



# Directrizes dos princípios gerais de regeneração

# Introdução

**M.E. Dulloo<sup>1</sup>, J. Hanson<sup>2</sup>, M.A. Jorge<sup>1,2</sup> e I. Thormann<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bioversity International, Roma, Itália

<sup>2</sup>International Livestock Research Institute (ILRI), Adis Abeba, Etiópia

## Antecedentes

Os bancos de germoplasma devem assegurar que os acessos permaneçam viáveis e mantenham uma elevada qualidade durante o máximo período de tempo possível. Mesmo sob os mais altos standards de manejo o germoplasma acaba por se deteriorar com o tempo e necessita de ser regenerado regularmente. A manutenção das colecções de germoplasma a níveis aceitáveis de qualidade e viabilidade é muitas vezes difícil para muitos bancos de germoplasma, devido aos custos envolvidos e a suas capacidades limitadas e falta de conhecimentos técnicos – especialmente à face dos complexos procedimentos de regeneração necessários em algumas espécies em conservação (FAO 1998). Isto tem resultado em atrasos acumulados na regeneração que tem colocado materiais importantes e únicos em perigo, como foi salientado no relatório da FAO sobre a situação mundial assim como nas estratégias de conservação de culturas desenvolvidas durante os últimos anos com o apoio do Fundo Mundial para a Diversidade das Culturas (o Fundo), em muitos casos facilitados pelos centros do Grupo Consultivo Internacional sobre Investigação Agrária (CGIAR). O Fundo apoia portanto a regeneração de materiais prioritários em perigo, existentes em varias partes do mundo.

Apesar de existirem mecanismos de apoio para a tomada de decisões genéricas em regeneração de plantas (Sackville Hamilton e Chorlton 1997), são ainda necessários conhecimentos especializados específicos para cada cultura. Infelizmente, embora tais conhecimentos existam em bancos de germoplasma pelo mundo todo, incluindo os dos centros CGIAR, não houve ainda até agora nenhuma iniciativa de identificar, compilar e publicar as melhores praticas para ajudar os detentores de colecções de germoplasma, a regenerarem os seus materiais de modo a manterem a integridade genética e optimizarem a viabilidade dos materiais de plantação por eles produzidos. Por isso, o Fundo solicitou ao Bioversity, actuando em nome do Programa de Recursos Genéticos do Sistema (SGRP), a elaboração de guias de regeneração específicos para as 21 culturas alimentares (banana,

feijão, fruta-pão, mandioca, grão de bico, côco, feijão frade/feijão caupi, fava, mexoeira-de-dedo (pé-de-galo/capim-da-cidade/nachenim/pé-de-boi), chícharos/ervilha de cheiro, milho, principais aráceas, lentilhas, mexoeira (massango-liso/palha-de-taldo/quicuio), ervilha-do-congo (feijão-congo/ervilha-de-angola/feijão bóer), batata, arroz, sorgo (mapira/massambala), batata-doce, trigo e inhame), escolhidas para a iniciativa de regeneração de culturas do Fundo.

### **Definição**

Nestas directrizes, o termo regeneração é usado com o significado de restabelecer amostras de plantas geneticamente semelhantes à colecção original, quando a viabilidade das sementes ou o número de plantas for baixo. A regeneração é também necessária para a conservação a longo prazo de novos acessos se as quantidades forem muito baixas e também pode ser necessária por motivos fitossanitários para a eliminação de doenças, resgate e restabelecimento de colecções. No caso de culturas de clones conservadas em bancos de germoplasma de campo, o re-estabelecimento pode ser levado a cabo no mesmo local ou num outro local por razões de segurança ou para evitar certas pragas e doenças.

### **Directriz dos princípios gerais**

#### **Assegurar a integridade genética**

A regeneração de germoplasma é uma operação crítica no manuseio de um banco de germoplasma, que envolve os maiores riscos em relação à integridade genética do germoplasma, devido à selecção, cruzamentos ou misturas mecânicas. O risco de perda da integridade genética é especialmente alto quando se regeneram acessos de germoplasma geneticamente heterogéneos de culturas de polinização cruzada. O objectivo da regeneração é de manter a diversidade e estrutura genética original de cada acesso ou colecção (ver as recomendações na Directriz Geral de Regeneração, abaixo).

#### **Assegurar a eficiência**

A taxa de reprodução das espécies e variedades no local de regeneração deve ser tomada em consideração para se poder produzir um número suficiente de sementes ou materiais de plantação. O número de sementes, estacas ou outros materiais de plantação necessários para a regeneração, devem ser cuidadosamente calculados, tendo em conta o número desejado de plantas para regeneração, as taxas de germinação e de estabelecimento final dos acessos, assim como a quantidade de sementes necessária após a regeneração e o facto da caracterização e avaliação dos acessos estar ou não associada à regeneração.

#### **Assegurar a qualidade**

O objectivo da regeneração das culturas é o de produzir suficiente quantidade de sementes, tubérculos ou outros materiais de propagação vegetativa, viáveis e saudáveis. Antes de distribuir germoplasma, os bancos de germoplasma devem verificar a ausência de pragas e doenças que se transmitam através das sementes ou propágulos vegetativos, para evitar a propagação de pragas e doenças. Este germoplasma deve providenciar uma fonte básica de material não contaminado para programas de melhoramento, multiplicação ou outros projectos.

## Directriz geral de regeneração

### Tipo de colecção

Nas culturas de sementes há dois tipos de colecções reconhecidas, as colecções activas e as de base. As colecções activas devem ser preferencialmente regeneradas a partir de sementes originais extraídas da colecção de base. No entanto, o uso de sementes extraídas da colecção activa até à terceira geração, antes de se usar a semente original (da colecção de base) é também aceitável (FAO/IPGRI 1994). As colecções de base só devem ser regeneradas usando sementes residuais da amostra mais original da colecção de base.

No caso de culturas propagadas por clones, os materiais vegetativos são geralmente mantidos em colecções de campo (Engels e Visser 2003). Algumas espécies de árvores tropicais só precisam de ser replantadas uma vez em cada 15 anos ou mais, enquanto outras espécies precisam de ser replantadas com poucos meses de intervalo. É recomendável nestes casos, estabelecer uma colecção em duplicado, pois senão não haverá nenhum material onde recorrer (como acontece com as colecções de sementes), caso a plantação falhe por alguma razão. As culturas de propagação vegetativa também podem ser conservadas *in vitro* ou com técnicas de crio-preservação, no caso destas tecnologias terem sido desenvolvidas para culturas específicas, e este tipo de material também pode servir de colecção em duplicado alternativa para repôr acessos que falhem durante a regeneração de colecções de campo. A regeneração de colecções *in vitro* ou crio-preservadas não é abrangida nestas directrizes [ver Reed *et al.* (2004) para mais informações].

### Quando regenerar

A regeneração é um processo muito caro e só deve ser feito com a frequência necessária para assegurar que os acessos estejam disponíveis em quantidade suficiente e mantenha a qualidade adequada. Para a maioria das culturas de sementes os acessos só devem ser regenerados:

- Quando a viabilidade das sementes estiver abaixo de 85% da percentagem inicial de germinação nas colecções activas, determinada pelo monitoramento da viabilidade (ver FAO/IPGRI 1994; Rao *et al.* 2006; ISTA 2008 para mais detalhes). A viabilidade inicial antes do armazenamento não deve ser menor que 85% apesar de alguns bancos de germoplasma usarem percentagens menores (<75%), especialmente para espécies espontâneas.
- Quando o número de sementes viáveis por acesso for <1500 nas populações de colecções de base ou activas e <250 para linhas puras.

Acessos de má qualidade (baixa viabilidade) são mais importantes para regenerar do que aqueles com número insuficiente de sementes. Os acessos das colecções base devem ter prioridade sobre os das colecções activas.

Para culturas de propagação vegetativa, a decisão de regenerar dependerá de:

- Maturação e da deterioração do material vegetal em conservação
- Situação das pragas e doenças na colecção de campo
- Necessidade de substituir a colecção devido a riscos externos (seca, inundações, ciclones)
- Necessidade de aumentar a disponibilidade dos materiais de propagação.

### Dimensão da amostra

As amostras retiradas das sementes de um acesso para serem regeneradas devem ser escolhidas aleatoriamente para representarem a diversidade dentro dos acessos ou

colecções para permitir uma elevada probabilidade de retenção dos alelos de baixa frequência. Como regra geral, Crossa *et al.* (1993) estimam que cerca de 90-210 sementes são necessários para manter a probabilidade de 90-95% alelos com uma frequência de 0.003 a 0.05 para um número de loci variando de 10 a 150. Espécies de polinização cruzada normalmente requerem mais plantas para manter a variabilidade genética que existe no seio da população do que em espécies de auto-polinização [Ver Crossa (1995) para obter mais detalhes]. No entanto, nem sempre é esse o caso e pode depender do grau de variabilidade dentro do acesso em sub populações de espécies autónomas.

O número mínimo de sementes para a regeneração pode ser estimado a partir da amostra de tamanho padrão utilizada para a regeneração e viabilidade da amostra de acordo com a seguinte equação:

Número de sementes necessárias para regeneração = Número desejado de plantas numa população para regeneração / (percentagem de germinação<sup>1</sup> × percentagem de estabelecimento esperado no campo<sup>2</sup>) (ver Rao *et al.* 2006).

No caso das culturas propagadas vegetativamente, uma vez que as plantas devem ser geneticamente idênticas dentro de cada acesso, a escolha do tamanho da amostra está em grande parte relacionada com a probabilidade de sobrevivência das plantas no campo e com a garantia de que pelo menos algumas plantas deverão sobreviver e serem colhidas de modo a que os acessos possam ser regenerados novamente. Geralmente é necessário um número mínimo de 5-10 plantas por acesso, ou mais, se os propágulos forem também necessários para outros fins.

### **Preparação das sementes / material de plantação**

Ao preparar as sementes armazenadas nos bancos de germoplasma para regeneração, é necessário remover os recipientes do armazém de conservação e deixá-los durante a noite à temperatura ambiente antes de abri-los, para evitar a rápida absorção de humidade. Para culturas de propagação vegetativa, as diferentes partes da planta podem precisar de ser utilizadas para a regeneração, desde raízes tuberosas até ramos com folhas, caules, rebentos ou outras partes da planta. Dependendo do caso, métodos específicos podem ser necessários para a selecção, corte, desinfestação e armazenamento a curto prazo ou pré-acondicionamento antes da plantação.

### **Manutenção de um tamanho populacional efectivo**

Um dos principais objectivos da regeneração é garantir que o tamanho efectivo da população ( $N_e$ ) seja mantido num mesmo acesso. Métodos de computação para a variância de  $N_e$  (1) recolha e regeneração de germoplasma diplóide em espécies monóicas, (2) espécies de polinização cruzada e (3) espécies mistas de auto-polinização e de polinização aleatória, têm sido desenvolvidos por Crossa e Vencovsky (1994); Crossa e Vencovsky (1997) e Vencovsky e Crossa (1999), respectivamente.

De acordo com Crossa e Vencovsky (1994) e Vencovsky e Crossa (1999), a melhor estratégia para a manutenção de elevados  $N_e$  é recolher um número igual de sementes do maior número possível de plantas maternas. É mais difícil recolher sementes de espécies de auto-polinização do que de polinização cruzada. Se existirem diferenças de maturidade durante

1 A percentagem de germinação e de estabelecimento no campo devem ser expressas em decimais: por exemplo 95% expresso como 0.95.

2 O estabelecimento de plantas em más condições é geralmente 5% menos que a percentagem de germinação e em boas condições é 1% menos.

a floração e de maturidade entre plantas dentro do mesmo acesso, é melhor colher as plantas individualmente e misturar uma proporção igual de sementes das diversas plantas maternas, para evitar efeitos de influência maternos.

Em culturas de propagação vegetativa, a dimensão da população não é tão importante porque as plantas dentro de um acesso são geralmente geneticamente idênticas. No entanto, muitas culturas propagadas vegetativamente, têm uma quantidade significativa de heterozigose devido a algum nível de cruzamento natural externo e posterior perpetuação por meios vegetativos, que se pode reflectir na variação entre plantas de um acesso (Vasil *et al.* 1994; Lebot e Aradhya 1992). Portanto, são recomendados 5-10 plantas por acesso. Quando houver provas de que os materiais são geneticamente idênticos, é mais importante seleccionar materiais de algumas plantas maternas saudáveis e vigorosas do que a partir de um grande número de plantas de inferior qualidade. O número plantado irá, portanto, depender do nível de heterozigose, da diversidade intra específica, bem como dos custos de conservação e da necessidade de caracterização e avaliação.

### **Escolha do local**

Os acessos de germoplasma devem ser regenerados quando possível, na mesma região ecológica de onde tenham originado. Alternativamente, seleccionar um local que minimize as pressões sobre a selecção dos genótipos ou populações. Se não forem encontrados locais adequados, colabore com outras instituições que possam fornecer locais adequados ou instalações para regeneração. Tome cuidado durante a regeneração e no tratamento das sementes ou propágulos de plantas para evitar a contaminação proveniente de terrenos adjacentes, para minimizar o fluxo de genes e para impedir a introdução inadvertida de transgénicos. Plantas que possam ser claramente identificadas como contaminantes e que não pertençam à população devem ser removidas. Os acessos não devem ser plantados em áreas onde a mesma cultura tenha sido previamente cultivada para reduzir o risco de plantas voluntárias, assim como a acumulação de pragas e doenças no solo.

As parcelas de regeneração devem ser tão uniformes quanto possível e o campo deve ser bem drenado. Boa irrigação deverá estar disponível até mesmo para as culturas de sequeiro, a fim de evitar qualquer selecção exercida pela seca, assim como para garantir bons rendimentos de sementes. É também aconselhável fazer uma análise dos nutrientes do solo para determinar que fertilizantes são necessários.

### **Isolamento**

O sistema reprodutivo das culturas é particularmente importante. No caso das espécies de polinização cruzada, usar correctamente as distâncias de isolamento, o isolamento temporal, o isolamento das inflorescências, as gaiolas e outros mecanismos. Uma vez que o grau de cruzamento numa série de espécies vegetais está relacionada com a localização, é uma boa prática estimar a taxa de polinização cruzada no local onde plantas estão a ser regeneradas a fim de que se possa usar a técnica de polinização apropriada para o cruzamento adequado.

### **Maneio da cultura**

É uma boa prática manter as parcelas de regeneração o mais limpas possíveis de sementes ou plantas estranhas. A monda deve ser realizada periodicamente para eliminar a concorrência. Durante a preparação das parcelas de regeneração, as ervas daninhas, pragas do solo e doenças devem ser eliminadas com um tratamento adequado, por exemplo, herbicidas sprays, esterilização do solo, cultivo seguido pelo herbicida e / ou lavra profunda para matar ervas daninhas emergentes.

### **Monitorar a identidade dos acessos**

Identificar individualmente todos os acessos com rótulos de longa duração ou tinta permanente e manter mapas de campo de modo a que a identidade dos acessos possa ser monitorada durante o ciclo cultural. Para as culturas propagadas por sementes, recomenda-se manter uma amostra inicial de sementes como referência num saco plástico num ambiente seco a 15 ° C. Sempre que os acessos forem regenerados, as sementes recém-colhidas podem ser comparadas com a amostra inicial de sementes para verificar que o acesso seja do mesmo tipo. A identidade das sementes ou propágulos de acessos regenerados pode também ser confirmada através da comparação de dados de caracterização com traços específicos dos acessos, se estiverem disponíveis.

### **Colheita**

Em geral, a colheita é feita na altura de maturidade óptima (que é depois do ponto de maturação fisiológica) da planta, quando os números máximos de sementes estão maduros, tolerantes à dissecação e podem ser debulhados mecanicamente com mínimas lesões mecânicas e antes dos grãos se deteriorarem e dispersarem naturalmente. [Ver Rao *et al.* (2006) para mais informações].

No caso das culturas propagadas por clones, a maturação fisiológica da planta mãe é o critério mais importante para a recolha de propágulos para uma regeneração bem sucedida ou para a sua conservação a curto prazo. A maturidade da parte comestível da planta é geralmente irrelevante nos casos em que este não coincide com a parte da planta para ser propagada.

### **Pragas e doenças comuns**

Os guias fornecem uma lista de pragas e doenças comuns a cada cultura, mas nem todos os sintomas ou medidas de controlo estão detalhados. Durante a regeneração (incluindo a colheita e pós-colheita), as culturas devem ser inspeccionados por serviços fitossanitários, especialmente em relação a doenças transmitidas por sementes ou transmitidas vegetativamente, a fim de garantir a máxima sanidade e viabilidade do material regenerado.

### **Referências e leitura recomendada**

- Crossa J. 1995. Sample size and effective population size in seed regeneration of monoecious plants. In: Engels JMM, Ramanatha RR, editors. Regeneration of seed crops and their wild relatives. Proceedings of a consultation Meeting 4-7 December 1995, ICRISAT, Hyderabad, India. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp.140-143.
- Crossa J, Hernandez CM, Bretting P, Eberhart SA, Taba S. 1993. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 673-678.
- Crossa J, Vencovsky R. 1994. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species. *Theoretical and Applied Genetics* 89:936-942.
- Crossa J, Vencovsky R. 1997. Variance Effective Population Size for Two-Stage Sampling of Monoecious Species. *Crop Science* 37:14-26.
- Engels JMM, Visser L, editors. 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italy.
- FAO/IPGRI. 1994. Genebank standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

- FAO. 1998. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Hanson J. 1985. Practical Manuals for Genebanks: Procedures for Handling Seeds in Genebanks. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- ISTA. 2008 International rules for seed testing. International Seed Testing Association. ISTA Secretariat, CH-Switzerland.
- Lebot V, Aradhya KM. 1992. Collecting and evaluating taro *Colocasia esculenta* for isozyme variation. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 90:47–49.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D and Larinde M. 2006. Manual of seed handling in genebanks. Handbook for Genebanks No.8. Bioversity International, Rome, Italy.
- Reed BM, Engelmann F, Dulloo ME, Engels JMM. 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Handbook for Genebanks No 7. International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italy.
- Sackville Hamilton NR, Chorlton KH. 1997. Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide. Handbook for Genebanks No.5. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Soest LJM van. 1990. Plant Genetic Resources: Safe for the future in genebanks. Impact of Science on Society 158: 107–120.
- Vasil IK, Thorpe TA, editors. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht and Boston (Massachusetts). 604pp.
- Vencovsky R, Crossa J. 1999. Variance Effective Population Size under Mixed Self and Random Mating with Applications to Genetic Conservation of Species. Crop Science 39:1282–1294.

### Citação correcta

Dulloo M.E., Hanson J., Jorge M.A., and Thormann I. 2008. Directrizes dos princípios gerais de regeneração. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 7 pp.