



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
SAIN Parque Rural Asa Norte - Caixa Postal 02372 CEP.: 70.770-900 Brasília-DF
Fone: (061) 340 - 3600 FAX: (061) 340 - 3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 17, Junho/97, p. 1-8

ESTRATÉGIAS PARA REGENERAÇÃO DE GERMOPLASMA VEGETAL

Luciano Lourenço Nass¹
Afonso Celso Candeira Valois¹

1. Introdução

A conservação e uso de recursos fitogenéticos se constituem em fatores fundamentais para a sustentabilidade da agricultura, tanto no âmbito nacional como internacional.

Para a caracterização e avaliação do germoplasma conservado visando a utilização é da maior importância que os acessos representados por amostras de sementes armazenadas nas diversas modalidades de conservação permaneçam ao longo do tempo com bom nível de representatividade genética em relação às populações originais, evitando-se a todo custo a erosão genética e a conseqüente descaracterização dos genótipos conservados.

Dentro da metodologia atualmente aplicada, periodicamente as amostras de sementes são monitoradas quanto ao poder germinativo e vigor na expectativa que haja a permanência da estabilidade genética dos materiais armazenados.

No entanto, se o poder germinativo cair a níveis inferiores à 85% daquele determinado por ocasião do início do processo de conservação, então existe a premente necessidade de se proceder a regeneração dos acessos pelo emprego de métodos adequados que permitam explorar o tamanho efetivo e a frequência gênica, considerando a forma de reprodução sexuada das plantas.

A prática da regeneração de amostras de recursos genéticos de plantas se apresenta como uma necessidade inclusive internacional, pois muitos dos 6,1 milhões de acessos conservados *ex situ* nos 1.320 bancos de germoplasma implantados nas diversas regiões do mundo necessitam ser regenerados. Isso é tão importante que se constitui em prioridade no Plano Global de Ação da FAO para a conservação e uso de recursos genéticos, aprovado por ocasião da "Quarta Conferência Técnica Internacional", realizada em Leipzig (Alemanha), em junho de 1996.

¹ Eng. Agr. PhD - Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa/Cenargen



No presente trabalho são apresentados aspectos gerais da regeneração de amostras de sementes, bem como, as estratégias para essa regeneração.

2. Aspectos Gerais da Regeneração

A regeneração de germoplasma é parte componente de um programa de conservação. Pode-se afirmar que ela é vital no manejo de um banco de germoplasma. Dois fatores devem ser considerados conjuntamente, frequência requerida de regeneração associada com métodos de regeneração. A frequência requerida de regeneração é claramente uma função do tamanho inicial da amostra, da demanda pelo uso e do período de viabilidade da semente sob condições de armazenamento. Atualmente, com as técnicas disponíveis de armazenamento é possível manter a viabilidade da amostra por muito tempo. Isto é um fator importante para reduzir custos e riscos de várias regenerações de acessos mantidos a longo prazo (coleção de base). Entretanto, não reduz os problemas com multiplicação de sementes a partir da coleção ativa para ações de avaliação ou para utilização pelos melhoristas. Por exemplo, a amostra inicial coletada pode ser muito pequena.

Dentro deste enfoque é conveniente a separação das ações de regeneração de amostras conservadas a longo prazo das ações de multiplicação de amostras conservadas a curto e médio prazos para a distribuição e utilização. Assim, é possível o uso de diferentes frequências e padrões na produção de sementes. Este fato é diretamente relacionado com o tamanho das coleções. Muitas vezes o tamanho é tão elevado que existe uma falta de ação para utilizar o material disponível nas coleções. O tamanho das coleções gera dificuldades em várias atividades rotineiras nos bancos de germoplasma, como caracterização, avaliação, regeneração e multiplicação. Possíveis alternativas nesse sentido são os conceitos de coleções nucleares (*core collections*) e conservação *in situ*.

O objetivo da conservação de germoplasma é capturar e manter a diversidade genética existente para que ela possa ser aproveitada pelos programas de melhoramento. Segundo Hoyt (1988) são cinco as categorias do germoplasma :

parentes silvestres - os parentes silvestres das plantas cultivadas compartilham ancestrais comuns com as plantas cultivadas, porém mantiveram-se silvestres como produto da natureza;
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;

cultivares obsoletas - as cultivares obsoletas não utilizadas nas primeiras épocas do melhoramento genético, agora são encontradas principalmente nas coleções de germoplasma;

linhas avançadas de melhoramento, mutações e outros produtos dos programas de melhoramento - as linhagens 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;

cultivares modernas - as cultivares elite de alta produtividade, desenvolvidas por meio de melhoramento vegetal, para a agricultura intensiva moderna.

Para a maioria das culturas de interesse tanto alimentícias como industriais, os acessos mantidos nas coleções geralmente são inferiores em termos de desempenho e produtividade em comparação com o germoplasma elite atualmente em uso. Assim, o aumento dos recursos genéticos tem por objetivo principal fornecer genes ou combinações gênicas para a modificação dos cultivares e híbridos existentes (Breese, 1989). Nesse sentido, o valor das coleções estaria baseado na possibilidade de fornecer variabilidade genética para características específicas de interesse do melhoramento, tais como: adaptabilidade, resistência a fatores bióticos e abióticos, qualidade nutricional e plantas fisiologicamente mais eficientes.

Partindo da premissa que o acesso representa adequadamente uma população de plantas que contém características de interesse, o objetivo passa a ser assegurar que estas características sejam mantidas durante as sucessivas gerações de reprodução. Breese (1989) relaciona os riscos na manutenção da integridade da amostra em dois fatores principais:

Contaminação:

- a. alteração pela ocorrência de pólen estranho durante a fertilização;
- b. mistura durante a colheita, debulha e empacotamento (embalagem);
- c. mutação gênica;

Erosão genética:

- a. deriva genética devido a perda ao acaso de genes, particularmente em populações pequenas;
- b. perda seletiva de alelos devido a seleção natural inconsciente.

Na definição dos princípios para manter a integridade genética são necessários conhecimentos sobre estrutura genética das populações e genética de populações. Entretanto, em termos práticos, aspectos relacionados com a biologia das espécies, como fisiologia reprodutiva, potencial de produção de sementes e métodos de polinização, são determinantes do sucesso da manutenção da integridade genética das amostras. Esse conjunto de fatores determina a praticabilidade e o custo para obtenção de quantidades suficientes de sementes em relação aos recursos disponíveis de tempo, trabalho e facilidades. Portanto, deve-se considerar cada espécie em particular e seus limites em relação a: (a) necessidade de isolamento e como procedê-lo; (b) técnica para realização dos cruzamentos; (c) tamanho efetivo populacional e; (d) condições de cultivo para minimizar os efeitos de uma seleção inconsciente ou de seleção natural.

A regeneração de sementes é obviamente uma operação trabalhosa e cara. Entretanto, mesmo conduzindo a regeneração cuidadosamente, sucessivos estrangulamentos (efeito de gargalo) podem aumentar a erosão genética e o risco de alteração do gene. Condições adequadas de armazenamento reduzem consideravelmente a frequência de regeneração, consequentemente assegurando a integridade do acesso por longo prazo. A regeneração inicial é exigida quando a amostra coletada é muito pequena para o armazenamento, avaliação inicial ou para distribuição aos usuários. Normalmente uma amostra representativa (> 2.000 sementes) é conservada a longo prazo na coleção de base e o restante é mantido na coleção ativa para distribuição e uso. Os acessos da coleção de base são regenerados quando o poder germinativo é reduzido (< 85% em relação ao poder germinativo inicial); por sua vez, os acessos mantidos na coleção ativa são regenerados sempre que os estoques estão reduzidos ou com viabilidade comprometida.

3. Estratégias de Regeneração

A manutenção da estrutura genética dos acessos dependerá do estabelecimento de um tamanho efetivo populacional, o qual deve considerar a relação de sexo dos progenitores (número efetivo de progenitores), o grau de endogamia e o número de gerações. Vencovsky (1986) salienta que o tamanho efetivo populacional pode ser considerado como sendo a medida da representatividade genética contida na amostra em relação à geração imediatamente anterior.

Nos procedimentos de regeneração de germoplasma, com manutenção das características genéticas dos acessos, as amostras de plantas alógamas demandam tamanhos maiores que aqueles exigidos para a regeneração de amostras de plantas autóginas (Vilela Morales *et al.*, 1997).

Na regeneração de populações autóginas com variabilidade genética, isto é, constituídas de mistura de linhagens puras, sem controle gamético e considerando u como a proporção de sementes da amostra original utilizada para a regeneração, a expressão genérica do tamanho efetivo é dada por $N_e = Nu/2$. Evidentemente, u corresponde ao poder germinativo quando todas as sementes disponíveis são utilizadas na regeneração. Caso seja exercido o controle gamético, mediante a retirada de igual número de sementes de cada indivíduo, tem-se $N_e = Nu/(1 - u)$ de acordo com R. Vencovsky *. Nestas fórmulas admite-se tamanho constante de uma geração para outra ($n = N$). Por outro lado, na regeneração de linhagens puras ou clones não há necessidade de preocupação com N_e , haja vista que neste caso, obviamente, não existe variação nas frequências alélicas de uma geração para outra.

Nas espécies de polinização cruzada, o tamanho efetivo depende do sistema de cruzamento e da maneira como os gametas são amostrados. De acordo com Hallauer & Miranda Filho (1988) a manutenção do germoplasma pode ser realizada conforme os procedimentos abaixo relacionados.

(1) Amostra a ser regenerada é tratada como uma espécie monóica, ou seja, cada planta é uma fonte potencial de gametas femininos e masculinos, os quais podem ser amostrados com o sem controle. Nesse caso três tipos de amostragem são possíveis:

(a) Controle do número de gametas femininos e masculinos, o que só é possível através de polinizações manuais. Assim, cada planta macho contribui com um número igual de gametas para a próxima geração. Para se obter uma contribuição igual de gametas masculinos deve-se retirar um número igual de sementes de cada espiga polinizada, o que implica numa contribuição igual de gametas femininos para a próxima geração. Nesta situação, o tamanho efetivo populacional corresponde ao dobro do número de plantas da amostra ($N_e = 2N$).

* Comunicação pessoal feita em 1996 por R. Vencovsky da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

(b) Controle apenas do número de gametas femininos. A contribuição de um número igual de gametas femininos é obtida quando é tomado um número igual de sementes da cada espiga (progenitor feminino), sendo que a polinização ocorre ao acaso e cada planta masculina contribui de maneira desigual para a próxima geração. Nesta situação, o tamanho efetivo populacional corresponde a 1,33 vezes o número de plantas da amostra ($N_e = 1,33N$).

(c) Sem controle de gametas femininos e masculinos. Nesta situação tem-se um lote isolado com N plantas e a polinização ocorre ao acaso, e por ocasião da colheita é tomado um número diferente de sementes. Desta forma, não há controle algum da contribuição dos gametas femininos e masculinos e o tamanho efetivo populacional corresponde ao número de plantas da amostra ($N_e = N$).

Nos itens a, b e c, os valores de N_e são válidos se não ocorrer perda do poder germinativo na amostra a ser regenerada. Crossa & Vencovsky (1994) desenvolveram metodologia apropriada para calcular a variância do número de gametas contribuídos para a geração seguinte, considerando os diversos procedimentos de regeneração de germoplasma e os diferentes níveis de controle gaméticos nas espécies monóicas. Nesse trabalho são apresentadas expressões apropriadas para as situações onde existe perda do poder germinativo (u) das sementes que serão utilizadas para a regeneração da amostra. A Tabela 1 apresenta um exemplo ilustrativo considerando-se ausência e ocorrência de queda no poder germinativo.

Tabela 1. Tamanho efetivo para as diversas alternativas de regeneração de germoplasma, considerando-se população de tamanho constante e espécie monóica.

Controle gamético	N_e	$u = 1$	$u = 0,7$
Masculino e feminino	$N[2u/(2-u)]$	$N_e = 2N$	$N_e = 1,08N$
Feminino	$N[4u/(4-u)]$	$N_e = 1,33N$	$N_e = 0,85N$
Ausente	Nu	$N_e = N$	$N_e = 0,7N$

* u = poder germinativo ($0 < u \leq 1$)

Fonte : Crossa & Vencovsky (1994)

(2) Amostra a ser regenerada é tratada como uma espécie dióica, ou seja, cada planta pode ser utilizada como macho ou fêmea, entretanto não pode contribuir com gametas masculinos e femininos simultaneamente. Nesta situação o tamanho efetivo populacional pode variar de acordo com o número de plantas macho e fêmea utilizadas e se existe ou não controle do número de gametas masculinos e femininos para formar a próxima geração. Outras três alternativas são possíveis:

(a) Controle dos gametas masculinos e femininos através de cruzamentos planta a planta. O tamanho efetivo populacional será $N_e = 8 N_m N_f / (N_f + N_m)$ onde N_m corresponde ao número de progenitores masculinos e N_f ao número de progenitores femininos.

(b) Controle apenas dos gametas femininos, ou seja, a polinização ocorre ao acaso e é tomada igual quantidade de sementes de cada progenitor feminino. Nesse caso o tamanho efetivo populacional será $N_e = 16 N_m N_f / 3(N_f + N_m)$.

(c) Sem controle dos gametas masculinos e femininos, ou seja, a polinização ocorre ao acaso e um número desigual de sementes é tomado de cada indivíduo. Neste caso o tamanho efetivo populacional será $N_e = 4 N_m N_f / (N_f + N_m)$.

Crow & Kimura (1970) mostraram que o tamanho efetivo de uma amostra considerando-se t gerações é obtido pela média harmônica dos tamanhos efetivos das gerações consideradas, ou seja:

$$(1/N_e) = (1/t) \sum_i (1/N_{e_i})$$

Eventualmente, no decorrer das gerações de regeneração, pode ocorrer uma redução acentuada do tamanho efetivo populacional, fenômeno conhecido como efeito de gargalo. Na Tabela 2 pode-se constatar a consequência desse fenômeno. No exemplo ilustrativo verifica-se que na situação A o tamanho efetivo populacional da amostra ($N_e = 200$) foi mantido ao longo das gerações de regeneração, entretanto nas demais situações B, C, D e E observa-se uma drástica redução na terceira geração, fato que evidencia claramente a dificuldade de se recuperar o tamanho efetivo desejável, mesmo utilizando-se quantidades elevadas de indivíduos como nas situações D e E.

Tabela 2. Simulação do efeito de gargalo sobre o tamanho efetivo populacional da amostra (N_e) após quatro gerações consecutivas de regeneração.

Situação	Gerações				Tamanho Efetivo (N_e)
	1	2	3	4	
A	200	200	200	200	200,0
B	200	200	40	200	100,0
C	200	200	40	1000	111,1
D	200	200	40	10000	113,9
E	200	200	40	20000	114,1

Crossa (1989) discute metodologias para estimar o tamanho da amostra necessário para a conservação de espécies de cruzamento. Na Tabela 3 pode-se verificar alguns exemplos do tamanho adequado da amostra para manter alelos com diferentes frequências.

Tabela 3. Tamanho da amostra em função da frequência dos alelos presentes na população.

Frequência	Tamanho da Amostra
> 10%	40 indivíduos
5%	100 indivíduos
< 5%	Amostras maiores
1%	300 a 400 indivíduos

Fonte : Crossa (1989)

Estudos mais recentes têm indicado que para manutenção de alelos com frequência $\leq 1\%$ a amostra deve ser maior que 400 indivíduos - conforme informação de J. Crossa¹¹. Um sistema prático para regeneração de acessos de milho é descrito por Crossa (1989). Supondo que dispomos de uma coleção de 100 espigas de milho. Tomar ao acaso uma semente de cada espiga e colocar em um saquinho; repetir a operação até completar dois saquinhos com uma semente de cada espiga. Fazer dois blocos de regeneração (1 planta/cova); cada bloco terá 100 plantas, ou seja, uma planta a partir de cada espiga original. Realizar 50 cruzamentos ao acaso dentro de cada bloco, usando cada planta somente como macho ou fêmea (não ambos). A partir das 100 espigas obtidas (50 de cada bloco) tomar novamente uma semente de cada espiga até completar dois saquinhos de cada espiga, os quais serão utilizados para o próximo ciclo de regeneração. Com este procedimento obtem-se $N_e = 200$, ou seja, $N_e = 2N$. Este esquema é similar ao esquema biparental recomendado por Gale & Lawrence (1984). Outras alternativas para regeneração de acessos de milho podem ser encontradas no trabalho de Crossa *et al.* (1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CROSSA, J. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 2, p.153-161, 1989.

CROSSA, J.; VENCOVSKY, R. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 7/8, p. 936-942, 1994.

CROSSA, J.; TABA, S.; EBERHART, S.A.; BRETTING, P.; VENCOVSKY, R. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 1, p. 89-95, 1994.

- GALE, J.S.; LAWRENCE, M.J. The decay of variability. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T., eds. **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984, p. 77-101.
- HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468p.
- HOYT, E. **Conserving the wild relatives of crops**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1988. 45p.
- VENCOVSKY, R. **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1986. 15p. (Embrapa\CENARGEN. Boletim d pesquisa, 1).
- VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CENARGEN, 1997. 78p.