

Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Multiplicação e Regeneração de Acessos

Foto: Fernanda Araújo



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

Documentos

321 *Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
ISSN 0102-0110*

167 *Embrapa Tabuleiros Costeiros
ISSN 1678-1953*

133 *Embrapa Hortaliças
ISSN 1415-2313*

217 *Embrapa Meio-Norte
ISSN 0104-866X*

Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Multiplicação e Regeneração de Acessos

Semíramis Rabelo Ramalho Ramos
Manoel Abílio de Queiróz
José Flávio Lopes
Francisco Rodrigues Freire Filho

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: *Ligia 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

Supervisor editorial: *Ligia Sardinha Fortes*

Revisor de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica: *Ligia Sardinha Fortes*

Editoração eletrônica: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Foto da capa: *Fernanda Araújo*

1ª edição (online)

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**

Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Multiplicação e Regeneração de Acessos. / Semíramis Rabelo Ramalho Ramos, Manoel Abílio de Queiróz, José Flávio Lopes e Francisco Rodrigues Freire Filho. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

22 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 321; Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, 167; Documentos / Embrapa Hortaliças, 133; Documentos / Embrapa Meio-Norte, 217).

Revisão técnica: *Alessandra Pereira Fávero.*

1. Recursos Genéticos – Vegetal. 2. Conservação. 3. Multiplicação. 4. Regeneração. I. Ramos, Semíramis Rabelo Ramalho. II. Queiróz, Manoel Abílio de. III. Lopes, José Flávio. IV. Freire Filho, Francisco Rodrigues. V. Título. VI. Série.

581.15 - CDD

© Embrapa 2010

Autores

Semíramis Rabelo Ramalho Ramos

Ph.D. em Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa
Tabuleiros Costeiros
semiramis@cpatc.embrapa.br

Manoel Abílio de Queiróz

Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, professor adjunto da
Universidade do Estado da Bahia
manoelabiliomaq@gmail.com

José Flávio Lopes

Ph.D. em Horticultura, pesquisador da Embrapa Hortaliças
jlopes@cnph.embrapa.br

Francisco Rodrigues Freire Filho

Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da
Embrapa Meio-Norte
freire@cpamn.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 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 e importância	08
Alguns aspectos teóricos envolvidos nos processos de multiplicação e regeneração	09
Alguns aspectos práticos envolvidos nos processos de multiplicação e regeneração	10
Alógamas: melão, melancia, pepino, abóbora e moranga	11
Autógamas: <i>Vigna</i> spp.	16
Infraestrutura necessária	18
Dificuldades encontradas e considerações finais	19
Referências	20

Multiplicação e Regeneração de Acessos

Semíramis Rabelo Ramalho Ramos

Manoel Abílio de Queiróz

José Flávio Lopes

Francisco Rodrigues Freire Filho

Definição e importância

Ao longo do tempo, o Brasil tem feito vários esforços para enriquecer – via coleta ou introdução – e manter em bancos de germoplasma a variabilidade genética de várias espécies de plantas, principalmente de espécies utilizadas na alimentação humana e animal. Um levantamento atualizado do sistema de conservação de recursos genéticos mostrou que existem no país mais de 170.000 acessos de germoplasma vegetal, incluindo duplicatas, com cerca de 107.000 acessos armazenados na coleção de base (COLBASE), e ao redor de 63.000 em outras coleções (VALLS *et al.*, 2008).

A coleção de base de germoplasma vegetal no país é mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), e as coleções ativas são mantidas nos respectivos bancos de germoplasma, inseridos ou não dentro do Sistema Embrapa de Gestão de Recursos Genéticos.

Contudo, a duração e o sucesso do período de armazenamento dependem tanto dos objetivos deste quanto das características da espécie em questão. Há muitos fatores que podem interferir na viabilidade e longevidade de sementes sob armazenamento *ex situ* (HONG e ELLIS, 1996), causando a perda irreversível de genes e redução na viabilidade dos indivíduos nas amostras, quando estas não estão preparadas adequadamente para serem armazenadas, constituindo um fenômeno denominado estrangulamento ou estreitamento da composição genética (VENCOVSKY, 1987). Assim, tanto no processo de conservação a longo prazo quanto no manejo dos bancos ativos de germoplasma (BAGs), as atividades de regeneração e multiplicação são de significativa importância e devem ser seriamente consideradas, porque garantem não só a boa qualidade e viabilidade de sementes para serem mantidas a longo prazo em câmaras frias, mas também a manutenção da diversidade original dos acessos que estão sob processo de multiplicação.

Considerando-se a logística de reposição das sementes, é útil fazer uma distinção entre regeneração e multiplicação (BREESE, 1989). O termo e o processo de regeneração encontram-se vinculados ao rejuvenescimento e à multiplicação de sementes para suprir as necessidades da regeneração de amostras destinadas à conservação a longo prazo. Por outro lado, o processo de multiplicação está vinculado às coleções ativas e se refere à multiplicação de amostras para atender às necessidades de manejo, utilização e distribuição. Em ambos os casos, o tamanho da coleção é crucial e os acessos estão vulneráveis à perda de diversidade.

A frequência de multiplicação depende do tamanho e da quantidade de sementes inicialmente disponíveis e da demanda previsível ou conhecida por parte dos usuários, seja para as atividades de caracterização e avaliação ou para uso pelos melhoristas, e das condições de armazenamento das sementes. É fato que cada regeneração ocasiona uma alteração na estrutura genética da população. Assim, visando à redução dessas alterações, seja qual for o objetivo da multiplicação, a frequência dessa atividade deve ser reduzida (BREESE, 1989; TOLL *et al.*, 1994). Ao mesmo tempo, conhecimentos relacionados à biologia reprodutiva e aos princípios de genética de populações da espécie a ser multiplicada devem ser efetivamente considerados na etapa de regeneração do germoplasma.

Desse modo, o objetivo deste volume é abordar e compartilhar, de forma sintética e objetiva, alguns aspectos teóricos e práticos envolvidos no processo de multiplicação e regeneração de sementes ortodoxas, por reprodução sexual, nos bancos de germoplasma.

Alguns aspectos teóricos envolvidos nos processos de multiplicação e regeneração

Allard (1970) admite que qualquer coleção de germoplasma, por maior que seja, é apenas uma pequena amostra da variabilidade total da espécie. Assim, o entendimento de processos ligados à genética de populações, advindos de mutação, seleção, amostragem e migração (proveniente da contaminação), são importantes tanto na conservação quanto na regeneração/multiplicação dos acessos, porque estão diretamente relacionados à representatividade genética das coleções de germoplasma. Nesse contexto, torna-se importante o conhecimento do conceito do número efetivo populacional (N_e), o qual é parâmetro-chave para prever a deriva genética associada à regeneração do germoplasma (VENCOVSKY, 1987; JOHNSON, BRADLEY, EVANS, 2002).

A representatividade genética contida em uma amostra, quando medida pelo N_e , possibilita mensurar o tamanho da base genética do conjunto de indivíduos amostrados, assim como avaliar a sua capacidade de reter alelos durante as gerações (VENCOVSKY *et al.*, 2007). Tanto no processo de multiplicação quanto no de regeneração, é fundamental manter o tamanho genético do acesso, e a sua mensuração depende de uma série de fatores, com destaque maior para o sistema reprodutivo das espécies e para o modo como a amostragem foi realizada (BREESE, 1989; VENCOVSKY e CROSSA, 2003; VENCOVSKY *et al.*, 2007). Vale salientar que a manutenção do N_e é função do processo de amostragem na população original (sementes do acesso) e na amostragem das sementes colhidas nas plantas originadas da amostra obtida da população (VENCOVSKY *et al.*, 2007), quando da composição final do acesso.

Quanto ao sistema reprodutivo, são consideradas plantas alógamas as espécies que realizam preferencialmente polinização cruzada acima de 95%. A fertilização ocorre quando o pólen de uma planta fertiliza o óvulo da flor de outra planta. As espécies mistas são aquelas que apresentam, em determinadas situações, elevadas taxas de fecundação cruzada. Embora nessas espécies a estrutura floral seja muito semelhante à das espécies alógamas, a elevada taxa de fecundação cruzada exige cuidados muito especiais no controle de pólen. O isolamento das progênies por meio de barreiras físicas ou distância têm sido os métodos mais recomendados para dar segurança na produção de sementes e manutenção da diversidade individual de cada acesso. São classificadas como plantas autóginas aquelas que realizam, preferencialmente, a autofecundação, ou seja, o pólen ou

gameta masculino da antera de uma flor desloca-se ao estigma da mesma flor ou de outra flor, na mesma planta (ALLARD, 1970; RAMALHO *et al.*; 1993; BORÉM, 1997).

Nos processos de multiplicação e regeneração, de forma geral, Breese (1989) faz as seguintes recomendações para plantas alógamas: a) assegurar o pareamento entre as plantas do mesmo acesso mediante adequadas técnicas de polinização; b) evitar a contaminação com pólen ou sementes estranhas mediante isolamento e manejo da semente; e c) minimizar a deriva genética e a seleção natural, evitando o uso de populações pequenas e a influência da seleção natural. O objetivo prático desses cuidados é assegurar, na medida do possível, um completo pareamento aleatório entre as plantas em cada geração de multiplicação. Ainda considerando as espécies alógamas, Vencovsky (1987) ressalta que, ao se compor uma amostra de sementes, deve-se utilizar a técnica do controle gamético feminino, que consiste em colher número igual de sementes de cada planta-mãe. Com a utilização desse procedimento, há o decréscimo da perda de alelos por deriva genética.

Para as espécies autógamias, verifica-se que um grande número de acessos presentes nos bancos de germoplasma corresponde a variedades ou populações locais. Nesse contexto, é importante manter a heterogeneidade da amostra. Breese (1989) salienta que os esquemas fundamentais da multiplicação de espécies autógamias – ou predominantemente autógamias – dependem do objetivo da multiplicação; a depender do propósito, os métodos massal ou genealógico podem ser utilizados.

Alguns aspectos práticos envolvidos nos processos de multiplicação e regeneração

Em termos práticos, antes de iniciar o processo de multiplicação das sementes, é necessário definir ou conhecer, entre outros, a capacidade de alocação dos acessos no campo ou em casa de vegetação, o número de acessos a serem trabalhados, o número de plantas e o tamanho da parcela a ser utilizada, a necessidade de controle de polinização, o número de frutos por planta a serem colhidos e as estratégias para a composição da amostra final. Sempre que possível, deve-se tentar alocar o experimento em delineamento experimental. Embora a rigor não seja indispensável, se houver disponibilidade de tempo e recursos pessoais, físicos e financeiros, é importante que durante o processo de multiplicação seja feita a caracterização preliminar dos acessos, utilizando-se os descritores da espécie ou parte deles. Quando os experimentos de multiplicação ou de regeneração são instalados em delineamento experimental com repetição, os dados podem ser submetidos a análises estatísticas mais robustas, para que se possa identificar e quantificar diferenças significativas entre os acessos.

Nesse sentido, pode haver abordagens distintas, em função da espécie a ser trabalhada, principalmente considerando-se o sistema reprodutivo. Em termos práticos, nos próximos itens o foco será dado a espécies da família das Cucurbitáceas (alógamas) e ao gênero *Vigna* (autógama).

Alógamas: melão, melancia, pepino, abóbora e moranga

Os procedimentos práticos relatados foram ou estão sendo seguidos pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Embrapa Hortaliças (CNPq) e Embrapa Semiárido (CPATSA), com algumas espécies da família Cucurbitáceas.

A primeira decisão importante a ser considerada no processo de multiplicação diz respeito ao número de acessos que serão trabalhados em cada experimento de campo. Para a melancia (*Citrullus lanatus*) e o melão (*Cucumis melo*), utilizam-se cerca de 25 a 30 acessos em cada experimento. Este número foi definido em termos práticos, em função da logística necessária ao processo de polinização, o qual é artificialmente controlado.

As parcelas devem ser compostas por 20 plantas. Este é o número efetivo populacional (N_e), definido por Romão *et al.* (1994) para a melancia, sendo o mínimo recomendado para a condução. As sementes são postas para germinar em bandejas de isopor, em casa de vegetação ou estrutura telada com sombrite®, com 50% de redução da radiação solar (Figura 1).

Foto: Semiramis Rabelo Ramalho Ramos



Figura 1. Sementes de acessos de espécies da família Cucurbitáceas, colocadas para germinar em bandejas de isopor, em casa de vegetação ou estrutura telada.

Uma vez que as plântulas estejam com a primeira folha definitiva, o transplântio é feito para o local definitivo, em experimentos de campo (Figura 2). O preparo do solo é feito da forma usual adotada em cada local de plantio, o qual pode ser de sequeiro ou irrigado. Para a melancia, o espaçamento adotado deve ser de 3,00 m entre as fileiras e 0,80 m entre as plantas; para o melão, o espaçamento é de 2,50 m entre as fileiras e a distância entre as plantas é a mesma, a fim de facilitar o manejo delas durante a polinização controlada.

Foto: Semiramis Rabelo Ramalho Ramos



Figura 2. Plântulas de acessos de abóbora transplantadas para área definitiva, destinadas ao processo de multiplicação/regeneração do número de sementes.

A disposição dos acessos no campo pode seguir dois arranjos distintos. Em um deles, os acessos podem ser colocados em fileiras contínuas e sem repetição (Figura 3). No outro, pode-se fazer a casualização e, assim, o total de 20 plantas pode ser dividido em quatro parcelas, com cinco plantas cada. Apesar de um pouco mais trabalhoso, o segundo arranjo permite fazer, no caso da realização concomitante de caracterização morfológica e aplicação de descritores, avaliações estatísticas mais avançadas e inferências mais robustas.

Foto: Semiramis Rabelo Ramalho Ramos



Figura 3. Plantas de acessos de abóbora no campo, em arranjo de plantio disposto em fileiras contínuas, sem repetição e com vinte plantas por acesso.

Como forma de garantir a representatividade genética dos acessos, realiza-se a polinização controlada. Na Embrapa Semiárido e no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS/UNEB), para a multiplicação de acessos de melancia, melão (*Cucumis melo*), abóbora (*Cucurbita moschata*), moranga (*Cucurbita maxima*) e maxixe (*Cucumis anguria*), os acessos são plantados normalmente em linhas contínuas, utilizando-se 20 plantas por acesso e efetuando-se o controle gamético a partir de cruzamentos biparentais, obtidos por meio de polinização manual; em alguns casos, podem ser utilizados outros tipos de controle. Os espaçamentos entre fileiras e entre plantas dentro das fileiras serão utilizados de acordo com cada uma das espécies. No entanto, o número de plantas por acesso pode ser alterado tanto em função da ocorrência de dormência – verificado em alguns acessos – quanto da baixa porcentagem de germinação das sementes disponíveis nos acessos originalmente coletados. Assim, os sistemas para obtenção das sementes têm sido de diferentes tipos: cruzamento em cadeia, cruzamento em cadeia alternada, autofecundação e polinização livre.

Em melancia e melão, faz-se a proteção de botões florais masculinos e femininos um dia antes da antese, utilizando-se sacos de papel “Kraft” ou copos descartáveis. Em geral, protegem-se dois botões florais masculinos para um botão floral feminino. No dia seguinte, as flores deverão estar abertas e, assim, retiram-se da mesma planta as duas flores masculinas, e em seguida as anteras destas são passadas no estigma da flor feminina, onde se deposita o pólen. Para facilitar a exposição das anteras, as pétalas devem ser retiradas. Em seguida, faz-se o registro da data da polinização na etiqueta, que fica presa ao pedicelo da flor, indicando que esta foi autofecundada, e anota-se o número da planta na parcela, se for este o caso (Figura 4).

Foto: Fernanda Araújo



Figura 4. Flor feminina de melancia polinizada, protegida com copo descartável.

No caso de se adotar a estratégia de cruzamentos aos pares, recomenda-se fazer o mesmo procedimento anterior, mas utilizando-se flores masculinas de plantas distintas. No registro, as anotações da etiqueta devem indicar tanto a planta fornecedora de pólen quanto a planta feminina.

No caso específico de melão e melancia – considerando-se que existe uma tendência da planta que tem um fruto fixado deslocar todo o fotossintetizado para esse fruto – qualquer nova polinização tende a não ser efetiva devido à ocorrência de aborto floral. Esse fenômeno é mais comum em plantas não prolíficas. Assim sendo, logo que se iniciam as polinizações em uma planta, os frutos já fixados e que são de polinização livre deverão ser retirados da planta. Contudo, após a fixação de um fruto de polinização controlada, no caso de haver mais frutos de polinização controlada e frutos de polinização livre, estes poderão ser deixados na planta. Os frutos de polinização controlada terão progênies de irmãos completos, se provenientes de autofecundação, e progênies de meio-irmãos, se provenientes de cruzamentos em pares de planta, ao passo que as progênies dos frutos de polinização livre terão uma mistura de progênies de irmãos completos e meio-irmãos.

Por ocasião da colheita, geralmente ao redor de 30 a 35 dias após a polinização, deve-se proceder à correta identificação dos frutos, passando-se os dados das etiquetas para os frutos. Na colheita, todos os frutos de polinização controlada deverão ser colhidos e levados para o laboratório, onde as sementes passam pelos processos de extração, lavagem e secagem. Em todos esses processos, a etiqueta com o registro da polinização deve ser mantida no respectivo lote de sementes.

Finalmente, para se compor o acesso (subamostra), deve-se tomar igual quantidade de sementes de cada um dos frutos que tiveram progênies de polinização controlada, de acordo com a recomendação de Vencovsky (1997), sendo que o número depende da quantidade de sementes que se necessita para o manejo do banco (estudos sobre o acesso, sementes para a Coleção de Base, etc.). As sementes remanescentes poderão ser destinadas a estudos de melhoramento, se for o caso.

Na Embrapa Hortaliças, realiza-se o processo de multiplicação de espécies alógamas, especificamente de abóbora (*Cucurbita moschata*), moranga (*Cucurbita maxima*) e pepino (*Cucumis sativus*), a depender da situação, por meio de três estratégias distintas. Em cada estratégia, utilizam-se 30 plantas para cada acesso, organizadas em 3 repetições de 10 plantas, da seguinte forma: a) mistura de pólen das plantas de cada acesso, método que consiste em coletar uma certa quantidade de pólen de cada uma das plantas do acesso e fazer a polinização de todas as flores femininas do próprio acesso com a mistura do pólen coletado. Os frutos de cada parcela são colhidos e as respectivas sementes misturadas para formar nova amostra de sementes daquele acesso; b) autofecundação de cada flor feminina, processo que consiste em autofecundar um certo número de flores em todas as plantas do acesso, colher os frutos e extrair as sementes de cada fruto individualmente. No final, as sementes de todos os frutos e plantas pertencentes a cada acesso são misturadas. O processo é prático e facilita o processo de multiplicação das sementes. Entretanto, exige alguns cuidados para manter na mistura a mesma quantidade de semente tirada de cada fruto, evitando, assim, domínio de certas plantas de alta produção sobre as que produzem menos frutos ou menor quantidade de sementes por fruto. Esse processo vem sendo utilizado na Embrapa Hortaliças para multiplicação de germoplasma de abóbora, moranga e pepino; c) cruzamento aberto para todos os acessos, que consiste em se plantar, pelo menos, 30 plantas de cada amostra em campo aberto (Figura 5). Antes do período de floração, disponibilizam-se caixas com abelhas em grande quantidade, de modo

que haja iguais possibilidades de todas as plantas do acesso cruzarem-se entre si (Figura 6).

Foto: Semiramis Rabelo Ramalho Ramos



Figura 5. Plantas do acesso são dispostas em campo aberto.

Foto: Fernanda Araújo



Figura 6. No período de floração, há a presença livre de insetos para efetuar a polinização das flores e possibilitar o cruzamento.

A colheita dos frutos e a extração das sementes são realizadas individualmente dentro de cada acesso. Esta é uma alternativa muito prática e pouco trabalhosa. Entretanto, corre-se grande risco de se ter acessos super-representados, principalmente, quando na coleção aparecem plantas com alta capacidade de produção de pólen. Estes materiais vão predominar sobre os demais; além disso, podem ocorrer também plantas com baixa capacidade produtiva que podem ter a sua variabilidade modificada em função do número de sementes produzidas em cada amostra individual.

Vale salientar que durante o processo de multiplicação pode também ser realizada a caracterização morfoagronômica preliminar. Nesse caso, desde o momento inicial do desenvolvimento da planta os descritores recomendados para as espécies poderão ser aplicados. Alguns aspectos importantes podem ser considerados como, por exemplo, a decisão de se colocar uma ou mais variedades comerciais como tratamentos nos experimentos, ou a colocação de alguns tratamentos comuns a todos os experimentos de multiplicação, ao longo do tempo, pois assim se poderá fazer uma análise comparativa entre o comportamento de diferentes descritores em diferentes épocas.

Autógamas: *Vigna* spp.

Os procedimentos práticos aqui relatados foram conduzidos pela equipe de recursos genéticos e melhoramento da Embrapa Meio Norte, Teresina, PI, no período de 2002 a 2006 (RAMOS *et al.*, 2003; SOBRAL *et al.*; 2007; RAMOS *et al.* 2008). Esta Unidade mantém, há cerca de três décadas, o Banco Ativo de Germoplasma, composto por acessos de feijão-mungo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), feijão da china (*Vigna mungo* (L.) Hopper), feijão-arroz (*Vigna umbelata* var. *umbelata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi), feijão azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) e principalmente, feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata* Verdc. cultigrupo *unguiculata* Westphal e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata* Verdc. cultigrupo *sesquipedalis* Westphal). Estes acessos foram provenientes de introduções de diversos países e, no caso do feijão-caupi, também de coletas que foram realizadas na Região Nordeste do Brasil.

A atividade de multiplicação do germoplasma visa atender, respectivamente, a demanda do programa de melhoramento genético conduzido na Unidade, a outros usuários do sistema de gestão de pesquisa, assim como às avaliações de manejo de recursos genéticos (caracterização morfoagronômica e molecular, avaliação). Ao mesmo tempo, o processo de regeneração dos acessos de *Vigna* spp. visa ao atendimento e à reposição da viabilidade das sementes cujos acessos estão preservados na COLBASE.

Normalmente, a prioridade para multiplicação é dada aos acessos cuja introdução tenha sido mais antiga na coleção ou que apresentem sinais visíveis de deterioração ou que tenha prioridade indicada pelo programa de melhoramento. Dependendo das condições locais de infra-estrutura e pessoal, experimentos para multiplicação e regeneração de sementes podem ser feitos duas vezes ao ano, uma vez que o ciclo médio das plantas gira em torno de 4 meses. As sementes são normalmente semeadas em casa de vegetação, com cerca de 20 plantas/acesso, as quais, a depender do objetivo e do ano, podem ser arrançadas e plantadas em linhas contínuas ou no delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições.

Não há, até o momento, definição do tamanho efetivo para *Vigna* spp. Assim, considerando-se o sistema reprodutivo e a possibilidade de se trabalhar com o maior número de plantas/acesso, o acesso a ser multiplicado é normalmente composto por 20

plantas, num espaçamento de 1 m entre fileiras e 0,25 m entre covas, sendo as plantas conduzidas sob regime de irrigação por gotejamento (Figura 7). Os tratos fitossanitários são efetuados de acordo com os recomendados para a cultura (FREIRE FILHO, LIMA, RIBEIRO, 2005).

Foto: Semíramis Rabelo Ramalho Ramos



Figura 7. Detalhe do plantio de acessos de *Vigna* spp. dispostos em linhas contínuas, sob regime de irrigação por gotejamento.

É possível realizar, concomitantemente aos processos de multiplicação e regeneração, a caracterização morfoagronômica dos acessos. Dessa forma, em cada parcela é possível avaliar seis plantas, e em cada planta seis vagens (Figura 8), mediante a utilização da lista de descritores desenvolvida pelo IITA (1974), que foi revisada e publicada pelo International Board Plant Genetic Resources (IBPGR, 1983), atual Bioversity International, com modificações, ou ainda pela lista de descritores publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2010).

Considerando-se o sistema reprodutivo e a proteção mediante isolamento físico, não há necessidade de controle da polinização para as espécies consideradas. Contudo, acessos e plantas devem ser devidamente identificados.

As vagens secas são colhidas manualmente e de forma individual, e as etiquetas as acompanham até o processo final. Posteriormente, são submetidas à secagem, durante cerca de cinco dias. Após a secagem é feita a debulha manual e as sementes ainda são submetidas ao vento e sol para completar o processo de secagem. Todo e qualquer fragmento do lote de sementes como, por exemplo, pó, terra ou fragmentos vegetais, deverão ser eliminados.

Foto: Semíramis Rabelo Ramalho Ramos



Figura 8. Acessos de feijão caupi em processo de multiplicação e regeneração.

O número de vagens e sementes de cada acesso é contabilizado e registrado. Novas amostras são compostas mediante a coleta de sementes de cada planta que foi considerada no processo de multiplicação. Posteriormente, os lotes regenerados são enviados à COLBASE, e os lotes multiplicados alimentam a demanda do BAG.

Infraestrutura necessária

A estrutura necessária para multiplicação e regeneração de sementes em bancos de germoplasma deve atender a dois aspectos básicos. O primeiro trata-se de tomar os cuidados necessários para manter a variabilidade original de cada acesso ou amostra coletada que implica, entre outros, na realização de polinizações controladas. Para tanto é necessário o treinamento da equipe de campo e grande parte do tempo desta, dedicado às ações de campo. A depender do sistema reprodutivo da espécie e da estratégia utilizada, os processos de multiplicação e regeneração podem ser realizados no campo, em área isolada de cultivo, ou em área protegida, telado ou casa de vegetação. Nesse caso, além de equipe treinada, é necessário o suporte físico (bandeja ou vasos) para a condução dos acessos durante todo o ciclo.

Um segundo aspecto, também muito importante, é colher amostras de semente de alta qualidade, no sentido de vigor e germinação, para que essa semente possa ser mantida a longo prazo em câmaras frias. Para tanto, cuidados na época certa de colheita e transporte dos frutos, extração, secagem e beneficiamento das sementes são fatores de extrema importância para garantir a qualidade da mesma. O importante é manter, nos processos de multiplicação e regeneração, as condições que garantam e recuperem a máxima variabilidade original da amostra. A qualidade da semente vai permitir que essa amostra

fique armazenada por longos períodos em câmaras frias, sem a necessidade de nova multiplicação ou regeneração durante o período de conservação.

Dificuldades encontradas e considerações finais

Existem técnicas e embasamento teórico disponível para tentar manter a representatividade genética dos acessos conservados. Contudo, há um número de fatores relacionados à conservação do germoplasma que afetam o N_e (FRANKEL *et al.* 1995). Além disso, nos processos de regeneração e multiplicação, ainda não há a definição do tamanho efetivo ideal que se deve manter para muitas espécies. De acordo com Vencovsky (1987), não existe uma única resposta possível, pois tudo depende do rigor com que se quer ou se pode trabalhar. Ainda de acordo com o autor, manter tamanhos efetivos maiores, dentro das possibilidades, não deixa de ser uma estratégia saudável.

Na prática pode ser um tanto difícil adequar os conceitos teóricos, principalmente em se tratando de grande quantidade de materiais a serem trabalhados. Se considerarmos o cruzamento biparental em cadeia para a multiplicação, em não havendo sincronia no aparecimento das flores masculinas e femininas, haverá comprometimento na adoção da metodologia. Por outro lado, se houver a ocorrência de dormência nas sementes, ou ainda sementes de baixo poder germinativo quando do momento de coleta de sementes do estoque dos agricultores, e o não atendimento ao número mínimo de plantas necessárias para os cruzamentos, o acesso também estará sub-representado. A ocorrência destas e de outras dificuldades afetam a frequência dos alelos na população e comprometem a representatividade da amostra original.

Deve-se destacar o problema que ocorre no processo de multiplicação e regeneração de sementes de espécies alógamas. Para abóbora e moranga, por exemplo, o processo é lento e devem ser considerados alguns aspectos importantes: a) espaçamento e tamanho de parcela – cada planta de abóbora ou moranga ocupa uma área que varia de 6 a 24 m² (3 m x 2m a 6 m x 4 m), exigindo áreas extensas, mão de obra abundante e muitos insumos; portanto, a maioria das áreas de plantio para multiplicação/regeneração de abóboras e morangas é em campo aberto; b) controle e horário de polinização – nessas espécies, as flores usadas nos cruzamentos são fechadas no dia anterior à antese; a taxa de fecundação só é efetiva se a polinização ocorrer na parte da manhã do dia da antese, normalmente até as 10 h. A taxa de pegamento de frutos é baixa; portanto, grande número de cruzamentos deve ser feito para garantir quantidade de sementes suficientes para assegurar uma amostra representativa da variabilidade original. Essa amostra ideal é de 4.000 sementes, mas nunca menor do que 1.000. Em função de todos esses aspectos acima descritos, calcula-se que se consegue multiplicar e regenerar 40 acessos do BAG por ano, metade em cada semestre. Assim, para uma coleção de germoplasma de abóbora de 500 acessos, pode demorar mais de 12 anos para se ter toda a coleção multiplicada.

Vale ressaltar que é de extrema necessidade o registro e o armazenamento das informações técnicas (número de plantas, efetividade do controle de polinização, composição final da amostra) sobre a condução de cada processo de multiplicação/regeneração, utilizando-se ou não delineamento experimental. Recomenda-se, ainda, considerar que não só o curador do BAG tenha essa informação registrada e disponível, mas também que o curador do produto na COLBASE tenha em sua base de informação esse registro, o qual é de extrema importância para se fazer inferências sobre a representatividade genética do acesso ao longo do tempo.

Referências

ALLARD, R. W. Population structure and sampling methods. In: FRANKEL, O. H.; BENETT, E. ed. **Genetic resources in plants – their exploration and conservation**. Oxford, UK: Blackwell, 1970. p. 97-107.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG, UFV. Imprensa Universitária, 1997. 547 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. Ato nº 4, de 19 de agosto de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 ago. 2010. Seção 1, p. 6-7.

BREESE, E. L. **Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background**. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, IT, 1989. 69 p.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge, UK: University Press, 1995. 299 p.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. IPGRI Technical Bulletin. nº 1 (J. M. M. Engels and J. Toll, vol. eds.) International Plant Genetic Resources Institute, Rome, IT. 63 p.

JOHNSON, R. C.; BRADLEY, V. L.; EVANS, M. A. Effective population size during grass germplasm seed regeneration. **Crop Science**, Madison, n. 42, p. 286-290, 2002.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. ZIMMERMANN, M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia, GO: Editora UFG, 1993. 271 p.

RAMOS, S. R. R.; ROCHA, M. M.; AZEVEDO, J. N.; SANTOS, E. P. A.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; SPONHOLZ, C. Situação atual e prioridades do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) da Embrapa Meio-Norte. IN: WETZEL, M. M.; FERREIRA, M. A. J. F.; ESPINOSA, W. **Workshop internacional de Curadores de Germoplasma**. 2003. Brasília. Anais... Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. CD-ROM (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 97).

RAMOS, S. R. R.; SANTOS, E. P. A.; FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. M.; RIBEIRO, V. Q.; LOPES, A. C. de; SOBRAL, P. V. C. **Descrição morfoagronômica de acessos de feijão-caupi e feijão-mungo introduzidos no banco ativo de germoplasma da Embrapa Meio-Norte: dados quantitativos.** Teresina, PI: Embrapa Meio-Norte, 2008. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio-Norte, 80).

ROMÃO, R. L.; QUEIROZ, M. A.; VENCOVSKY, R.; ASSIS, J. G. A. Metodologia para multiplicação de acessos de melancia do BAG de cucurbitáceas do CPATSA/EMBRAPA. CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 40. **Anais...** Caxambu, MG: SBG, 1994. p. 327.

SOBRAL, P. V. C.; RAMOS, S. R. R.; ROCHA, M. de M.; FREIRE FILHO, F. R.; SANTOS, J. O.; MEIRELLES, A. C. de S.; BARROS, G. de B. Caracterização agrônômica de variedades tradicionais de feijão-caupi do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 1, 2007. Suplemento.

TOLL, J.; TAO, K. L.; ENGELS, J. M. M.; FRISON, E. A. Genebank management. In: FRISON, E. A.; BOLTON, M. (ed). **Proceedings of a joint FAO/IPGRI workshop on "ex situ" germplasm conservation.** Rome, IT, IPGRI, 1994. p. 10-16.

VALLS, J. F. M.; VEIGA, R. F. de A.; BARBIERI, R. L.; RAMOS, S. R. R.; BUSTAMANTE, P. G. Conservação ex situ de recursos fitogenéticos. In: MARIANTE, A. da S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. D. V. In: **Informe nacional sobre a situação dos recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura do Brasil.** 2008. 113 p.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, SP, nº 35, p. 79-84. 1987.

VENCOSVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, Madison, nº 43, 2003. p. 1912-1921.

VENCOSVSKY, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. da F. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (ed.) **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 233-280.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*