

# Conservação *ex situ* de germoplasma

## ■ Sementes Ortodoxas

### ■ Características:

- Temperatura baixa:  $-18^{\circ}\text{C}$
- Conteúdo de umidade da semente: 3-7%
- Umidade relativa.
- Sobrevivem por muitos anos em câmara fria.



## ■ Sementes recalcitrantes

### ■ Características

- Contaminação microbial;
- Germinação durante a conservação

### ■ Plantas tropicais;

- Mantidas no campo;
- Cultivo *in vitro*;
- Criopreservação



# Conservação dos RGV

- **Conservação de Germoplasma**
  - **Etapas de um programa de conservação *ex situ***
    - **Aquisição do germoplasma:**
      - Coleta
      - Intercâmbio ou doação.
    - **Multiplicação do germoplasma;**
    - **Conservação propriamente dita;**
    - **Caracterização e Avaliação;**
    - **Coleta de dados e análise;**
    - **Utilização e distribuição.**

# O que conservar? Tipos de Germoplasma

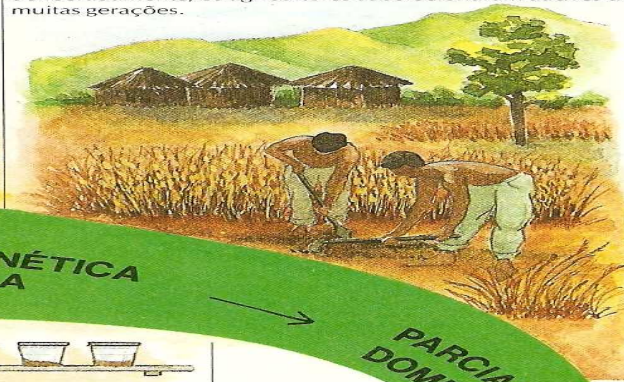
## 1. Parentes silvestres

Os parentes silvestres das plantas cultivadas compartilham ancestrais comuns com as plantas cultivadas, mas mantiveram-se silvestres como produtos da natureza.



## 2. Populações locais e cultivares primitivas

Variedades cultivadas locais desenvolvidas em sistemas agrícolas primitivos. Em lugar de serem melhoradas deliberadamente, os agricultores as selecionaram através de muitas gerações.



SILVESTRE

BASE GENÉTICA AMPLA

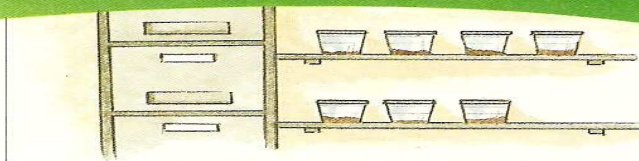
PARCIALMENTE DOMESTICADA

BASE GENÉTICA ESTREITA

DOMESTICADA

## 3. Cultivares obsoletas

As cultivares obsoletas, não utilizadas nas primeiras épocas do melhoramento genético, agora são encontradas principalmente nas coleções de germoplasma.



## 4. Linhas avançadas de melhoramento, mutações e outros produtos dos programas de melhoramento

As linhas e estirpes avançadas de melhoramento são plantas desenvolvidas pelos melhoristas para serem usadas no melhoramento vegetal moderno. Incluem cultivares que ainda não estão em condições de serem distribuídas aos agricultores.

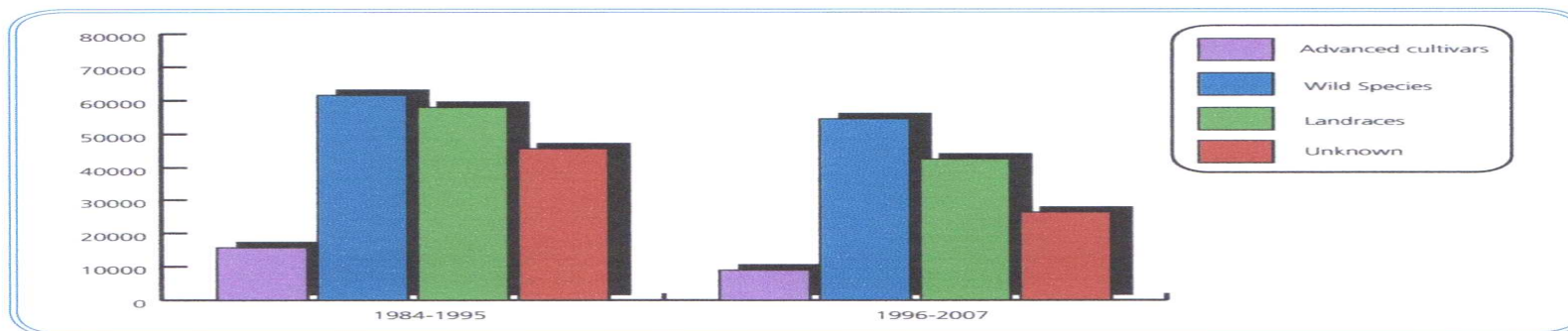


## 5. Cultivares modernas

As cultivares de elite de alta produtividade têm sido desenvolvidas, por meio de melhoramento vegetal, para a agricultura intensiva moderna.

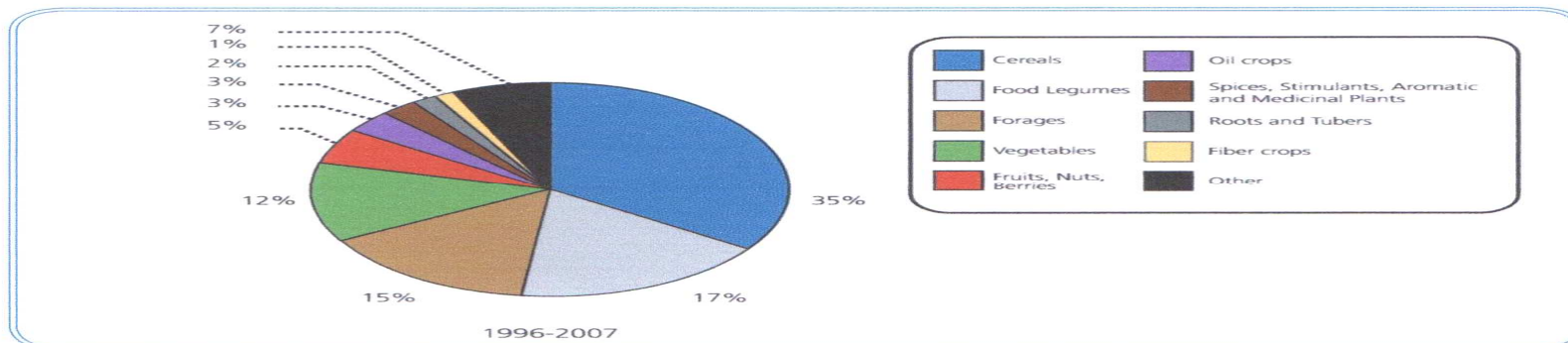


**FIGURE 3.3**  
**Type of accessions collected by selected genebanks over two time periods, 1984-95 and 1996-2007**



Source: genebanks of the NPGS of USDA (source: GRIN, 2008); 234 genebanks from Europe (source: EURISCO, 2008); 12 genebanks from SADC (source: SDIS, 2007); NGBK (Kenya) (source: dir. info., 2008); INIAP/DENAREF (Ecuador) (source: dir. info., 2008); NBPGR (India) (source: dir. info., 2008); IRRI, ICARDA, ICRISAT and AVRDC (source: dir. info., 2008); CIP, CIMMYT, ICRAF, IITA, ILRI and WARDA (source: SINGER, 2008)

**FIGURE 3.4**  
**Accessions collected by selected genebanks over the period 1996-2007 according to crop group**

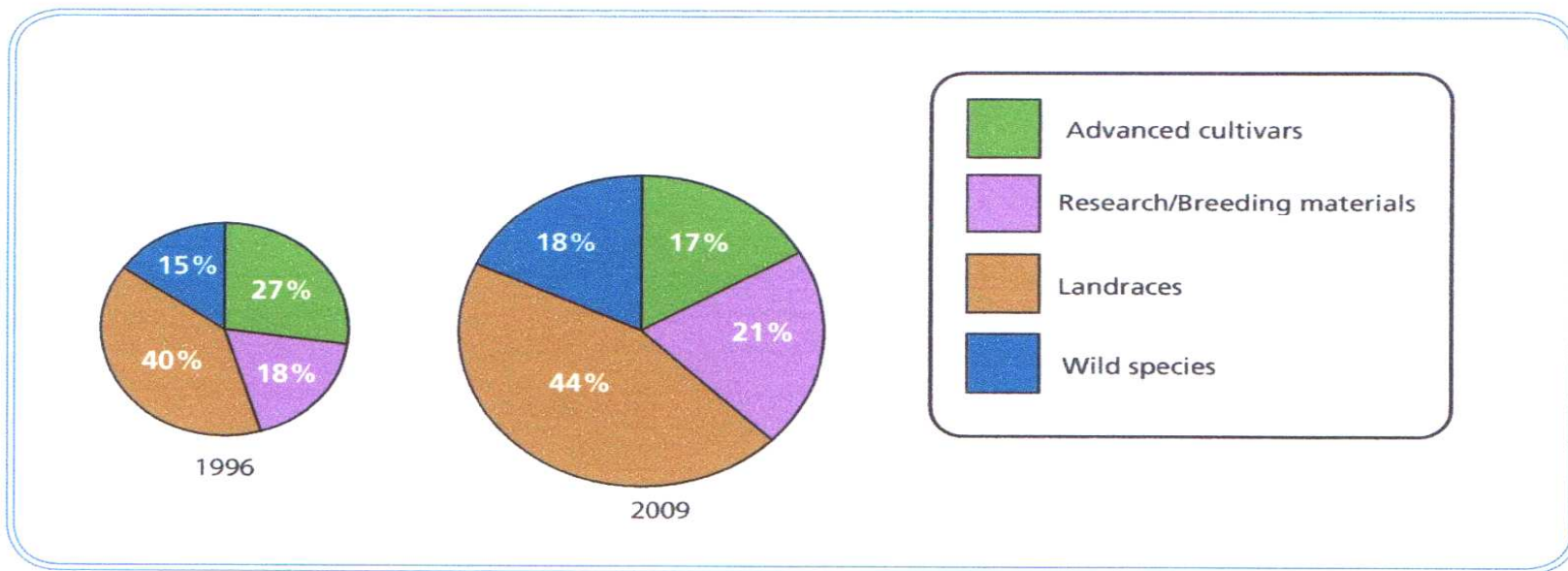


Source: 31 genebanks of the NPGS of USDA (source: GRIN, 2008); 234 genebanks from Europe (source: EURISCO, 2008); 12 genebanks from SADC (source: SDIS, 2007); NGBK (Kenya) (source: dir. info., 2008); INIAP/DENAREF (Ecuador) (source: dir. info., 2008); NBPGR (India) (source: dir. info., 2008); IRRI, ICARDA, ICRISAT and AVRDC (source: dir. info., 2008); CIP, CIMMYT, ICRAF, IITA, ILRI and WARDA (source: SINGER, 2008)

# Tipo de acessos conservados na coleções

**FIGURE 3.6**

Types of accessions in *ex situ* germplasm collections in 1996 and 2009 (the size difference in the charts represents the growth in total numbers of accessions held *ex situ* between 1996 and 2009)

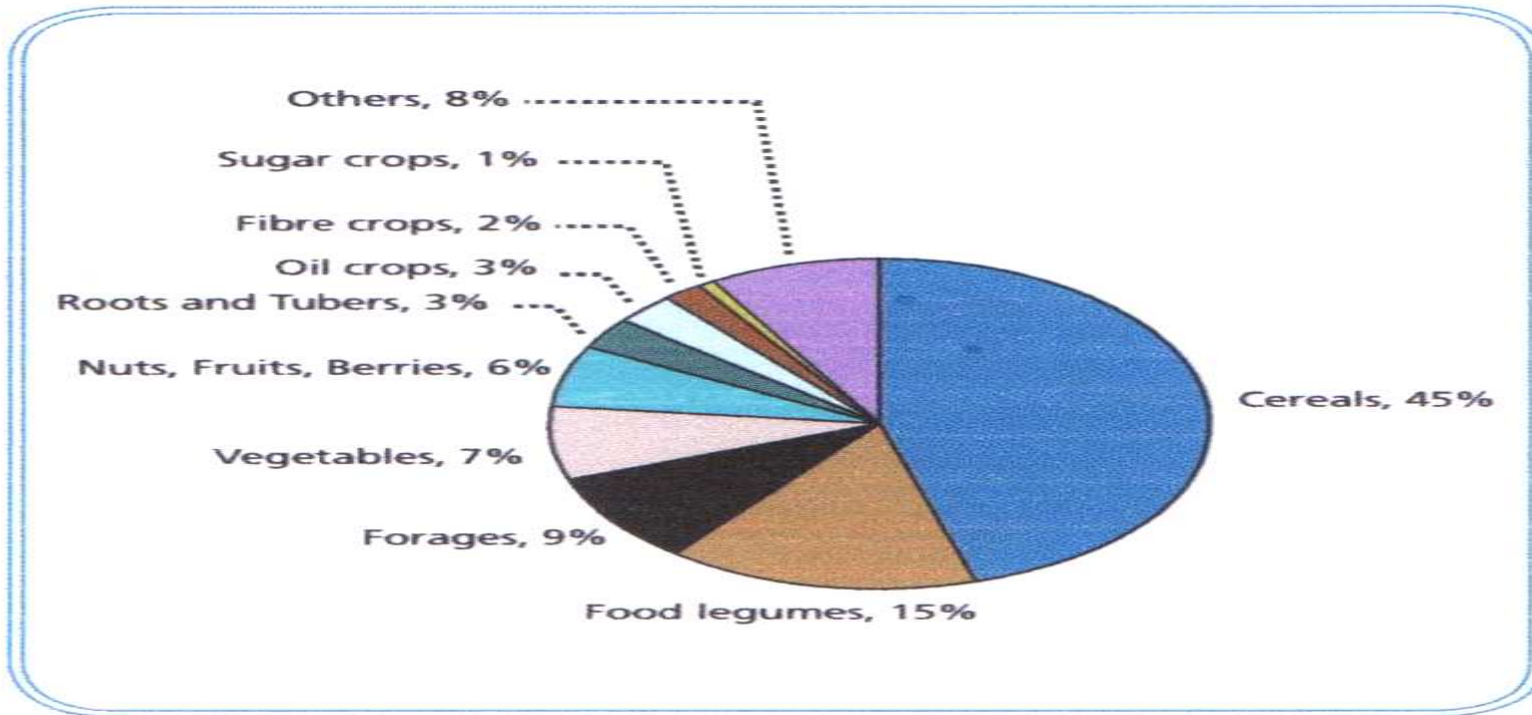


Source: WIEWS 1996 and 2009

**FIGURE 3.5**

**Contribution of major crop groups in total *ex situ* collections**

---



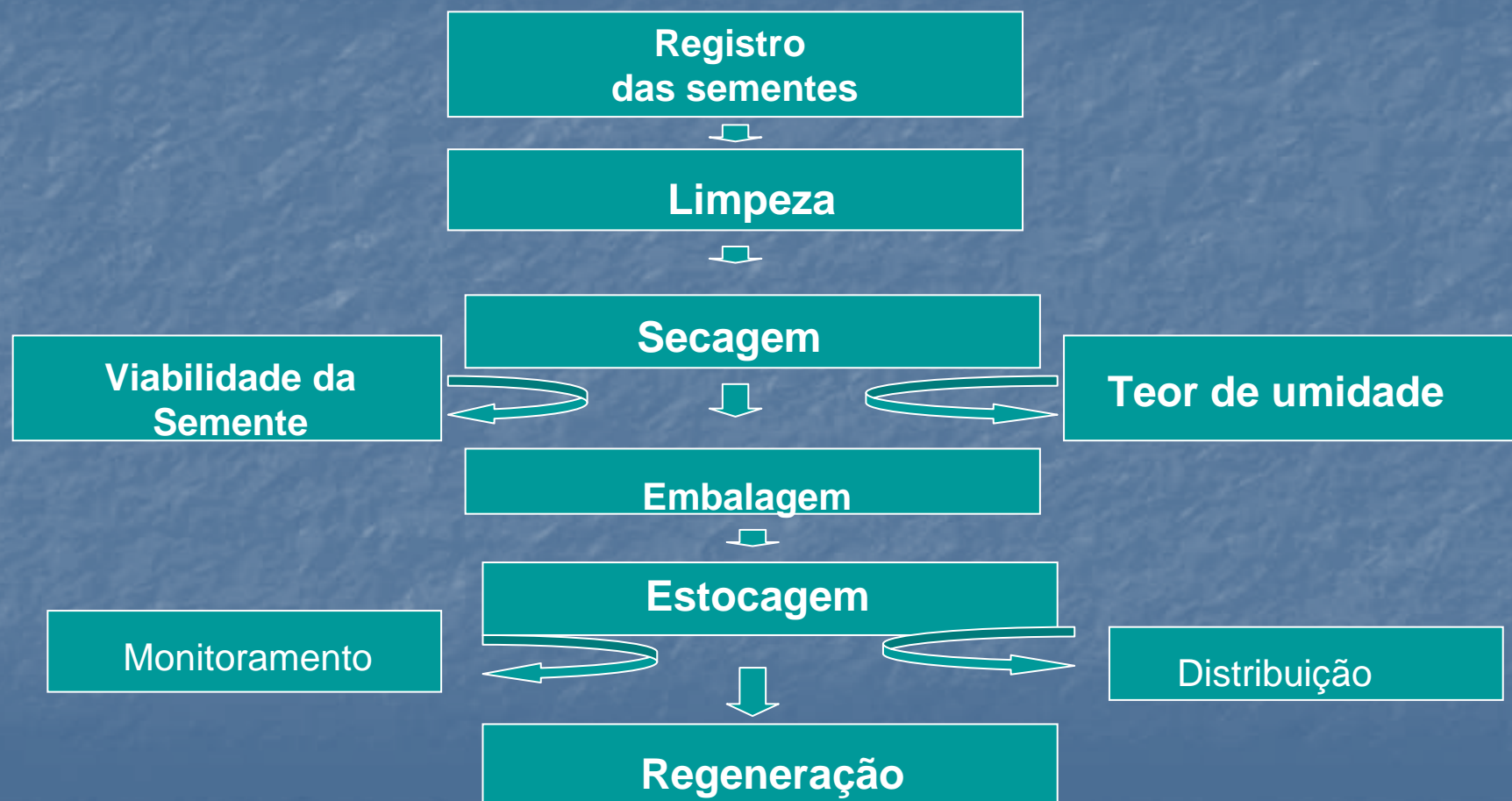
<b>Grupo</b>	<b># Acessos</b>	<b>Silvestre (%)</b>	<b>Raças locais (%)</b>	<b>Material Elite (%)</b>	<b>Cultivares (%)</b>	<b>Outros (%)</b>
<b>Cereais</b>	<b>3.157.578</b>	<b>5</b>	<b>29</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>43</b>
<b>Legumes</b>	<b>1.069.897</b>	<b>4</b>	<b>32</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>49</b>
<b>Raízes e Tubérculos</b>	<b>204.408</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>37</b>
<b>Hortaliças</b>	<b>502.889</b>	<b>5</b>	<b>22</b>	<b>8</b>	<b>14</b>	<b>51</b>
<b>Nozes, frutas e berries</b>	<b>423.401</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>45</b>
<b>Oleaginosas</b>	<b>181.752</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>47</b>
<b>FORAGEIRAS</b>	<b>651.024</b>	<b>35</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>45</b>
<b>Açucareiras</b>	<b>63.474</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>Fibras</b>	<b>169.969</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>57</b>
<b>Medicinais, aromáticas e especiarias</b>	<b>160.050</b>	<b>13</b>	<b>24</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>47</b>
<b>Industriais</b>	<b>152.325</b>	<b>46</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>47</b>

# Banco de sementes





# Fluxograma de um Banco de Sementes



# Registro das sementes

**Checar a lista de acompanhamento do lote**

**Checar se já existe material similar na coleção**

**Checar as condições da sementes**

**As sementes estão em boas condições?**

**Decidir se o lote será mantido no banco**

**Dar uma identificação ao lote**

**Entrar com os dados do lote no banco**

# Banco Global de Sementes - Noruega

Maior banco do mundo  
Conservação a longo prazo  
4 milhões e 500 mil amostras;  
- 18oC, 3 câmeras de segurança máxima  
Túnel de 125m;

Baixa temperatura e baixa umidade: ártico

Conservação longa  
Cevada: 2000 anos;  
Trigo: 1.700 anos;  
Sorgo: 20 mil anos.

Em 2009:  
664 gêneros, 3.286 espécies  
412.446 acessos  
204 países

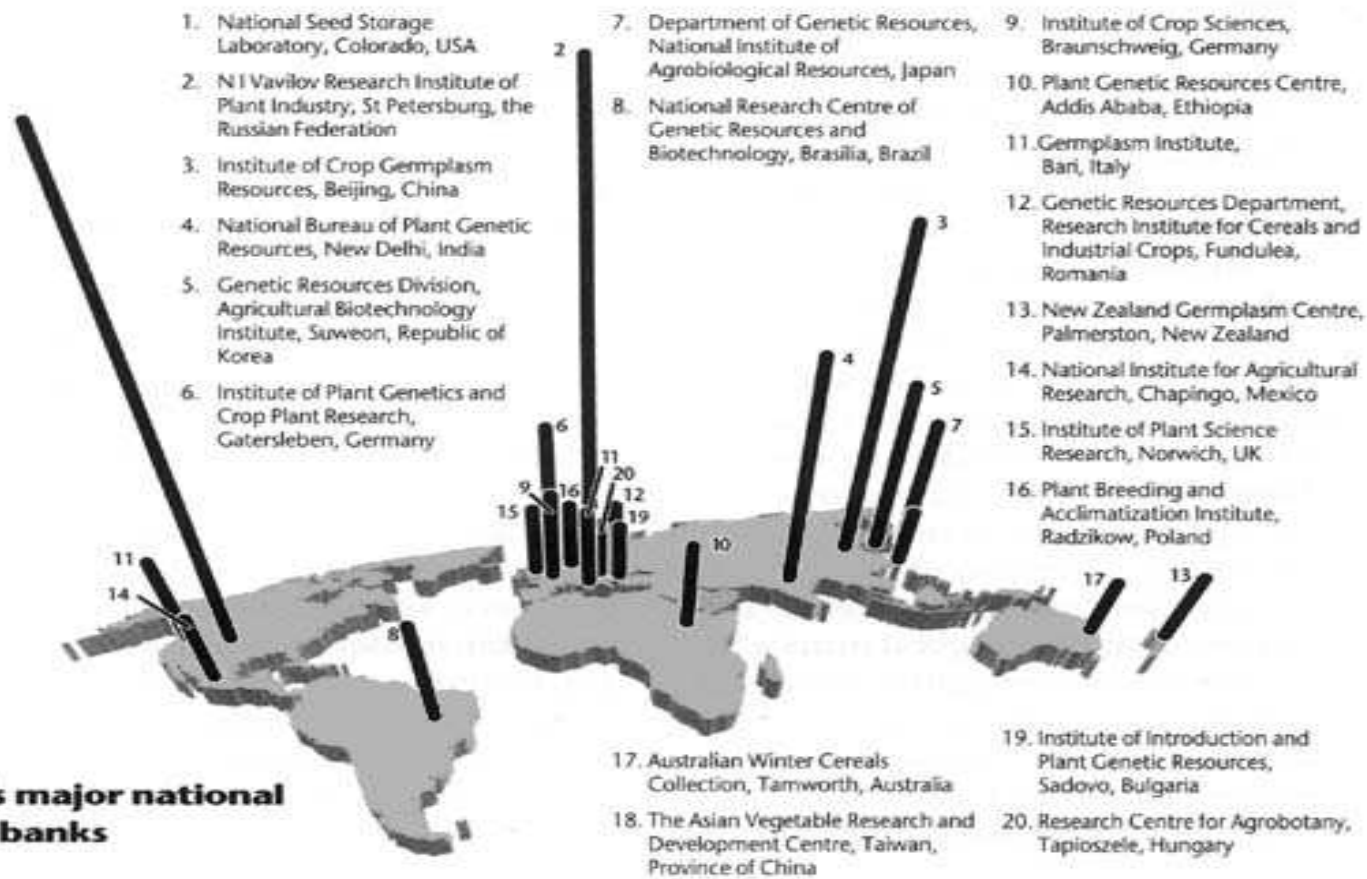


TABLE 1.2

Comparison between the collections maintained by selected national genebanks in 1995 and 2008<sup>a</sup>

Country	Genebank	1995 (no.)			2008 (no.)			Change (%)		
		Genera <sup>b</sup>	Species	Accessions	Genera	Species	Accessions	Genera	Species	Accessions
Brazil	CENARGEN	136	312	40 514	212	670	107 246	56	115	165
Canada	PGRC	237	1 028	100 522	257	1 166	106 280	8	13	6
China	ICGR-CAAS	-	-	358 963	-	-	391 919	-	-	9
Czech Republic	RICP	34	96	14 495	30	175	15 421	-12	82	6
Ecuador	INIAP/DENAREF	207	499	10 835	272	662	17 830	31	33	65
Ethiopia	IBC	71	74	46 322	151	324	67 554	113	338	46
Germany	IPK Gatersleben <sup>c</sup>	633	2 513	147 436	801	3 049	148 128	27	21	0
Hungary	ABI	238	742	37 969	294	915	45 321	24	23	19
India	NBPGR	73	177	154 533	723	1 495	366 333	890	745	137
Japan	NIAS	-	-	202 581	341	1 409	243 463	-	-	20
Kenya	KARI-NGBK	140	291	35 017	855	2 350	48 777	511	708	39
Nordic Countries	NGB <sup>d</sup>	88	188	24 241	129	319	28 007	47	70	16
Russian Federation	VIR	262	1 840	328 727	256	2 025	322 238	-2	10	-2
Netherlands	CGN	30	147	17 349	36	311	24 076	20	112	39
Turkey	AARI	317	1 941	32 122	545	2 692	54 523	72	39	70
United States of America	NPGS <sup>e</sup>	1 582	8 474	411 246	2 128	11 815	508 994	35	39	24
<b>Average</b>		<b>289</b>	<b>1 309</b>	<b>140 205</b>	<b>502</b>	<b>2 098</b>	<b>178 294</b>	<b>74</b>	<b>60</b>	<b>27</b>

**The world's major national plant gene banks**

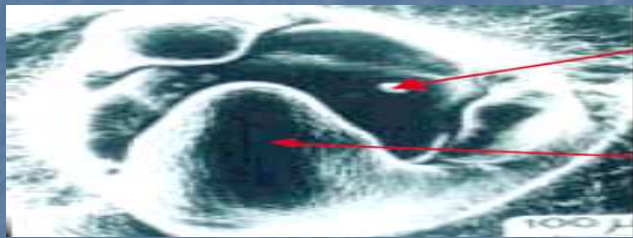


# Bancos de germoplasma



## Conservação de germoplasma *in vitro*

- **Cultura de Tecido:** cultivo de tecidos ou órgãos em meio de cultura propiciando assim a regeneração de uma planta a partir de um explante.
- **Explantes:** folhas, sementes, meristemas



MA  
PF } AC



# Características da CT

## ■ Fases do Crescimento

- Lento
- Rápido: crescimento exponencial
- Estacionário: # células permanece constante
- Esgotamento dos nutrientes
- Tendência: morte do material
- Tempo: Varia de 1-6 semanas
  - Espécie
  - Tipo de cultura
- Manutenção *in vitro*
  - Trabalhosa

## ■ Métodos

- Sistema de Crescimento Lento
- Criopreservação



# Tipos de Cultura de Tecido

- **Calo**
  - Mudanças genéticas
    - Mutações
    - Rearranjos cromossômicos
- **Meristema**
  - Eliminação de vírus

## Cultura de embrião somático

- Cenoura
- N líquido

## Cultura de embrião zigótico

- Dendê
- N líquido
- 8 meses

# Vantagens da CT

- ❖ Alta taxa de multiplicação;
- ❖ Rapidez;
- ❖ Controle das condições de cultivo;
- ❖ Propagação contínua ao longo do ano;
- ❖ Propágulos livres de doenças e pragas;
- ❖ Custo baixo uma vez estabelecido e otimizado o protocolo;
- ❖ Espaço reduzido;
- ❖ Armazenamento a longo prazo de germoplasma;
- ❖ Adaptado para plantas de difícil propagação.

## Desvantagens da CT

- ❖ Exige instalações e equipamentos especializados;
- ❖ A capacitação tecnológica deve ser maior;
- ❖ Os protocolos regenerativos não estão disponíveis para todas as espécies;
- ❖ Laboratórios são caros para instalar e manter.

## Etapas da propagação via CT

- ❖ Estágio 0 – Seleção de planta matriz e escolha do *explante*;
- ❖ Estágio I – Estabelecimento da cultura asséptica;
- ❖ Estágio II – Multiplicação;
- ❖ Estágio III – Enraizamento;
- ❖ Estágio IV – Aclimatização *in vitro* ou *ex vitro*.

# Gêneros que podem ser cultivados *in vitro*

## Propagação assexuada

*Solanum*  
*Manihot*  
*Musa*  
*Ipomoea*  
*Xanthosoma*  
*Colocasia*  
*Dioscorea*  
*Canna*  
*Vitis*  
*Olea*  
*Ananas*  
*Ficus*  
*Agave*  
*Vanilla*  
*Piper*  
*Saccharum*  
*Tubérculos andinos*

## Propagação sexuada

*Citrus*  
*Elaeis*  
*Coccus*  
*Malus*  
*Persea*  
*Mangifera*  
*Mcadamia*  
*Anacardium*  
*Theobroma*  
*Hevea*  
*Chinchona*  
*Cinnamotium*  
*Coffea*  
*Camellia*  
*Artocarpus*

# Crescimento Lento

## Vantagens

- Reduz o trabalho de sub-cultivo
- Deve ser mantido sob condições subótimas
- Reduz a taxa de crescimento
- Permite mudanças genéticas
- Não é adequado para conservação a longo tempo

## Redução de Temperatura

- 20 a 25 °C: Condição ideal
- 6 a 12 °C: Conservação
- Tropicais
  - 30 °C: Ideal
  - 20 °C: Conservação

## Químicos com Ação Retardante

- Manitol
- Ácido abcísico (ABA)
- *Solanum*
  - Temperatura normal de 22 °C
  - Adição de 5-10 mg/l de ABA
  - 63 % de sobrevivência
  - 12 meses
- **Mandioca**
  - 4% sacarose + 0,01 mg/l BAP ou 2% sacarose + 0,05 mg/l BAP
  - Temperatura: 20 °C
  - Taxa de sobrevivência: 95%
  - Período de Conservação: 15 meses

## Crescimento Lento (Cont.)

- Redução do tempo entre sub-cultivos
  - *Solanum* spp.
    - 20 ml de meio de cultura líquido
    - 60 ml de meio de cultura líquido
    - Temperatura 10 °C
    - Período: 18 meses
    - Taxa de sobrevivência: 100%
  - *Fragaria* spp. (morangos)
    - Meristema
    - Escuro 4 °C
    - Checado a cada 3 meses
    - Adição de 1 a 2 gotas do meio nas culturas que se mostravam ressecadas
    - Durante 6 anos
    - Crescimento normal

# Criopreservação

## ■ Técnica

- Utilizada para conservação de longa duração
- Crioprotetor
- Resfriamento rápido
- Conservação em N líquido (- 196 °C)
- Período indeterminado
- Redução de trabalho de repicagem

## ■ Fases

- Fase de pré-crescimento
  - Células em crescimento exponencial
  - Uso de crioprotetores ainda nesta fase
- Crioprotetor
  - Baixar a temperatura de congelamento das células
  - Reduzir a cristalização do gelo
  - Podem ser usados sozinhos ou em combinação
- Congelamento propriamente dito
  - Colocar os explantes em frascos apropriados para o congelamento
- Conservação em N líquido
- Descongelamento
  - Ponto crítico



# Criopreservação

## ■ Vantagens

- Conservação por tempo indeterminado;
- Preservação das estruturas (células, tecidos e órgãos);
- Evita a variação somaclonal;
- Em BG é um processo econômico

## ■ Desvantagens

- Complexidade técnica e biológica dos processos de congelamento e descongelamento;
- Cada cultura exige um procedimento específico exigindo assim o desenvolvimento de um protocolo para cada espécie.
- Problemas na regeneração das plantas após o resfriamento devido a formação de cristais de gelo.

**TABELA 1** - Lista de algumas espécies de plantas de importância econômica criopreservadas com sucesso.

Grupo/Espécie	Explante Técnica	Sobrevivência (%)	Referência
<b>a) Raízes, bulbos e tubérculos</b>			
Alho ( <i>Allium sativum</i> L.)	M/V	90	Niwata, 1995
Batata inglesa ( <i>Solanum</i> spp.)	A/E-D	10	Fabre e Dereuddre, 1990
Batata-doce ( <i>Ipomea batatas</i> L.)	A/V	23	Schneibel-Preikstas <i>et al.</i> , 1992
Mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz)	EZ/CL-R	97	Marin <i>et al.</i> , 1990
<b>b) Cereais e gramíneas</b>			
Trigo ( <i>Triticum</i> spp.)	EZ/CL	70	Bajaj, 1983
Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	EZ/CL	80	Delvallée <i>et al.</i> , 1989
Cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinale</i> L.)	A/E-D	38-91	Paulet <i>et al.</i> , 1993
<b>c) Plantas ornamentais</b>			
Cravo ( <i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	G/CL	90	Dereuddre <i>et al.</i> , 1988
Crisântemo ( <i>Chrysanthemum</i> spp.)	A/CL	90	Fukai, 1990
<b>d) Frutíferas tropicais e temperadas</b>			
Banana ( <i>Musa</i> spp.)	SC/CL	42	Panis <i>et al.</i> , 1990
Citrus ( <i>Citrus sinensis</i> [L.] Osb.)	ES/CL	5	Marin e Duran-Vila, 1988
Maçã ( <i>Malus</i> spp.)	G/CL	-	Stushnoff e Seufferheld, 1995
Morango ( <i>Fragaria</i> spp.)	SC/V	87	Yonjie <i>et al.</i> , 1997
Pêra ( <i>Pyrus communis</i> L.)	A/E-D	47	Dereuddre <i>et al.</i> , 1990
Videira ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	A/E-D	30	Plessis <i>et al.</i> , 1993
<b>e) Leguminosas e oleaginosas</b>			
Amendoim ( <i>Arachis hypogea</i> L.)	EZ/CL	90	Runthala <i>et al.</i> , 1993
Côco ( <i>Cocos nucifera</i> L.)	EZ/V	10-43	Assy-Bah e Engelmann, 1992
Grão-de-bico ( <i>Cicer</i> spp.)	A/V	60	Bajaj, 1995
Oliveira ( <i>Olea europaea</i> L.)	EZ/D	70	Gonzales-Rio <i>et al.</i> , 1994
<b>f) Estimulantes, medicinais e aromáticas</b>			
Cafê ( <i>Coffea arabica</i> L.)	EZ/D	95	Abdelnour <i>et al.</i> , 1992
Chá ( <i>Camellia sinensis</i> [L.] O. Kuntze)	EZ/D	95	Chaudhury <i>et al.</i> , 1990

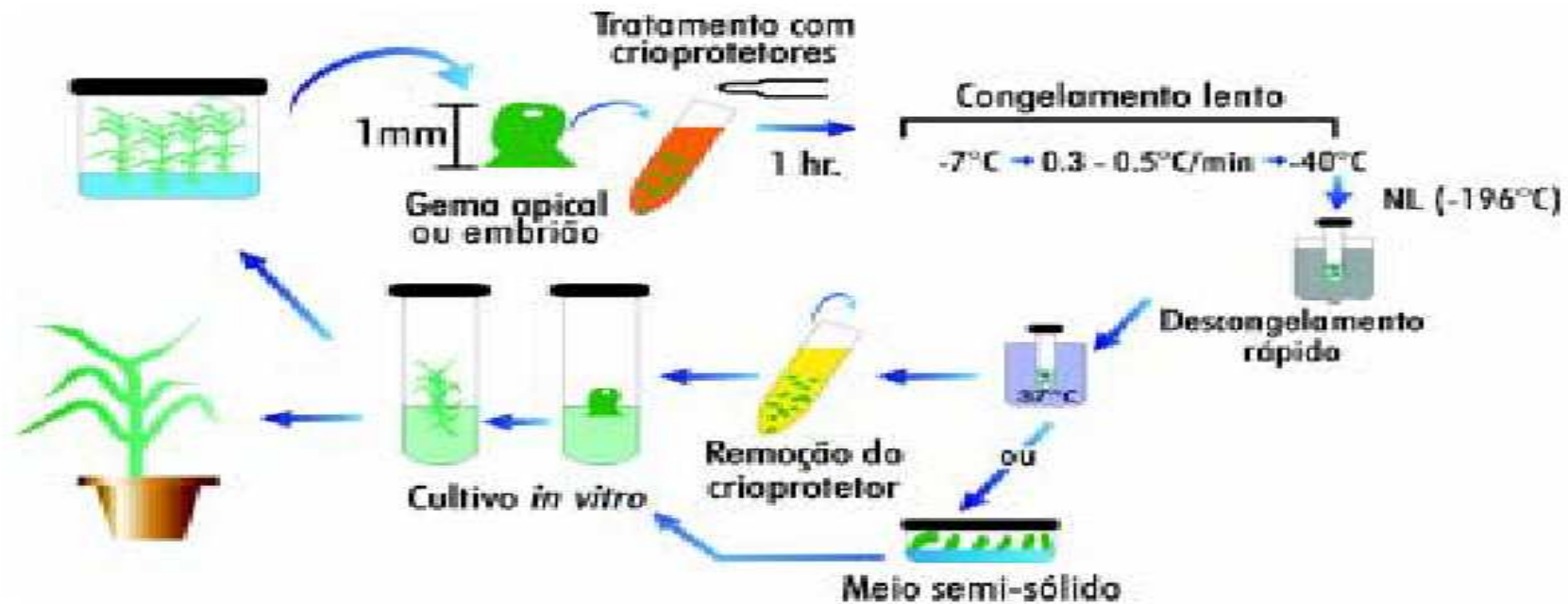
Tipo de material: A – ápice caulinar; ES – embrião somático; EZ – embrião zigótico; G – gema lateral; M – meristema; SC – suspensão celular;

Técnica de congelamento: CL – congelamento lento; CL-R - congelamento lento e rápido; D – desidratação; E-D – encapsulamento-desidratação; V – vitrificação.

# Criopreservação



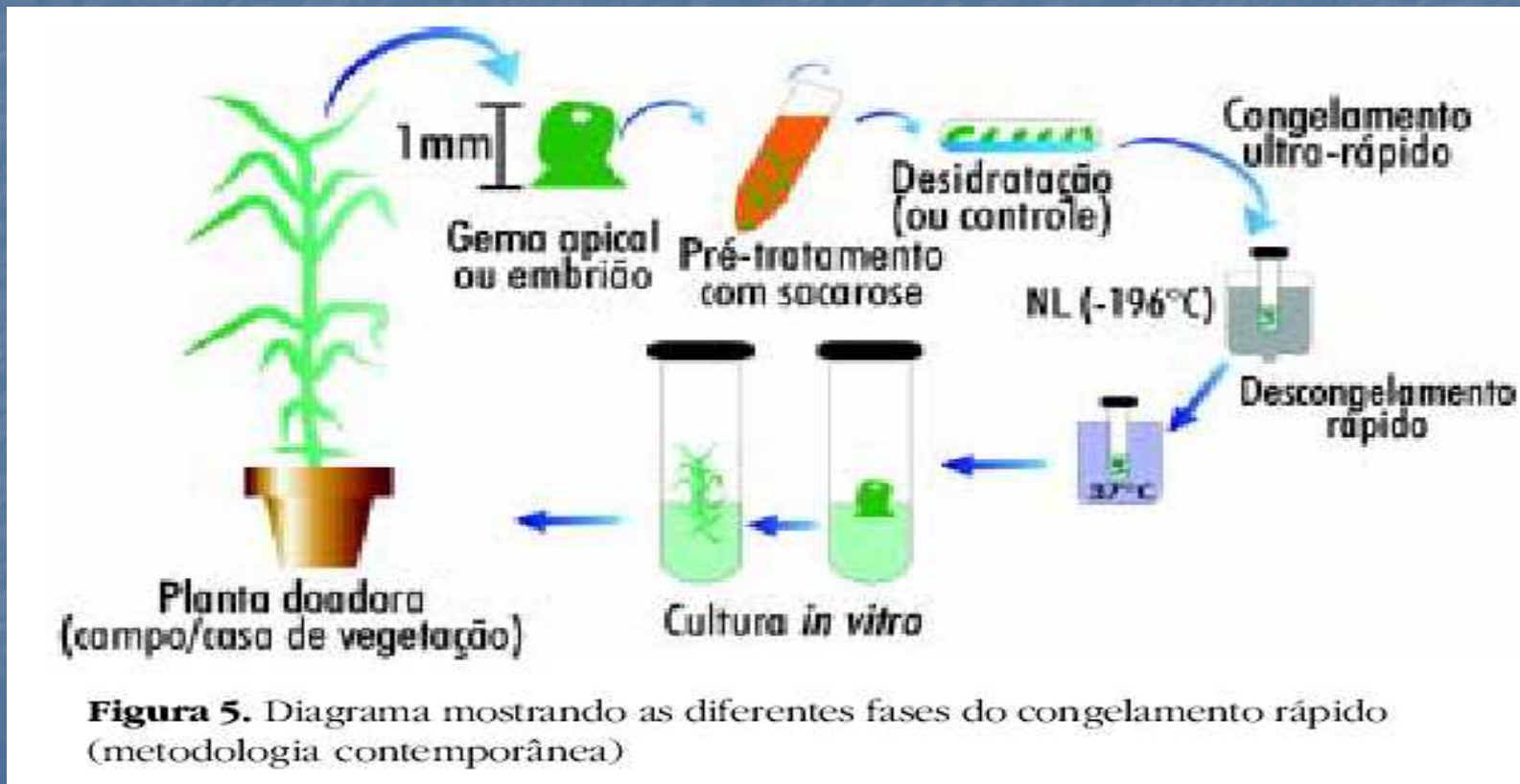
# Criopreservação: Metodologia Clássica



**Figura 4.** Diagrama mostrando as diferentes etapas do congelamento lento (metodologia clássica)

Fonte: Santos, I.R.I. 2001. *Biotecnologia*. 20: 60-65

# Criopreservação: Congelamento rápido



**Figura 5.** Diagrama mostrando as diferentes fases do congelamento rápido (metodologia contemporânea)

Fonte: Santos, I.R.I. 2001. Biotecnologia. 20: 60-65

# Vitrificação

- É o processo pelo qual a água sofre uma transição de fase líquida para um estado sólido amorfo e estável.
- É obtida experimentalmente através da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não existe água livre para a cristalização antes de mergulhar no N líquido.
- **Desidratação**
  - Evaporação da água
  - Tratamento com crioprotetores em alta concentração:
    - Dimetilsulfóxido (DMSO)
    - Etileno glicol;
    - Metanol;
    - glicerol.;
    - Propileno glicol.
      - Causam citotoxicidade
    - Açúcares
      - sacarose, trealose, e glucose

# Encapsulamento-desidratação

- Um método alternativo à desidratação celular induzida pelo congelamento antes da imersão no N líquido
  - **Dereuddre et al., 1990**
- *Explantes* são encapsulados sem cápsulas de gel de alginato de sódio, as quais são então pré-cultivadas em um meio contendo altos níveis de sacarose, desidratados por exposição ao ar da capela de fluxo laminar ou com sílica gel, diretamente imersos em N líquido, e lentamente descongelados.

# Variação Somaclonal

- ❖ Variabilidade em indivíduos resultantes da cultura de tecidos vegetais, notadamente aqueles regenerados a partir de calos.
- ❖ As variações ou alterações podem ser genotípicas ou fenotípicas, genéticas e epigenéticas:
  - ✓ **Genéticas:** mudanças no número cromossômico (poliploidia e aneuploidia); na estrutura cromossômica (translocações, deleções e duplicações) e nas sequências de DNA (mutações de bases).
  - ✓ **Epigenéticas:** gene, amplificação gênica e metilação gênica.





*Variação somaclonal em plantas de Rhododendron derivadas de gemas adventícias (calos)*

# Variação somaclonal

## ❖ **Vantagens:**

- ✓ Melhoramento de plantas: criação de variabilidade genética adicional, associada p. ex. à resistência à estresses bióticos e abióticos e ao aumento da produção de metabólitos secundários de interesse.

- ❖ **Desvantagens:** produção de *off-types*. Quando o objetivo é fixar um genótipo a variação somaclonal é altamente

## ❖ **Como evitar:**

- ✓ Evitar calos;
- ✓ Limitar o número de sub-cultivos;
- ✓ Reiniciar as culturas a partir das plantas matrizes;
- ✓ Evitar fitorreguladores em altas concentrações.

# Conservação de grãos de pólen

- ❖ Consiste em coletar os grãos de pólen e conserva-los para uso posterior.
- ❖ Principal uso: cruzamento entre plantas
- ❖ **Vantagens**
  - Dispensa a quarentena
  - Grandes amostras podem ser conservadas
  - Ocupam pouco espaço
- ❖ **Desvantagens**
  - Herança citoplasmática não é preservada
  - Não gera uma planta a não ser após cruzamento com outro material adequado
  - Viabilidade do pólen deve ser testada de tempo em tempo
  - Pólens podem ter longevidade e viabilidade diferenciada

# Classificação dos grãos de pólen

## ■ Grãos de pólen sensíveis à dessecação

- Não podem ser conservados à temperaturas muito frias (freezing) sem emprego de técnicas especiais.
- Danos mecânicos causados pela formação de cristais de gelo nos espaços intracelulares
- Pólen trinucleados
- Asteraceae
- Poaceae

## ■ Grãos de pólen resistentes à dessecação

- Conservados à temperatura e umidade muito baixas
- Dessecação ou vácuo
- Temperaturas moderadas: 20-25 ° C
- Freezing-drying
- Conservados -18 ° C
- Pólen binucleado
- Rosaceae, Ericaceae

# Monitoramento da viabilidade dos grãos de pólen

- **Corantes Vitais**
  - Atividade enzimática
  - Integridade da membrana
    - Teste com Tetrazólio
      - Enzimas Oxidativas
    - Teste com Fluorocromos
      - Integridade da membrana
    - Dificuldade: Avaliação
- **Germinação *in vitro***
- **Germinação *in vivo***
- **Produção de Semente**

