<input type="button" value="Editar"/>
00180420-2	Mentha 6	Mentha piperita L.	Chewing Gum Mint,CM 6	CM 6.BMA 265	21/12/2017	Introdução	<input type="button" value="Editar"/>
00180421-0	Mentha 7	Mentha spicata L.	CM 7.Grapefruit Mint	CM 7.BMA 266	21/12/2017	Introdução	<input type="button" value="Editar"/>



Fotos: Patrícia Flores

Figura 2. Registro de acessos introduzidos na Coleção in Vitro do Banco Genético na Plataforma Aleo.

Armazenamento das coleções

Após o estabelecimento in vitro, os acessos são transferidos para meios específicos de conservação, cuja formulação depende da espécie a ser conservada. Diferentemente dos meios de cultura utilizados para a micropropagação de plantas, os meios utilizados na técnica de crescimento reduzido in vitro não são suplementados com citocininas ou auxinas em doses elevadas, pois o objetivo não é a produção de brotações, tampouco a produção de calos, aumentando os riscos de variação somaclonal. Para fins de conservação, adota-se a concentração de sacarose de 20 g L⁻¹ para a redução do crescimento em todas as culturas. Para algumas espécies, é utilizada ainda a metade de concentração de sais ou formulações com níveis de nitrogênio baixos. Agentes osmóticos e inibidores da síntese e ação do etileno também podem ser utilizados. A formulação do meio de cultura dependerá da resposta das espécies em termos de ausência de fitotoxidez e manutenção do vigor das plantas por um maior período. Os meios de cultura para a conservação são comumente solidificados com ágar, pois esse agente solidificante mantém as características físicas do meio por mais tempo que o Phytigel, que é o outro agente solidificante utilizado no Laboratório de Conservação in Vitro. Este último é utilizado apenas no estabelecimento da cultura asséptica, uma vez que, por manter o meio transparente, facilita a detecção visual de contaminações bacterianas.

As espécies que toleram temperaturas mais baixas são conservadas em câmara de 10 °C e as demais, que não suportam tais temperaturas, são conservadas em câmara de 20 °C, sob intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas.

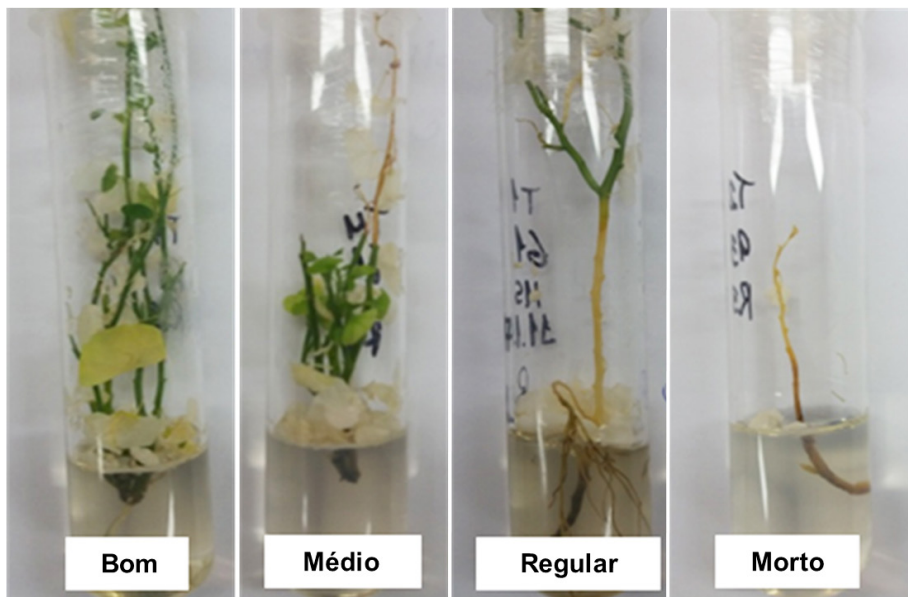
Controle de qualidade dos acessos conservados in vitro

Durante o tempo de armazenamento é feita semanalmente, uma inspeção visual nas coleções conservadas in vitro para verificação do vigor das plantas e ocorrência de contaminação microbiana. A cada seis meses, é feito um monitoramento mais detalhado do estado das plantas por meio do preenchimento de formulário eletrônico próprio (Figura 3), no qual, são registradas a

ocorrência de contaminações, o vigor da planta, a ocorrência de distúrbios fisiológicos que afetam a conservação *in vitro* e a necessidade de repicagem ou renovação da cultura. O vigor da planta é definido por meio de uma escala, baseando-se no estágio de senescência da planta conforme ilustrado na Figura 4. Quando as plantas se apresentam em estágio regular, é o momento de proceder à renovação da cultura.

Responsável:									
Espécie:									
Data da avaliação:					Data repicagem:				
cód coleção	Nº de tubos	Tubos contaminados	Tipo de contaminação	Clorose	Hiperidricidade	Tubos perdidos	Tubos viáveis	Estado	necessidade de repicar
								<input type="text" value="bom"/> <input type="text" value="médio"/> <input type="text" value="regular"/> <input type="text" value="morto"/>	

Figura 3. Formulário eletrônico para monitoramento das coleções *in vitro* na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Fotos: Patrícia Flores

Legenda: Bom estado – folhas e brotos totalmente verdes ou iniciando o secamento e morte das folhas; Estado médio – secamento e morte das folhas e dos brotos entre 30% e 50%; Estado Regular – mais de 50% de secamento e morte de folhas e brotos; Morto – folhas e brotos mortos.

Figura 4. Estágios da senescência em acesso de *Passiflora* spp. conservado *in vitro* por crescimento reduzido.

O formulário de monitoramento também é utilizado como uma ferramenta para verificar o momento em que é necessário o envio de uma nova amostra do genótipo pelo curador do BAG de origem do acesso, que é constatado quando os intervalos entre as repicagens vão se tornando cada vez menores. A manutenção das culturas in vitro, por longos períodos e após sucessivos subcultivos, resulta na perda de vigor dos explantes, os quais passam a não responder mais aos estímulos dos componentes do meio de cultura. Esse fenômeno é associado à variação somaclonal (Parisa et al., 2020). Caso o curador do BAG de origem não tenha mais o acesso para substituição da cópia de segurança, o material depositado na coleção é aclimatizado em casa de vegetação para que este recupere o vigor e reintroduzido na Coleção in Vitro. Uma cópia deste material é enviada ao BAG de origem para recompor o acervo do banco.

Apesar de a data provável de renovação das coleções ser prevista no Plano Anual de Manutenção dos Acessos, quando verificada a necessidade ou urgência na renovação de algum acesso durante o monitoramento, a atividade é executada o mais rápido possível para evitar a possível perda de materiais.

Para a renovação da cultura, os ápices viáveis e/ou segmentos caulinares, contendo uma ou duas gemas, são seccionados e transferidos para novo meio de conservação. Caso o vigor das plantas esteja muito baixo, elas devem ser transferidas para meio de multiplicação composto de sais MS suplementado com 3% de sacarose. Nesse caso, as plantas são transferidas para meio de conservação apenas após atingida a altura suficiente para a obtenção do número suficiente de explantes para o estabelecimento da coleção.

Quando verificada contaminação fúngica, o material é imediatamente descartado. Se a contaminação for de origem bacteriana, é utilizado apenas o ápice caulinar da planta e o primeiro segmento caulinar para a renovação da cultura. Os explantes são inoculados em meio de MS ou WPM solidificado com Phytigel. Se a espécie de planta não apresentar fitotoxidez ao Plant Preservative Mixture (PPM), o meio é suplementado com 0,1% do biocida para o maior controle da contaminação. A recuperação do acesso que apresentar contaminação bacteriana é feita apenas se todas as replicadas estiverem contaminadas.

Durante a fase de renovação, as culturas são incubadas a 25 °C, sob intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas, até que as plantas apresentem formação de raiz e crescimento vegetativo. Essa verificação é feita por meio de inspeções visuais realizadas com frequência de 15 dias. Quando atingida as condições necessárias, as culturas são então transferidas para as câmaras de conservação de 10 °C ou 20 °C.

Após a repicagem, os tubos de ensaio contendo propágulos que não foram utilizadas para a renovação da coleção são mantidos como material de reserva até que seja constatado que o material replicado esteja apresentando o crescimento vegetativo esperado e a ausência de contaminações. Após, esse material reserva é descartado. O descarte é feito por meio de autoclavagem dos tubos contendo as culturas por 30 minutos a 120 °C. Após a autoclavagem, o conteúdo dos tubos é vertido em peneiras para separação dos resíduos sólidos e líquidos. Os resíduos sólidos são descartados no lixo comum e o resíduo líquido é descartado em pia. O mesmo procedimento é feito com os tubos contendo culturas contaminadas com bactérias ou fungos.

Fornecimento dos acessos

O atendimento a solicitações de germoplasma conservados na Coleção in Vitro do Banco Genético, segue o estabelecido na deliberação nº13/2000, de 05 de maio de 2000, com respeito à transferência de material biológico integrante de banco da Embrapa e terceiro.

Após o recebimento da solicitação, é verificada a disponibilidade do material por meio de análise do formulário de controle dos acessos da coleção e checagem na sala de conservação.

A Coleção in Vitro atende solicitações provenientes de unidades da Embrapa e de instituições públicas ou privadas nacionais ou internacionais. Entretanto, apenas são atendidas as solicitações de materiais vegetais que não estejam disponíveis nos bancos de origem, uma vez que, na Coleção in Vitro, são mantidas, exclusivamente, cópias de segurança. Essas solicitações só podem ser atendidas mediante concordância do curador que remeteu a cópia para a Coleção. Portanto, o pedido deve ser efetuado diretamente aos curadores dos BAGs dos produtos de interesse. Para informações de contato dos

curadores dos BAGs da Embrapa, o interessado pode acessar a página do sistema Alelo da Embrapa² e fazer diretamente a solicitação do material ao curador do produto.

O material depositado na Coleção in Vitro do Banco Genético pode ser encaminhado para o banco de origem ou diretamente ao solicitante. Caso o material seja enviado para o banco de origem, é preenchida e assinada uma guia de remessa para o registro do envio. No caso de envio de germoplasma para solicitante externo, é celebrado o Acordo de Transferência de Material e, quando se tratar de transferência de material de valor agregado pela Embrapa, visando o desenvolvimento e finalização de processo ou produto, também é assinado um Contrato de Cooperação Técnica.

Para o envio dos acessos para o exterior, são requeridas ao solicitante, as informações constantes nos documentos de requerimento de exportação (Import Permit) e assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) e/ou Acordo de Transferência de Material (ATM).

Após a assinatura da documentação, o material vegetal é multiplicado para ser possível o fornecimento de três amostras ao solicitante. Cada uma dessas amostras é representada por um tubo de ensaio contendo uma planta inoculada em meio nutritivo. Os tubos contendo os acessos a serem enviados são identificados com código e denominação de acessos, embalados em plástico-bolha, acondicionados em caixa de papelão e enviados com uma cópia da guia de remessa.

O atendimento da solicitação é realizado com a maior brevidade, sem prejudicar o trabalho de rotina da Coleção in Vitro.

Referências

FAO. **Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. 2. ed. Rome, 2014. 162 p. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i3704e/i3704e.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2020.

MURASHIGE T., SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-479, 1962.

² <http://alelobag.cenargen.embrapa.br/AleloConsultas/Home/index.do>

PARISA, A.; HANAFI, M. M.; MAHBOD, S.; HARIKRISHNA, J. A.; SIMA, T.; ALI, Y.; ABBAS, N. Epigenetic changes and their relationship to somaclonal variation: a need to monitor the micropropagation of plantation crops. **Functional Plant Biology**, v. 47, p. 508-523, 2020.

PATHIRANA R.; CARIMI, F. Review: Management and utilization of plant genetic resources for a sustainable agriculture. **Plants**, v. 11, n. 15 p. 1-38, 2022.

PEREIRA, J. E. S.; COSTA, F. H. da S. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L. P. (ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p.177-233.

SANTOS, I. R. I.; PADUA, J. G.; FLORES, P. S.; CASTRO, C. S. P. de; COUTINHO, M. V. **Coleções de recursos fitogenéticos (sementes, in vitro e criopreservação) do Banco Genético da Embrapa**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018. 20 p. (Requisitos Corporativos de Qualidade 1ª Cartilha).

SHAHZAD, A.; PARVEEN, S.; SHARMA, S.; SHAHEEN, A. Plant Tissue Culture: Applications in Plant Improvement and Conservation. In: ABDIN, M.; KIRAN, U.; KAMALUDDIN, A. (ed.). **Plant Biotechnology: principles and applications**. Singapore: Springer, 2017. p. 37-72.

Embrapa

Cerrados

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL