

Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Conservação *in vitro*

Foto: Kazumitsu Matsumoto



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 318

Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Conservação *in vitro*

Kazumitsu Matsumoto
Luciene Dionizio Cardoso
Izulmê Rita Imaculada Santos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Lucio Brunale*

Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*

Jonny Everson Scherwinski Pereira

José Roberto de Alencar Moreira

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Margot Alves Nunes Dode

Revisor técnico: Alessandra Pereira Fávero

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa: Kazumitsu Matsumoto

1^a edição (*on line*)

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Matsumoto, Kazumitsu.

Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Caracterização in vitro. / Kazumitsu

Matsumoto, Luciene Dionísio Cardoso e Izulmê Rita Imaculada Santos. – Brasília, DF:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

11 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 318)

Revisão técnica: Alessandra Pereira Fávero.

1. Recursos Genéticos Vegetal – Conservação. 2. Conservação in vitro. I. Cardoso, Luciene Dionísio. II. Santos, Izulmê Rita Imaculada. III. Título. IV. Série.

581.15 - CDD

Autores

Kazumitsu Matsumoto

Ph.D. em Agrobiologia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
kazumoto@cenargen.embrapa.br

Luciene Dionizio Cardoso

Assistente da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
luciene@cenargen.embrapa.br

Izulmê Rita Imaculada Santos

Ph.D. em Fisiologia do Estresse Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
izulme@cenargen.embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de Centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, Chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para os curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro
Chefe Geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Definição	08
Importância	08
Condições em que a conservação <i>in vitro</i> deve ser utilizada	08
Condições de conservação	09
Meio de cultura	09
Condições ambientais	09
Envio de germoplasma para conservação <i>in vitro</i>	09
Monitoração das coleções <i>in vitro</i>	09
Referências	11

Conservação *in vitro*

Kazumitsu Matsumoto
Luciene Dionizio Cardoso
Izulmê Rita Imaculada Santos

Defini o

Conservação *in vitro* compreende a manutenção de amostras de germoplasma vegetal utilizando-se a técnica da cultura de tecidos *in vitro*, em condições controladas de temperatura, fotoperíodo e em meio de cultura que favoreça o crescimento lento dos propágulos. A manutenção de uma coleção *in vitro* é garantida pela adoção de um conjunto de medidas científicas, técnicas e operacionais, a fim de evitar a deterioração das amostras por meio da transferência periódica dos propágulos vegetais para frascos contendo meio de cultura novo, em condições assépticas. A conservação *in vitro* é uma metodologia que permite a conservação a médio prazo de germoplasma vegetal.

Importância

Condições em que a conservação *in vitro* deve ser utilizada

Este método é aplicável para espécies de propagação vegetativa ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias. Nestas situações, podem ser usados métodos de conservação em campo ou conservação *in vitro*. Quando comparada com a conservação de amostras em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) em campo, a conservação *in vitro* apresenta uma série de vantagens, como, por exemplo, reduzido risco de perda por desastres climáticos e ataques de pragas e doenças. Por outro lado, tem a desvantagem de exigir uma infraestrutura mais sofisticada e mão de obra especializada. Existe, ainda, o risco de ocorrência de variação somaclonal, que aumenta no decorrer do tempo de armazenamento, quando os acessos conservados *in vitro* passaram por sucessivos subcultivos, durante longos períodos de tempo. Este problema pode ser reduzido com a criação de condições de cultivo que permitam o maior espaçamento entre os intervalos de subcultivo e a transferência periódica dos acessos para casa de vegetação ou para o campo para revitalização e subsequente reintrodução *in vitro*. Além da conservação, os acessos *in vitro* também são utilizados para auxiliar no intercâmbio de germoplasma.

Condições de conservação

Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados para a conservação *in vitro* são os mesmos adotados para a cultura de tecidos em geral. Entretanto, algumas alterações são introduzidas para promover a redução do crescimento das plantas e aumentar o intervalo entre os subcultivos. Estas alterações compreendem a redução na concentração dos sais, vitaminas e fonte de energia (açúcar) que compõem o meio. Também podem ser adicionados compostos que têm efeito redutor do crescimento, como sorbitol e manitol, em concentrações que devem ser definidas experimentalmente.

Condições ambientais

A temperatura para conservação *in vitro* é fixada por volta de 20°C para as espécies tropicais que não toleram exposição a temperaturas mais baixas do que esta. As espécies de clima subtropical e temperado podem ser mantidas a temperaturas mais baixas, que variam de 10 a 15°C. A diminuição da intensidade luminosa também pode se utilizada para reduzir o crescimento das plantas. Entretanto, esta redução não pode ser muito drástica, pois pode causar estiolamento e impedir a ativação da clorofila, causando reduções muito intensas de crescimento e, eventualmente, a morte da planta.

Envio de germoplasma para conservação *in vitro*

Materiais ou acessos podem ser recebidos *in vitro* (tubos ou frascos) ou *ex vitro* (ramos, brotos ou mudas). Em qualquer dos dois casos, devem ser enviados os dados de passaporte do material. Acessos enviados *in vitro* devem ser acompanhados de todas as informações referentes às condições de cultivo do material até o momento do envio, incluindo: origem do material, data e local de coleta, data de introdução *in vitro*, meios de cultura utilizados, condições de cultivo, número de subcultivos e protocolo de aclimatação das plântulas para seu estabelecimento em campo. No caso do material enviado *ex vitro*, as informações devem ser: origem do material, data e local de coleta, tratamentos feitos para preparar o material para envio, além de todas as informações que puderem ser fornecidas sobre o material.

O tempo necessário desde o envio do material (mudas ou brotos) até este estar conservado seguramente *in vitro* varia de espécie para espécie. De modo geral, em 30 dias o material já está estabelecido *in vitro* e pode ser incluído na câmara de conservação, desde que esteja em condições adequadas.

Monitoração das coleções *in vitro*

Critérios para monitoramento podem variar de espécie para espécie, mas devem ser os critérios avaliáveis externamente, sem a abertura da tampa do tubo de ensaio, para não haver risco de contaminação microbiana. Além disso, recomenda-se a utilização de critérios simples que permitam uma avaliação rápida, porque há a necessidade de se avaliar um grande número de acessos. Nossa laboratório utiliza o seguinte formulário para monitoração:

MONITORAÇÃO DE ACESSO DE GERMOPLASMA							
Data de monitoração (dd/mm/aa):			Produto / Nome comum:			Nome do técnico:	
Código do protocolo (CCG)	Denominação (BRA, BGM, etc.)	Data da última repicagem dd/mm/aa	Meio de cultura usado	Número total de tubos por acesso	Contaminação por fungo	Contaminação por bactéria	
			Sem contaminação mas morto	Altura da planta sem crescimento (<10mm)	Altura da planta abaiixo do meio tubo	Altura da planta atingida ao topo	Raiz ausente
				Altura da planta a meio tubo (75-150mm)	Altura da planta	Existe tubérculos (batata)	meio ressecado com ou sem rachadura
						Existe Brotações	Tubo vazio para proxima repicagem (existe pelo menos 1 sema viva)
						Existe Folhas verdes	Necessita repicagem (sim=1; não=0)
						Planta crescia sem folha	
						Planta crescia Apice morto	
							Número de Grade

Figura 1. Tipo de ficha para monitoração de acessos de germoplasma cultivados *in vitro*.

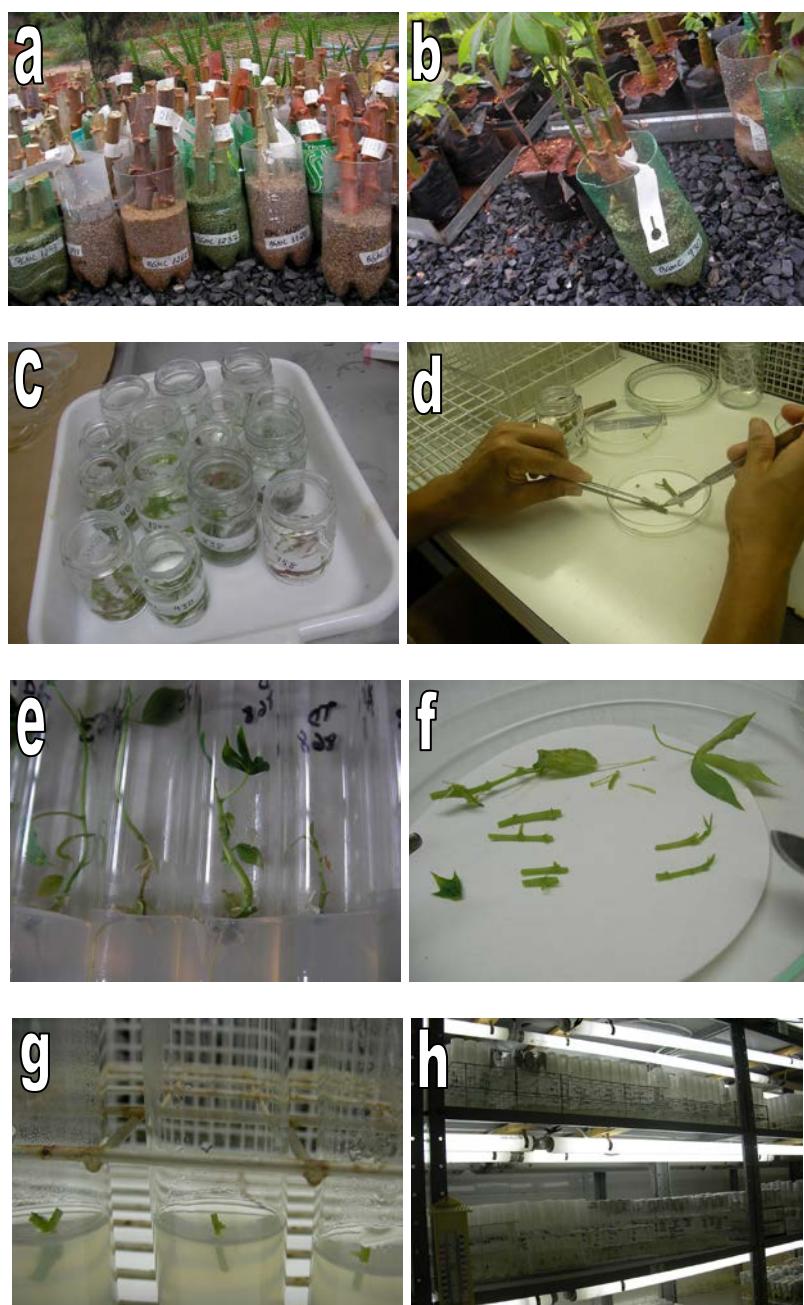


Figura 2. Estabelecimento *in vitro* e repicagem de mandioca para a conservação de germoplasma. (a) Ramos recebidos são plantados em vermiculita; (b) gemas em brotação; (c) desinfestação de ramos com gemas pela solução de hipoclorito de sódio; (d) extração de gemas na câmara de fluxo laminar; (e) plântulas *in vitro* em crescimento; (f) repicagem de gemas para subcultura; (g) explantes de gemas recém-inoculadas em tubo; (h) culturas mantidas em câmara de crescimento.

Referências

- ENGELMANN, F. In vitro germplasm conservation. **Acta Hort.**, v. 461, p. 41-47, 1998.
- REED, B. M.; ENGELMANN, M. E.; DULLOO, M. E.; ENGELS, J. M. M. **Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections**. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 2004. 106 p. (IPGRI Handbooks for Genebanks, n. 7).
- SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, M. A.; SUBAIH, W. S.; AJLOUNI, M. M. In vitro conservation of plant genetic resources: a review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, n. 4, p. 372-382, 2006.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

