

6

Banco de sementes e a conservação de germoplasma de eucaliptos e corimbias pela Embrapa Florestas

Elisa Serra Negra Vieira

Introdução

O armazenamento de amostras de sementes por longo prazo, nos chamados bancos de sementes, é a principal estratégia para a conservação de germoplasma *ex situ*. A razão para a criação dos bancos de sementes é a conservação da biodiversidade das plantas, em função da possibilidade de ocorrência de desastres naturais, ataque de pragas e doenças e pela ação do homem. Além disso, as mudanças climáticas e também os processos de domesticação e de melhoramento genético reduzem a diversidade genética das espécies, podendo levar a perdas de genes de interesse.

Pelegrini e Balatti (2016) classificaram a evolução da conservação de germoplasma em bancos de sementes, em três estágios. Inicialmente, a conservação das sementes era realizada de forma primitiva, ainda nos primórdios da agricultura, envolvendo a manutenção de sementes para uso próprio e para trocas. Um segundo estágio, que ocorreu entre os séculos 16 e 19, compreendeu o transporte de sementes de culturas de valor econômico de regiões remotas para a Europa e, mais tarde, deste continente para suas colônias. Nesta época foram criados os primeiros jardins botânicos. O terceiro estágio se iniciou no século 20 e compreendeu a conservação das sementes como uma forma de garantir a conservação da biodiversidade, definindo o que atualmente deve ser um banco de sementes, ou seja, um reservatório da variabilidade genética das plantas existentes na natureza. Bancos de sementes podem ser considerados como bancos de genes, pois sementes de vários representantes de uma mesma espécie são coletadas e armazenadas, sendo mantida assim sua variabilidade.

A assinatura da Convenção sobre Diversidade Biológica, em 1992, reafirmou o caráter de conservação dos bancos de sementes. Desde então, vários bancos de sementes têm sido criados, havendo aproximadamente 1.750 bancos de plantas no mundo com 7,4 milhões de amostras (acessos) armazenados (FAO, 2014; Pellegrini; Balatti, 2016; Colville; Pritchard, 2019).

Entretanto, a maioria dos bancos de sementes é de espécies de culturas anuais, devido à sua importância para a alimentação. A partir de 2002, com a adoção da Estratégia Global para a Conservação de Plantas, segundo a qual no mínimo 75% das espécies de plantas globalmente ameaçadas de extinção deveria estar incluído em coleções *ex situ*, aumentou o número de amostras de sementes de espécies nativas, entre elas florestais, coletadas e armazenadas nos bancos de sementes (Liu et al., 2018).

Bancos de sementes de eucaliptos e corímbias da Embrapa Florestas

Em meados da década de 1980 a Embrapa Florestas, com o apoio do Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) e do Banco Internacional para Reconstrução e Desenvolvimento (Bird), realizou a coleta de sementes de várias espécies e procedências de eucalipto e corímbia na Austrália, as quais foram trazidas para o Brasil e cuja parte ainda se encontram armazenadas no banco de sementes do Laboratório de Análise de Sementes Florestais da Unidade. Estas introduções foram resultado de um grande esforço da Embrapa Florestas e de seus parceiros, constituídos por universidades, instituições de pesquisa e empresas públicas e privadas do setor florestal brasileiro, para garantir a disponibilidade de germoplasma de eucalipto e corímbias para o País, antevendo a possível perda de germoplasma por desastres naturais e ação do homem nas áreas de origem das espécies, ou pelo afunilamento da diversidade genética e fixação de características de interesse nos programas de melhoramento.

Sementes de cinquenta espécies de eucaliptos e corímbias foram armazenadas na Embrapa Florestas durante os últimos quarenta anos. Além das espécies coletadas na Austrália, foram também obtidas amostras de sementes de *E. grandis* da África do Sul; *E. urophylla* da Indonésia (regiões de Mandiri, Lewotobi e Monte Egon), *E. tereticornis* da Tailândia (região de Kanchanaburi) e *Corymbia polycarpa* da Nova Guiné, sendo as coletas realizadas entre os anos de 1981 e 1984, por iniciativa de algumas empresas florestais privadas brasileiras.

No banco de sementes da Embrapa Florestas existem aproximadamente 3.000 amostras de várias procedências de eucaliptos e corímbias, estando todas armazenadas em embalagem impermeável de vidro ou alumínio e em câmara de armazenamento sob temperatura de -5°C. Vale ressaltar a importância que representa esse banco de sementes da Embrapa Florestas, em termos de recursos genéticos *ex situ* de eucaliptos e corímbias, uma vez que muitas áreas com populações naturais de eucaliptos na Austrália, principalmente de espécies de interesse ao Brasil, vêm sendo transformadas em parques nacionais, com indisponibilidade de acesso para a futura coleta de materiais genéticos ou não mais existem devido a catástrofes naturais ou intervenção humana.

Apesar da atual valorização da conservação dos recursos genéticos florestais e das ações que têm sido feitas neste sentido, aproximadamente 10.000 espécies arbóreas em nível global estavam em risco de extinção em 2017, de acordo com a Associação Internacional de Jardins Botânicos (Saritama, 2018). A Austrália, no período de 1996-2008, apresentou taxa de perda de biodiversidade na ordem de até 10%, segundo dados levantados por Waldron et al. (2017). É provável que algumas amostras armazenadas no banco de sementes de eucalipto e corímbia da Embrapa Florestas pertençam

a árvores que não existam mais em suas origens, uma vez que a Austrália possui áreas com a biodiversidade da flora altamente ameaçada, como a região oeste e as regiões de floresta do leste do país (New South Wales e Queensland). Em uma previsão dos efeitos das mudanças climáticas para os próximos 60 anos, González-Orozco et al. (2016) relataram uma provável diminuição de área geográfica para 657 espécies de eucalipto (incluindo corimbias) na Austrália, sendo 2,4% delas extintas.

O valor de um banco de sementes é maior quanto mais bem caracterizadas forem as amostras de sementes armazenadas, o que consiste na correta identificação taxonômica da planta, representatividade genética da espécie, número de indivíduos dos quais as sementes foram coletadas, localização geográfica com descrição do habitat e do fenótipo das plantas, sementes com viabilidade, longevidade e em quantidade suficiente para uso (Liu et al., 2018). Para muitas amostras de sementes de eucalipto coletadas na Austrália e armazenadas no banco de sementes da Embrapa Florestas, fotografias das árvores das quais foram coletadas estão disponíveis, sendo um registro das características de cada fenótipo (Figura 1).



Fotos: Roberto Alonso da Silveira

Figura 1. Exemplares de árvore de *Eucalyptus grandis* (A) localizada a aproximadamente 30 Km a sudeste de Mareeba (Queensland), e árvore de *Eucalyptus cloeziana* (B) localizada em Blackdown Tableland (Queensland), utilizadas para coleta das sementes que compõem o banco de sementes de eucalipto da Embrapa Florestas.

Comparada à conservação *in situ*, a conservação *ex situ* em bancos de sementes apresenta vantagens como manutenção de grande parte da variabilidade das espécies em pequeno espaço físico e a relativa facilidade de coleta das sementes (Liu; Pritchard, 2009). Além disso, o custo da conservação *ex situ* corresponde a 1% do custo da conservação *in situ*, mesmo havendo custos com a coleta das sementes, seu processamento e monitoramento da viabilidade (Liu; Pritchard, 2009; Saritama, 2018). Outro ponto importante é o risco de perda das amostras, seja por danos físicos e genéticos que podem ocorrer nas áreas naturais. Apesar dessas vantagens, a conservação *in situ* e *ex situ* são complementares, sendo ideal a manutenção das duas formas.

Cuidados preconizados para o estabelecimento de um banco de sementes

Armazenamento de sementes ortodoxas no longo prazo

Em termos fisiológicos, as sementes são classificadas em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias, de acordo com seu comportamento frente à perda de água na etapa final do seu desenvolvimento e a manutenção da viabilidade durante o armazenamento. Esta é uma classificação clássica proposta por Robert (1973), a qual é amplamente conhecida e praticada na área de tecnologia de sementes.

Sementes que não perdem água durante o seu desenvolvimento, apresentando umidade superior a 20% após o ponto de maturidade fisiológica, e que não toleram o armazenamento em temperaturas baixas e negativas, são classificadas como recalcitrantes e intermediárias (Berjak; Pammenter, 2008). Por outro lado, sementes que toleram a dessecação no final de seu desenvolvimento, pois possuem todo o aparato fisiológico como sistemas antioxidantes, proteínas específicas e proteção contra danos moleculares devido à perda de água, são classificadas como ortodoxas (Berjak; Pammenter, 2008). Essas sementes também suportam o armazenamento sob temperaturas baixas e negativas, sendo possível sua conservação por longo período, em bancos de sementes.

Especificamente para sementes de espécies florestais, Bonner (1990) propôs a seguinte classificação em termos de comportamento no armazenamento: sementes ortodoxas verdadeiras (toleram a secagem sob umidade inferior a 10% e armazenamento sob temperaturas abaixo de 0 °C); sementes sub-ortodoxas (apresentam menor longevidade quando comparadas às ortodoxas verdadeiras, nas mesmas condições de armazenamento); sementes recalcitrantes temperadas (não toleram a secagem sob baixos teores de água, mas toleram o armazenamento no longo prazo, em condições de congelamento); sementes recalcitrantes tropicais (armazenadas com elevado teor

de água e apresentam sensibilidade à dessecação e em baixas temperaturas). Sementes dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* são ortodoxas verdadeiras e, assim, podem ser conservadas em bancos de sementes, por muitos anos, mantendo sua viabilidade, desde que armazenadas nas condições corretas de temperatura e umidade.

Bancos de sementes convencionais, nos quais são mantidas estritamente amostras de sementes ortodoxas, adotam procedimentos de armazenamento padronizados pela comunidade internacional (CDB, 2002; FAO, 2014). Tais procedimentos compreendem a verificação da umidade inicial da amostra de sementes, sua redução para 15% e posterior verificação da viabilidade mínima de 85% após a secagem, realizada pelo teste de germinação. Confirmada a viabilidade, as sementes são colocadas em embalagem impermeável e armazenadas em câmaras com temperatura de -20 °C. A embalagem adequada para a conservação de sementes ortodoxas em bancos de sementes, por longo período é a de folhas de alumínio, tendo sido relatada na literatura a manutenção da viabilidade de sementes ortodoxas por até 25 anos, quando armazenadas neste tipo de embalagem, nas condições ambientais apropriadas (van Treuren et al., 2013).

A redução da umidade das sementes e armazenamento em temperatura baixa é essencial, pois a longevidade das mesmas é afetada por dois principais fatores que são a umidade e a temperatura do ambiente de armazenamento, além da viabilidade inicial (Roberts, 1982; Koo et al. 2003).

Em intervalos de dez anos devem ser realizados testes de germinação para a verificação da viabilidade das sementes armazenadas e, estando a germinação menor que 85%, novas sementes devem ser coletadas e depositadas no banco de sementes (CDB, 2002; FAO, 2014). Um acompanhamento mais rigoroso da longevidade das amostras de sementes pode ser feito por meio de testes de germinação a cada três anos e devendo a viabilidade ser de 85% da viabilidade inicial da amostra. Tais recomendações são adotadas como uma regra geral, no entanto deve-se considerar as particularidades de cada espécie e sua situação de vulnerabilidade na natureza, no que diz respeito ao desaparecimento das fontes originais de semente devido a várias causas.

Na literatura é relatado que, mesmo tendo sido adotado o procedimento acima descrito, com redução de umidade e armazenamento em temperatura negativa e o posterior monitoramento da viabilidade das amostras nos bancos de sementes, 26% das coleções de sementes ortodoxas de várias espécies foram perdidas após 20 anos de armazenamento (Probert et al., 2013). Este procedimento, adotado por todos os bancos de sementes para o monitoramento da viabilidade, foi estabelecido com base em informações obtidas de estudos com sementes de culturas anuais. Assim, para espécies florestais talvez os parâmetros de umidade e temperatura de armazenamento, bem como o valor limite de 85% de viabilidade, possam ser diferentes. Fantinatti e Usberti (2007), empregando a equação de predição da longevidade de sementes

ortodoxas proposta por Ellis e Roberts (1984), ajustada para sementes de *Eucalyptus grandis*, concluíram que estas, com umidade de 7,5% e armazenadas na temperatura de 4 °C apresentariam redução da viabilidade de 85% para 50%, em um período de aproximadamente 20 anos.

A análise de sementes na conservação de germoplasma

Quanto menor a umidade das sementes armazenadas e menor a temperatura do ambiente de armazenamento, maior será sua longevidade (Ellis; Robert, 1984). Portanto, a determinação da umidade e da viabilidade das sementes, que compreendem etapas da análise de sementes, deve ser realizada.

A determinação do teor de água das sementes é realizada empregando-se o teste de umidade recomendado pelas Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009), sendo propostos três métodos de secagem: em estufa sob temperatura de $105 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ por 24 horas, em estufa sob baixa temperatura $101\text{-}105 \text{ °C}$ por 17 horas ± 1 hora e em estufa sob alta temperatura $130\text{-}133 \text{ °C}$ por até quatro horas. Para sementes dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* o método de referência é a secagem em estufa sob baixa temperatura, mas sendo também utilizado o método de secagem em estufa sob temperatura de 105 °C .

A quantidade de sementes necessária para a determinação da umidade das sementes é de, no mínimo, duas repetições de $4,5 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ o que, muitas vezes, é uma quantidade grande para amostras que já possuem uma pequena quantidade de sementes armazenadas, considerando o tamanho das sementes dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* e sua disponibilidade desde a coleta. Assim, a utilização de métodos não destrutivos para a determinação do teor de água é importante, como o método de equilíbrio de umidade relativa (eRH) que consiste na medição do equilíbrio higroscópico de uma amostra de sementes colocada em um recipiente fechado. Quando a umidade relativa atinge valores entre 25% e 30%, as sementes estarão com aproximadamente 8% de umidade, sendo este um valor ideal para o armazenamento das mesmas, no longo prazo e manutenção da viabilidade por sete a dez anos (Vankus; Karrfalt, 2017).

Para a determinação da viabilidade das amostras em bancos de sementes, os testes que podem ser empregados são o teste de germinação, teste de tetrazólio e raio-X (Vankus; Karrfalt, 2017). No entanto, para sementes dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*, o teste de germinação por repetições pesadas é o indicado, devido ao pequeno tamanho de suas sementes. A metodologia do teste varia de acordo com a espécie, em termos de temperatura para a sua condução e duração do mesmo, sendo essas informações encontradas nas RAS (Brasil, 2009), Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais (Brasil, 2013) e regras da ISTA (2015).

Considerações finais

Sementes ortodoxas, como as de eucaliptos e corímbias, apesar de apresentarem longevidade quando armazenadas nas condições ideais de umidade e ambiente com temperatura negativa, ainda podem perder a viabilidade. Dessa forma, o congelamento em nitrogênio líquido, denominado criopreservação, tem sido recomendado para sementes ortodoxas de várias espécies, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias específicas.

Em relação ao banco de sementes de eucaliptos e corímbias da Embrapa Florestas, após quase 40 anos de armazenamento, as amostras de sementes devem ser avaliadas quanto à viabilidade pelo teste de germinação, sendo assim necessário pessoal treinado em análise de sementes para a realização dos testes.

Além disso, com a disponibilidade de um grande número de marcadores moleculares desenvolvidos para o gênero *Eucalyptus*, a caracterização molecular das amostras armazenadas poderia ser realizada e, a partir do conhecimento das frequências alélicas, alelos raros poderão ser identificados, bem como a divergência entre as amostras das várias espécies armazenadas. Tal informação possui grande utilidade para os programas de melhoramento em andamento ou a serem iniciados, de forma a orientar cruzamentos e a identificar características de interesse.

Neste sentido, o banco de sementes de eucaliptos e corímbias da Embrapa Florestas possui as funções de apoiar o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à tecnologia de sementes, fornecer genótipos para os programas de melhoramento e apoiar a conservação de recursos genéticos das referidas espécies.

Referências

- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, n. 2, p. 213–228, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm168>.
- BONNER, F. T. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, v. 35, n. 1-2, p. 35-43, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília, DF, 2013. 98 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 398 p.
- CDB. Convention on Biological Diversity. **Global strategy for plant conservation**. Montreal: Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2002.
- COLVILLE, L.; PRITCHARD, H. W. Seed life span and food security. **New Phytologist**, v. 224, n. 2, p. 557-562, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16006>.

ELLIS, R. H. The meaning of viability. In: DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; WILLIAMS, J. T. **Seed management techniques for gene banks: a report of a workshop**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1984. 294 p.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved equations for the prediction of seed longevity. **Annals of Botany**, v. 4, p. 13-30, 1980.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Alelo**: Banco de Germoplasma da Embrapa. Disponível em: <http://alelobag.cenargen.embrapa.br/AleloConsultas/Passaporte/buscaNc.do>. Acesso em: 6 ago. 2019.

FANTINATTI, J. B.; USBERTI, R. Seed viability constants for *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 111-117, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture**. Roma, 2014. 182 p.

GONZÁLEZ-OROSCO, C. E.; POLLOCK, L. J.; THORNHILL, A. H.; MISHLER, B. D.; KNERR, N.; LAFFAN, S. W.; MILLER, J. T.; ROSAUER, D. F.; FAITH, D. P.; NIPPERESS, D. A.; KUJALA, H.; LINKE, S.; BUTT, N.; JULHEIM, C.; CRISP, M. D.; GRUBER, B. Phylogenetic approaches reveal biodiversity threats under climate change. **Nature Climate Change**, v. 6, p. 1110-1114, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/NCLIMATE3126>.

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/cot030>.

ISTA. Internacional Rules for Seed Testing. **Internacional seed testing association**. Zurich, Switzerland, 2015.

KOO, B.; PARDEY, P. G.; WRIGHT, B. D. The economic costs of conserving genetic resources at the CGIAR centres. **Agricultural Economics**, n. 29, v. 3 p. 287-297, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-5150\(03\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5150(03)00056-2).

LI, De-Z.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in Plants Science**, v. 14, n. 11, p. 614-621, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.005>.

LIU, W.; BREMAN, E.; COSSU, T. Z.; KENNEY, S. The conservation value of germplasm stores at the Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK. **Biodiversity and Conservation**, v. 27, n. 6, p. 1347-1386, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1497-y>.

PELLEGRINI, P. A.; BALATTI, G. E. Noah's arks in the XXI century: a typology of seed banks. **Biodiversity and Conservation**, v. 25, n. 13, p. 2753-2769, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1201-z>.

ROBERTS, E. H. Monitoring seed viability in gene banks. In: DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; WILLIAMS, J. T. **Seed management techniques for gene banks: proceedings...** Londres: Royal Botanical Gardens, 1982.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

RUSSIAN INSTITUT OF PLANT GENETIC RESOURCES. **PGR database**. Saint-Petersburg, [2019]. Disponível em: <http://db.vir.nw.ru/virdb/maindb?lang=en>. Acesso em: 8 ago. 2019.

SARITAMA, J. M. R. Conservación de semillas: una alternative inmediata para almacenar germoplasma forestal y recuperar los bosques secos amenazados del Ecuador. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 13, n. 1, p. 74-85, 2018.

SVALBARD GLOBAL SEED BANK. Alnarp: Nordgen, [2019]. Disponível em: <https://www.nordgen.org/en/global-seed-vault/search-seed-vault/>. Acesso em: 12 ago. 2019.

US NATIONAL PLANT GERMPLASM. Disponível em: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>>. Acesso em: 10 set. 2019.

VAN TREUREN, R.; DE GROOT, E. C.; VAN HINTUM, T. J. J. L. Preservation of seed viability during 25 years of storage under standard gene bank conditions. **Genetic Resources and Crop Evolution**, n. 60, v. 4, p. 1407-1421, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9929-0>.

VANKUS, V. G.; KARRFALT, R. P. The role of seed analysis in genetic conservation. In: WORKSHOP ON GENE CONSERVATION OF TREE SPECIES – BANKING ON THE FUTURE, 2016, Chicago, Illinois, USA. **Proceedings...** Portland, Oregon: Pacific Northwest Research Station, 2017. p. 158-162.

WALDRON, A.; MILLER, D. C.; REDDING, D.; MOOERS, A.; KUHN, T. S.; NIBBELINK, N.; ROBERTS, J. T.; TOBIAS, J. A.; GITTLEMAN, J. L. Reductions in global biodiversity loss predicted from conservation spending. **Nature**, v. 551, p. 364-367, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature24295>.

