

**CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**AFONSO CELSO CANDEIRA VALOIS¹
LUCIANO LOURENÇO NASS²
MARISA DE GOES²**

¹Embrapa Sede, C.P. 040315 - CEP: 70770-901 - Brasília, DF.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C.P. 02372 - CEP: 70770-900 - Brasília, DF.

1. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica abrange todas as espécies de plantas, animais e microrganismos, envolvendo ainda os ecossistemas e os processos ecológicos aos quais as espécies pertencem. Este conceito, elaborado ao longo dos anos, foi reafirmado durante a Convenção da Diversidade Biológica, promulgada no Rio de Janeiro em 1992.

Os países detentores da megadiversidade biológica são Brasil, Colômbia, Equador, México, Venezuela, Madagascar, Zaire, China, Índia, Indonésia, Malásia e Austrália. O Brasil é o mais rico em plantas, animais e microrganismos, pois possui cerca de 20% do total existente no Planeta.

Dentro deste contexto, nota-se que a maior parte da biodiversidade encontra-se nos países em desenvolvimento, que são dependentes de tecnologias, capacitação de recursos humanos e infra-estrutura existentes em países desenvolvidos, que por sua vez são altamente dependentes de biodiversidade. Este aspecto se traduz em um grande poder de negociação de países do Hemisfério Sul frente a países do Norte.

Khoshoo (1996) discutiu a relação entre biodiversidade e biotecnologia dividindo os países do mundo em quatro grupos principais: (1) pobres em biodiversidade e biotecnologia; (2) pobres em biodiversidade e ricos em biotecnologia; (3) ricos em biodiversidade e pobres em biotecnologia; e (4) ricos em biodiversidade e biotecnologia (Figura 1). No grupo 1 encontram-se os países do Oriente Médio (por exemplo, Arábia Saudita); no grupo 2 os países desenvolvidos como Estados Unidos, Japão, Alemanha, França, Inglaterra; no grupo 3 Indonésia, Índia, China, Malásia, Brasil, México e outros países tropicais ou subtropicais; e no grupo 4 não existe nenhum país com tais características. O autor salientou que existe um fluxo de biodiversidade do grupo 3 para o grupo 2. Entretanto, considerou difícil a avaliação do fluxo de biotecnologia na direção oposta.

A troca permanecerá desigual até que os países classificados no grupo 3 sejam auto-suficientes em biotecnologia, haja vista que tais países têm a possibilidade de alcançar o grupo 4, enquanto os países do grupo 2 não têm condição de atingir esse quadrante, uma vez que não dispõem de alta biodiversidade.

Fazendo-se uma análise sobre os cerca de 120 produtos que entram na dieta alimentar da humanidade vemos que apenas 15 espécies de plantas (arroz, banana, batata, batata-doce, beterraba açucareira, cana-de-açúcar, centeio, cevada, feijão, coco, mandioca, milho, soja, tomate e trigo) são consumidas por cerca de 80% da população e que apenas quatro espécies (arroz, batata, milho e trigo) são utilizadas por 60% da população mundial.

Diante deste quadro, é fácil o entendimento de que trata-se de um processo bastante vulnerável para a segurança alimentar dos povos, o que aumenta a responsabilidade dos países detentores de biodiversidade em aprofundar os estudos no desenvolvimento de tecnologias que estimulem o uso de espécies autóctones no sentido de aumentar a oferta e atender à demanda dos consumidores, diminuindo a

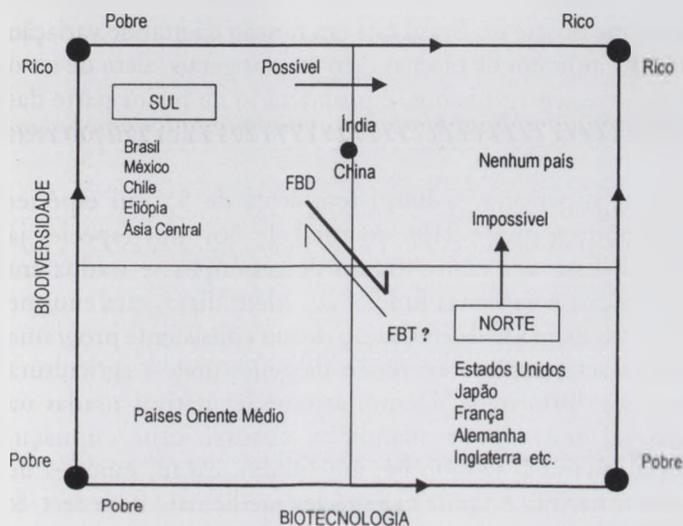


FIGURA 1. Relação entre biodiversidade e biotecnologia de acordo com Khoshoo (1996). (FBD: Fluxo de biodiversidade; FBT: Fluxo de biotecnologia)

dependência por espécies exóticas e aumentando o poder de barganha com os países do Norte. Mesmo países como o Brasil, proprietários de rica biodiversidade, são extremamente dependentes de produtos externos; cerca de 80% dos produtos alimentícios, que nos chegam à mesa, são originários de outros países.

Todos estes fatos aumentam a importância da conservação *ex situ* de recursos genéticos, isto é, o manejo do germoplasma fora do local de origem, tanto autóctones como exóticos, disponibilizando materiais para uso em programas de melhoramento genético, biotecnologia e ciências afins, no sentido da geração de novos genótipos para a segurança alimentar e outras utilidades.

O presente capítulo enfoca a aplicação de tecnologias disponíveis na conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais, com base na competência técnica acumulada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ao longo dos seus vinte e cinco anos de atuação.

2. BIODIVERSIDADE E RECURSOS GENÉTICOS

O binômio biodiversidade e recursos genéticos forma a base sólida da agrobiodiversidade visando ao desenvolvimento de uma agricultura sustentável na dimensão do agronegócio, da utilização social e do equilíbrio ambiental.

A biodiversidade está relacionada com a variabilidade genética e com os aspectos evolucionários e ecológicos, podendo ser entendida como a soma da variação que ocorre na natureza quanto a genes, espécies e ecossistemas, se refletindo no número de espécies e suas combinações, além das recombinações genéticas envolvendo as espécies.

A diversidade genética acolhe a informação genética nas espécies da flora, fauna e microbiota, enquanto que a diversidade de espécies considera os graus de diferenciação para adaptação nos diferentes nichos ecológicos, bem como a diversidade de ecossistemas. Já a diversidade de ecossistemas abrange a variedade, número e frequência de habitats, além dos processos ecológicos e comunidades bióticas.

A rica biodiversidade que ocorre no Brasil está em função da grande variação ecológica, dimensão territorial e número de biomas. Em termos gerais, além de ser o mais rico em plantas, animais e microrganismos, é proprietário da maior parte das reservas florestais intactas do planeta, possuindo cerca de 19% dos solos agricultáveis do mundo.

Para o caso de plantas superiores, o Brasil tem cerca de 55 mil espécies identificadas, o que corresponde a quase 21% do total de 267 mil espécies já classificadas ao nível mundial. Esta alta concentração de genótipos se traduz em elevado número de genes tropicais e genomas funcionais. Além disso, esta enorme disponibilidade aponta para a necessidade da efetivação de um consistente programa de prospecção, isolamento, caracterização e expressão de genes úteis à agricultura sustentável, dentro de uma ação priorizada. Dentre as espécies nativas usadas na alimentação humana e animal destacam-se: mandioca, abacaxi, caju, cupuaçu, maracujá, castanha-do-Brasil, guaraná, jabuticaba, amendoim, cacau, espécies de palmeiras, algumas forrageiras nativas e também espécies medicinais (Goedert & Wetzel, 1999), além de muitas outras espécies de uso regional.

Centros de origem correspondem à região geográfica onde se originou uma espécie ou foi primeiramente domesticada, enquanto que centros de diversidade atestam a região geográfica com elevado grau de diversidade genética (IBPGR, 1991). Esta diversidade pode ser primária se houver a ocorrência de espécies de interesse econômico em associação com espécies parentes silvestres, com características primitivas e elevada frequência de caracteres dominantes, podendo ser ainda secundária, isto é, com pouca ocorrência de parentes silvestres, com baixos níveis de variação genética e pronunciada ocorrência de caracteres recessivos. Todos os cinco biomas brasileiros, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Campos e Florestas Meridionais acolhem centros de origem e centros de diversidade genética de espécies.

No processo de exploração máxima da variabilidade genética para efeito da conservação *ex situ* tem sido considerado o conceito de *gene pool* ou complexo gênico. Eles são classificados em *gene pool* primário (GP1) onde os cruzamentos são comuns e geralmente geram progênes férteis, a segregação de genes é praticamente normal e a transferência genética geralmente ocorre com facilidade; *gene pool* secundário (GP2) em que os cruzamentos com GP1 são possíveis apesar da existência de algumas barreiras que os dificultam, geram progênes com níveis variáveis de esterilidade ou fertilidade, pareamento cromossômico pobre ou até nulo, existindo dificuldade de levar os híbridos à maturidade e à gerações subsequentes; e *gene pool* terciário (GP3) onde os cruzamentos usando o GP1 geram progênes anômalas, com graus de letalidade ou completamente estéreis. Nesta classe, somente a aplicação de ferramentas biotecnológicas torna possível a exploração da variabilidade do complexo gênico (Harlan & de Wet, 1971).

Os recursos genéticos estão incluídos na diversidade biológica e abrangem inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos que, em equilíbrio atuam em significativa interação em sistemas biológicos. Possuem interesse socioeconômico real e potencial visando à utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins (United Nations Environment Programme, 1992).

Em linhas gerais, os recursos genéticos abrangem as seguintes categorias: espécies silvestres, espécies de parentes silvestres, raças locais, variedades, linhagens melhoradas, linhagens com características genéticas e citogenéticas especiais e populações experimentais, dentre outras. Apesar de que na atualidade nem todas as espécies possuem demanda para uso, no futuro poderão ser altamente desejáveis levando-se em conta a utilização de genes e alelos existentes. Para aquelas espécies que possuem enorme importância para uso atual ou potencial deve ser dirigido um esforço especial no sentido da efetuação do manejo relacionado com a coleta, conservação, caracterização, avaliação, documentação, informação e disponibilidade de pronunciado nível de variabilidade genética.

Considerando que os recursos genéticos abrangem o conjunto de amostras de populações de plantas, animais e microrganismos que abarcam variabilidade genética de grande interesse para uso, os mesmos são representados pelo germoplasma que por seu turno, é o conjunto de materiais hereditários de uma espécie, isto é, a base física da herança genética (IBPGR, 1991).

3. FASES DO MANEJO DOS RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

O desenvolvimento de ações para a conservação e uso dos recursos genéticos deve estar fundamentado em bases sólidas de planejamento e com perspectivas de execução a longo prazo. Desta forma, programas nacionais de conservação são criados para dar suporte a um complexo de ações de pesquisa, apoio e desenvolvimento de recursos genéticos, sendo de fundamental importância a identificação de espécies e atividades prioritárias na busca por tecnologias eficientes para a conservação e uso do germoplasma, em bases sustentáveis e com racionalização dos recursos financeiros (Goedert & Wetzell, 1999).

Os procedimentos para a conservação *ex situ* de germoplasma vegetal requerem o uso de metodologias técnico-científicas como base para atividades de rotina e pesquisa, não só para permitir a prática de uma conservação bem manejada, como também para promover e induzir ao uso do germoplasma armazenado.

De uma maneira geral, os processos de cunho técnico que conduzem ao correto manejo do germoplasma conservado envolvem as seguintes atividades:

3.1 PROSPECÇÃO E COLETA

A prospecção ou pré-coleta é uma fase de grande auxílio para a efetivação da coleta propriamente dita, pois permite delinear com antecedência, todas as fases consideradas imprescindíveis para o pleno sucesso da coleta a ser efetuada.

A coleta de germoplasma – processo de localizar os recursos genéticos no campo, amostrar o germoplasma e transferir esses recursos para um banco de germoplasma – é o passo inicial para a conservação *ex situ* dos recursos genéticos vegetais (Guarino *et al.*, 1999). Embora o processo de coleta possa parecer uma atividade simples, com regras pré-estabelecidas, sua execução requer estudos prévios, sempre que possível, para se conhecer entre outros aspectos o mecanismo de reprodução da espécie, os principais polinizadores e estudos de simulação gráfica para a definição de áreas potenciais de coleta. Além disso, o conhecimento das características fenológicas, em ambientes semelhantes à região onde será efetuada a

coleta, é fundamental, pois poderá auxiliar na definição da época mais apropriada para a realização da expedição (Vilela-Morales, 1999).

As coletas são efetuadas tanto em populações silvestres ou primitivas como em populações domesticadas. Diversos materiais podem ser alvo de coleta, entre eles: sementes, bulbos, tubérculos, pólen, plantas inteiras etc. A equipe de coleta deve ter conhecimento adequado de botânica, ecologia, genética de populações, melhoramento de plantas e fitopatologia. Além disso é necessário ter um bom conhecimento do país ou região onde será efetuada a expedição, incluindo aspectos socioeconômicos e costumes locais (Esquinas-Alcázar, 1993). Inúmeros aspectos relacionados com as atividades de coleta são amplamente discutidos por Bennett (1970), Creech (1970), Chang (1985) e Guarino *et al.* (1995).

Para a captura da variabilidade genética existente, nas coletas devem ser utilizados procedimentos de amostragem, levando-se em conta os mecanismos de reprodução das plantas, o tamanho efetivo da população e a frequência gênica. Marshall & Brown (1975) reconheceram quatro classes de alelos: comum e dispersos, comum e restritos, raros e dispersos, e raros e restritos. Segundo os autores a classe comum e dispersos não apresenta problema, sendo tais alelos capturados mesmo dentro de pequenas amostras coletadas de poucas populações. Se os alelos são raros, não importando a distribuição, a probabilidade deles serem incluídos depende do tamanho das amostras e do número de populações que podem ser amostradas. Caso seja restrita, o conhecimento da distribuição pode ajudar, porém amostras maiores são necessárias. A classe mais importante para coleta é aquela com distribuição comum em áreas restritas. Em termos do tamanho da amostra no processo de coleta, esta deve ser mais pronunciada em espécies autógamas por possuírem o fenômeno da variação genética livre, em contraste com as espécies alógamas que oferecem uma variação genética potencial (Vilela-Morales *et al.*, 1997). Para exemplificar tal fenômeno os autores usaram dois locos com dois alelos (Aa e Bb). No caso de autógamas os genótipos possíveis são AABB, AAbb, aaBB e aabb, enquanto que para as alógamas são AABB, AABb, AAbb, AaBB, AaBb, Aabb, aaBB, aaBb e aabb. No primeiro caso nenhum genótipo contém todos os alelos possíveis, o que dificulta a coleta do germoplasma. Por outro lado, nas alógamas existe a presença do duplo heterozigoto (AaBb) que contém todos os alelos e, conseqüentemente, facilita o processo de amostragem.

As expedições de coleta de germoplasma devem ser organizadas para atender às seguintes alternativas: a) coletar germoplasma de produtos tradicionais ou com interesse econômico; b) coletar germoplasma de produtos ou culturas alternativas ou potenciais; c) coletar germoplasma com risco eminente de destruição, em operações de resgate; d) coletar germoplasma em locais com diversidade genética expressiva, de modo a aumentar os níveis de variação genética disponível para os programas de pesquisa e desenvolvimento (Coradin, 1990).

Sistemas de Informação Geográfica (SIG) têm sido utilizados para realizar levantamentos ecogeográficos a fim de identificar áreas alvo para a coleta de germoplasma, entre elas: a) áreas de alta diversidade para uma determinada cultura; b) áreas onde a cultura e seus parentes silvestres coexistem; c) áreas para proteger germoplasma de interesse específico; d) áreas para identificar genótipos que estão

sub-representados nas coleções; e) áreas representativas de falhas ecogeográficas nas coleções; f) áreas de risco de erosão genética (Greene & Guarino, 1999). Um levantamento constatou a existência de aproximadamente 835.000 acessos (excluindo os 675.000 acessos existentes nos centros internacionais do *Consultative Group on International Agriculture Research - CGIAR*) em 340 bancos de germoplasma na América Latina e Caribe; no Brasil, até 1994, 300 expedições foram realizadas, as quais agregaram cerca de 40.000 acessos ao sistema de conservação (Guarino *et al.*, 1999).

O passaporte é considerado o documento de identidade da amostra coletada, sendo que os dados obtidos podem variar de uma instituição para outra. Entretanto, alguns dados são imprescindíveis como informações geográficas, nome do coletor, dados edafoclimáticos, tipo de vegetação, existência de fatores causadores de estresses bióticos e abióticos, possível interesse econômico e informações básicas das amostras obtidas (Lleras, 1988; Esquinas-Alcázar, 1993). Costa (1999) enfatizou que a organização dos dados de passaporte, existentes nos bancos ou coleções de germoplasma, é fundamental para se ter uma visão coerente das atividades realizadas ou a realizar com germoplasma de um produto ou grupo de produtos. Na circulação do germoplasma, seja como trânsito interno, introdução ou exportação, é recomendável a obtenção e o registro de dados de passaporte originais do acesso, uma vez que esse simples cuidado pode evitar duplicações inconvenientes economizando tempo e dinheiro. Costa & Vilela-Morales (1994) utilizando dados de passaporte dos acessos de mandioca existentes no Brasil, verificaram que dos 4.300 acessos disponíveis, 30% eram duplicações. Ritschel *et al.* (1998) utilizando marcadores morfológicos na caracterização preliminar do germoplasma brasileiro de batata-doce detectaram 23% de duplicações.

A utilização de dados de passaporte e de descritores morfológicos permite orientar, de forma mais segura, futuros trabalhos envolvendo técnicas com marcadores moleculares (Costa, 1999). O avanço observado nas técnicas do DNA recombinante também tem sido incorporado nas atividades de coleta. Miller & Tanksley (1990) demonstraram que o uso de polimorfismo baseado em tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) permitiu estimar que a probabilidade de adicionar novos genes à coleção de tomate poderia aumentar vinte vezes pela simples inclusão de um acesso de *Lycopersicon peruvianum*, um parente silvestre do tomate.

3.2 INTERCÂMBIO E QUARENTENA

O intercâmbio de germoplasma tem sido uma prática bastante utilizada visando ao enriquecimento da variabilidade genética conservada. O intercâmbio de germoplasma oferece oportunidade para a incorporação de “novos” genes de interesse para utilização nos programas de melhoramento.

Esta prática exige um controle fitossanitário rigoroso tendo em vista evitar a entrada de pragas e patógenos inexistentes na agricultura dos respectivos países. Assim, nos procedimentos de intercâmbio os seguintes critérios devem ser considerados com rigor: a) a amostra deve ter a representatividade genética da população de origem (muitas vezes esse item não é observado, por vários motivos, mas especialmente devido à baixa disponibilidade do material na coleção de origem); b) a amostra deve estar

livre de pragas (insetos e patógenos); c) a inspeção fitossanitária deve ser organizada de modo a possibilitar a detecção de insetos, fungos, bactérias, vírus, ácaros e nematóides; d) os procedimentos quarentenários devem ser rígidos quanto à eliminação das amostras contaminadas.

De maneira geral, as amostras movimentadas no processo de intercâmbio podem ser de livre intercâmbio, de intercâmbio restrito, de germoplasma avançado ou de pesquisa. Na atualidade, em face dos direitos de propriedade intelectual, nas ações de intercâmbio de recursos genéticos têm sido praticada a assinatura de acordos de transferência de material visando assegurar os direitos das partes envolvidas no processo.

A quarentena é um determinado período de incubação no qual pode ocorrer o aparecimento e detecção de pragas e sintomas de doenças. Esta prática é um excelente mecanismo de proteção para a agricultura, pois evita a entrada de pragas e doenças em áreas até então isentas desses organismos.

Na Tabela 1 é apresentado um resumo das atividades de intercâmbio de germoplasma realizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em 1997 e 1998.

TABELA 1. Intercâmbio realizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em 1997 e 1998.

Descrição	1997	1998
Acessos importados	15.251	23.405
Acessos exportados	1.004	344
Acesso de trânsito interno	2.684	3.269
Total do intercâmbio de acessos de plantas	18.939	27.018

Fonte: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (1998; 1999).

3.3 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

Esta prática tem grande importância no sentido de disponibilizar a variabilidade genética para uso em programas de melhoramento genético, biotecnologia e ciências afins. Para a escolha do melhor procedimento de conservação da amostra, inicialmente devem ser conhecidos os tipos de sementes produzidas pelos genótipos, de acordo com a fisiologia. Assim, as sementes podem ser: a) ortodoxas – quando suportam secagem entre 4% a 6% de umidade, porque se apresentam secas em sua maturação fisiológica e devido ao baixo grau de umidade, suportam a exposição prolongada a temperaturas subzero (-10°C a -20°C), exemplos: arroz, milho e feijão; b) intermediárias – quando suportam certo grau de secagem (em torno de 10% de umidade), porém este não é suficiente para conservá-las ou protegê-las dos danos causados por baixas temperaturas, portanto, embora mais secas que em seu estado normal, não suportam temperaturas subzero, exemplos: café e citros; e c) recalcitrantes – quando não suportam secagem e não podem ser conservadas em temperaturas subzero devido ao alto teor de água que possuem em sua maturação.

Sementes ortodoxas podem ser conservadas a longo prazo em temperaturas subzero, preferencialmente variando entre -10°C e -20°C, porém o ideal é que seja em torno de -18°C ou abaixo, em coleção de base. Geralmente as sementes intermediárias têm sido conservadas a médio prazo entre 5°C e 10°C (Ellis *et al.*,

1991); os períodos de sobrevivência em baixa temperatura, assim como o grau de secagem, variam entre espécies e até mesmo entre genótipos. Várias pesquisas têm sido realizadas em anos recentes na busca de métodos que viabilizem a conservação *ex situ* dessas espécies, no entanto ainda existem limitações que tornam impraticável sua conservação a longo prazo em bancos de germoplasma (Eira, 1996). Os resultados obtidos pelo congelamento de sementes ou embriões zigóticos em nitrogênio líquido têm sido promissores na conservação de várias espécies com sementes intermediárias e recalcitrantes (Normah, 1994; Berjak & Dumet, 1996; Dussert *et al.*, 1997; 1998; Althoff, 1998). Espécies que possuem sementes recalcitrantes, podem ser conservadas a campo, *in vitro* ou em criopreservação (-196°C) de tecidos, pólen, embriões e sementes. Nesses processos de conservação *ex situ*, deve haver todo o cuidado para que sejam evitadas a erosão genética pela perda ou redução da viabilidade da semente, a instabilidade genética pelo aparecimento de mutações como aneuploidia, ou mesmo a variação somaclonal pela constante repicagem das amostras conservadas *in vitro*. Para isso a metodologia escolhida deve ser comprovadamente a mais adequada e deve ser estabelecido um consistente procedimento do monitoramento das coleções.

Para o caso da conservação a campo, útil para conservar as espécies que produzem sementes recalcitrantes e intermediárias, que não produzem sementes e outras que produzem sementes ortodoxas mas são altamente heterozigotas e, normalmente, são de propagação vegetativa, atenção deve ser dada para as seguintes limitações: ocupação de áreas extensas por longos períodos; grande necessidade de recursos humanos, financeiros e materiais para implantação, condução e manutenção das coleções; necessidade de duplicação das coleções para reduzir os riscos de perda pela ocorrência de catástrofes de ordem biótica, abiótica e antrópica; longos períodos para expressão das características genéticas e uso de condições ambientais não compatíveis com a expressão das características fenotípicas. São muito importantes os cuidados a serem tomados para apresentar soluções alternativas a estas limitações, considerando sempre a relação custo benefício, pois, muitas das importantes espécies que ocorrem no Brasil, especialmente perenes, produzem sementes recalcitrantes.

A biotecnologia pode ter papel relevante especialmente para as espécies de propagação vegetativa, espécies com sementes recalcitrantes e intermediárias e espécies com problemas severos de produção de sementes (Rao & Riley, 1994). Também o DNA de espécies com risco de erosão genética, extinção ou com interesse para o desenvolvimento de biotecnologias pode ser conservado em bancos genômicos, cujo procedimento é da maior importância para países ricos em genes tropicais, como o Brasil.

3.4 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO

Estas duas práticas são da maior importância para o conhecimento e uso do germoplasma conservado. Em termos gerais, a caracterização pode ser morfológica, reprodutiva, agrônômica, bioquímica, citogenética e molecular; baseando-se na classificação dos acessos por seus caracteres qualitativos, enquanto que a avaliação considera os caracteres quantitativos (Vilela-Morales, 1988). Visando a execução de um procedimento adequado, deve ser definida uma lista mínima de descritores por espécie, sendo que na caracterização são utilizados descritores com alta herdabilidade,

e por conseguinte, pouco influenciados pelo ambiente. Para o caso da avaliação, cujos caracteres são comandados por muitos pares de genes e ocorre acentuada influência do ambiente, o procedimento deve ser repetido em diferentes locais de modo que possa ser melhor decomposto o efeito da interação genótipo x ambiente.

O *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) tem disponibilizado várias listas de descritores para diversas espécies de plantas proporcionando uma melhor uniformização na caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais (Rao & Riley, 1994); estas listas contêm grande quantidade de descritores que podem ser utilizados na íntegra ou selecionados em descritores mínimos, de acordo com a necessidade imediata do usuário.

Os procedimentos de caracterização e avaliação são importantes para a formação de coleções nucleares, que são estruturas físicas com cerca de 10% a 15% do número de acessos das coleções originais, mas que encerram cerca de 70% a 80% da representatividade genética daquelas coleções, e são elaboradas com a função de incentivar e orientar o uso do germoplasma conservado.

3.5 REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO

A regeneração é o processo de renovação da amostra originalmente obtida. Nesse aspecto o tipo de reprodução praticado pela espécie é muito importante, sendo mais facilmente realizado nas espécies autógamas do que nas alógamas.

O processo de regeneração é idêntico ao processo de multiplicação para a produção de sementes a fim de repor os estoques dos bancos ativos ou para atividades de avaliação e distribuição entre os usuários, especialmente os melhoristas (Frankel *et al.*, 1995). Caso o poder germinativo (PG) das sementes seja reduzido para 85% em relação ao PG constatado no início do processo de conservação, devem ser utilizados procedimentos de regeneração de modo que cada genótipo deixe a sua contribuição gamética para a próxima geração.

Atenção deve ser dada aos efeitos da seleção natural, os quais devem ser minimizados no ambiente em que é conduzida a regeneração. Vencovsky (1986) e Breese (1989) enfatizaram a necessidade de adequada representatividade genética, explorando o conceito do tamanho efetivo populacional no processo de regeneração, como forma de evitar problemas com deriva genética e efeitos da seleção natural. Frankel *et al.* (1995) ressaltaram que a deriva genética, causadora de perdas de alelos raros não-adaptativos, é menos prejudicial que a seleção natural, a qual pode afetar adversamente a frequência de alelos adaptativos. Os autores salientaram também que ambos os inconvenientes podem ser evitados com um tamanho efetivo mínimo de 30, porém deve-se preferir um tamanho efetivo de 50 ou mais.

3.6 DOCUMENTAÇÃO E INFORMAÇÃO

Os avanços na área de informática vêm sendo sistematicamente incorporados aos trabalhos com recursos genéticos com o objetivo de facilitar tais atividades. A disponibilidade de tecnologias e *softwares* mais eficientes e de fácil manuseio constituem-se em ferramentas extremamente úteis para as diversas rotinas existentes no trato do germoplasma (Costa, 1999). Além de auxiliar nos trabalhos de documentação, os avanços da informática têm contribuído no intercâmbio e disseminação da informação ao redor do mundo. Hawtin *et al.* (1996) destacaram a possibilidade de troca de informações

pelo SINGER (*System-wide Information Network on Genetic Resources*) sobre o germoplasma disponível nos diversos centros internacionais de pesquisa coordenados pelo CGIAR. Obviamente a Internet apresenta-se como um veículo de grande importância na disseminação dessas informações.

Estas atividades são dirigidas para o monitoramento das informações referentes ao enriquecimento da variabilidade genética através da coleta e intercâmbio de germoplasma, cadastramento ou inventário das coleções, acompanhamento e análise do estado da conservação dos acessos, além da caracterização, avaliação e uso do germoplasma.

A documentação e informação em conjunto com a caracterização e avaliação formam a base primordial que conduz ao uso do germoplasma conservado. Isto requer a formação e implementação de um sistema de informação de recursos genéticos que seja automatizado e integrado ao nível nacional, que além dos componentes acima definidos, abranjam: base de dados sobre tecnologias e pesquisas relacionadas com recursos genéticos, base de dados bibliográficos sobre recursos genéticos e tecnologias apropriadas, definição de sistemas geográficos e de sensoriamento remoto para reconhecer, determinar e monitorar locais com diversidade genética de interesse, além da definição de sistemas especialistas (Vilela-Morales, 1988).

Na prática, a introdução de acessos às coleções está relacionada com o registro do máximo de dados que os identifiquem na coleção, tais como o número de registro pelo qual o acesso será conhecido na coleção (no Brasil é o BRA000000), origem e procedência, poder germinativo, número estimado de sementes ou de amostras; no caso de material oriundo de coletas, as informações de caderneta de campo, além das informações de caracterização e avaliação. Esse conjunto de dados, denominados de dados de passaporte, são essenciais no sentido de disponibilizar a coleção ao usuário.

O conhecimento etnobiológico de comunidades indígenas e tradicionais representa um fator inestimável que deve ser levado em consideração. Assim, principalmente nas bases de dados sobre a diversidade das espécies nativas, a inclusão de informações etnobiológicas são de alto valor estratégico para qualquer país (Vilela-Morales, 1999). Conforme salientou Esquinas-Alcázar (1993), quando as variedades desaparecem o conhecimento sobre as mesmas também é perdido, fazendo com que a erosão genética esteja atrelada a uma correspondente erosão de conhecimento.

4. BANCOS E COLEÇÕES DE GERMOPLASMA

A conservação *ex situ* de recursos genéticos encontra nos bancos e coleções de germoplasma as estruturas físicas onde são armazenados os acessos para a manutenção da variabilidade genética visando à utilização (IBPGR, 1991).

Para o caso específico de plantas, no levantamento da FAO em 1996, o número de bancos ao nível mundial somava 1.308, totalizando 5,5 milhões de acessos conservados, assim distribuídos: África – 6% dos acessos em 124 bancos; América Latina e Caribe – 12% dos acessos em 227 bancos; América do Norte – 14% dos acessos em 101 bancos; Ásia – 28% dos acessos em 293 bancos; Europa – 34% dos acessos em 496 bancos; Leste Europeu – 6% dos acessos em 67 bancos. Além disso, incluem-se as ações e esforços desenvolvidos por Centros Internacionais ligados ao CGIAR, que conservam cerca de 0,6 milhão de acessos em 12 bancos de germoplasma (Tabela 2).

No Brasil, existem atualmente cerca de 180 bancos, somando mais de 200 mil acessos de espécies vegetais, com destaque para as produtoras de grãos, frutíferas, florestais, medicinais, ornamentais, adoçantes e estimulantes, laticíferas, condimentares e corantes, raízes e tubérculos, biocidas, palmeiras, leguminosas, fibrosas, oleaginosas, gramíneas e hortaliças, dentre outras, totalizando 84 produtos (Brasil, 1998; Wetzel & Bustamante, 1999). A maioria dos bancos de germoplasma (110 bancos) está integrada ao principal programa de conservação *ex situ* em desenvolvimento no País, que é o de Conservação e Uso de Recursos Genéticos, pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), implantado no âmbito do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) coordenado pela Empresa. O programa tem como objetivo geral o enriquecimento, a conservação e a documentação dos recursos genéticos autóctones e exóticos, de importância socioeconômica atual e potencial para o país, promovendo e aumentando, via caracterização e avaliação, a utilização desses recursos em programas de melhoramento ou diretamente pelo agricultor, para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável (Goedert & Wetzel, 1999).

Os bancos de germoplasma inseridos no referido Programa compõem o Sistema de Curadoria de Germoplasma (Tabela 3), coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, contando com a seguinte estrutura:

- Uma Supervisão Geral do Sistema de Curadoria de Germoplasma
- Curadorias de Germoplasma de Produtos ou Grupo de Produtos
- Curadores Adjuntos
- Curadorias de Bancos de Germoplasma
- Curadores *Ad Hoc* de Germoplasma de Produto ou Grupo de Produto.

O Sistema de Curadorias de Germoplasma tem por objetivo definir, sistematizar e integrar todas as atividades indispensáveis ao manejo, conservação e uso de germoplasma no âmbito da Embrapa, bem como recomendar que seja adotado procedimento semelhante em todas as instituições do SNPA (Goedert & Wetzel, 1999; Costa, 1999).

TABELA 2. Acessos conservados *ex situ* nos Centros Internacionais do CGIAR.

Centro	Principais Culturas	Número de Acessos ^a
CIMMYT	Trigo, Milho, Triticale, Cevada	106.300
ICRISAT	Sorgo, Milheto, Grão-de-bico, Amendoim	103.085
ICARDA	Cevada, Trigo, Grão-de-bico, Forageiras, Lentilha	87.770
IRRI	Arroz	82.670
CIAT	Feijão, Mandioca, Forageiras	56.700
IITA	Arroz, Caupi, Soja, Mandioca, Batata-doce	39.860
CIP	Batata, Batata-doce	11.590
ILCA	Forageiras	10.000
WARDA	Arroz	6.076
INIBAP	Banana	563

Fonte: Adaptado de Berthaud (1997)

^aAproximado

TABELA 3. Constituição atual do Sistema de Curadorias de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

GRUPOS	CURADORIAS
Curadorias de Recursos Genéticos Animais	Animais Domésticos de Grande Porte Animais Domésticos de Pequeno Porte Animais Silvestres
Curadorias de Recursos Genéticos de Microorganismos	Microorganismos de Alimentos Microorganismos de Controle Biológico Microorganismos de Sanidade Animal Microorganismos de Sanidade Vegetal Microorganismos de Solos
Curadorias de Recursos Genéticos de Adoçantes, Estimulantes, Condimentares e Corantes	Adoçantes e Estimulantes Condimentares e Corantes
Curadorias de Recursos Genéticos de Medicinais, Aromáticas e Biocidas	Medicinais e Aromáticas Biocidas
Curadorias de Recursos Genéticos de Cereais	Arroz Aveia, Centeio, Cevada, Trigo e Triticale Milho, Milheto e Sorgo
Curadorias de Recursos Genéticos de Espécies Florestais, Laticíferas e Palmeiras	Espécies Florestais Nativas da Caatinga Espécies Florestais Nativas da Floresta Amazônica Espécies Florestais Nativas do Cerrado / Pantanal Espécies Florestais Nativas da Mata Atlântica Espécies Florestais Exóticas Espécies Laticíferas Palmeiras
Curadorias de Recursos Genéticos de Fibrosas, Leguminosas e Oleaginosas	Amendoim Caupi, Fava, Feijão e Soja Colza, Gergilim, Girassol e Mamona Fibrosas
Curadorias de Recursos Genéticos de Forrageiras e Adubos Verdes	Gramíneas Forrageiras Leguminosas Forrageiras e Adubos Verdes
Curadorias de Recursos Genéticos de Fruteiras	Fruteiras Convencionais de Clima Temperado Fruteiras Convencionais de Clima Tropical Fruteiras não Convencionais
Curadorias de Recursos Genéticos de Hortaliças, Ornamentais, Raízes e Tubérculos	Hortaliças Hortaliças não Convencionais Ornamentais Raízes e Tubérculos

Fonte: Goedert & Wetzel (1999)

Os jardins botânicos e os arboretos são também importantes locais de conservação *ex situ* de germoplasma vegetal (Frankel & Soulé, 1981). Os citados jardins compõem áreas protegidas, herbários e coleções de plantas vivas onde se aliam os objetivos técnico-científicos de pesquisa e rotina de conservação e aqueles de educação ambiental e cultural. As coleções de plantas vivas são classificadas, identificadas, ordenadas e documentadas. No Brasil existem 40 Jardins Botânicos, para um universo de cerca de 1.700 ao nível mundial, que conservam principalmente

espécies medicinais, ornamentais e florestais. No País, os Jardins Botânicos estão incluídos na Rede Brasileira de Jardins Botânicos, criada em 1991, como ação incentivadora ao intercâmbio de plantas e conhecimentos técnico-científicos e coordenação de planos, programas e projetos em rede em relação às organizações conservacionistas ligadas ao tema. Arboretos são matas ou bosques compostos por espécies nativas e exóticas que são conservadas para efeito de produção de sementes e mudas, além de se constituir em infra-estrutura para fornecer suporte para ações de pesquisa e educação ambiental. No Brasil ainda são poucos os arboretos catalogados, apesar de também se constituírem em importantes bases físicas para a conservação e uso de germoplasma vegetal.

Outras importantes estruturas para a conservação *ex situ* de germoplasma são os próprios herbários, pois além de serem da maior importância para a classificação taxonômica das espécies, também encerram os materiais genéticos que podem ser perfeitamente usados em programas relacionados, principalmente no atual estágio de conhecimentos sobre o uso de ferramentas biotecnológicas. Ao nível mundial os herbários encerram mais de 2 bilhões de excicatas; no Brasil os mais de 115 herbários ativos conservam um apreciável acervo de mais de 4 milhões de espécimes vegetais.

No sentido de fortalecer o processo de conservação e uso de recursos fitogenéticos na América Latina e Caribe, o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) coordena cinco Redes assim distribuídas: PROCITRÓPICOS/TROPIGEN, PROCISUR/SUBPROGRAMA DE RECURSOS GENÉTICOS, PROCIANDINO/REDARFIT, MESOAMÉRICA/REMERFI e CARIBE/CAPGERNet, sendo que o Brasil participa das redes ligadas ao PROCITRÓPICOS e PROCISUR. Além disso, está organizada na Amazônia brasileira a “Rede de Conservação e Uso de Recursos Genéticos Amazônicos – GENAMAZ”, sob a coordenação da Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia (SUDAM), com prioridades para plantas medicinais, fruteiras e microrganismos, congregando um número superior a 20 instituições.

5. TIPOS DE CONSERVAÇÃO EX SITU

A prática da conservação de germoplasma vegetal *ex situ* teve sua fase embrionária há cerca de 10 mil anos, quando o homem pela primeira vez guardava sementes que lhe garantiriam uma nova safra, isto é, a prática da conservação *ex situ* coincide com a domesticação das espécies e o início da agricultura propriamente dita. Desde então, ano após ano, sementes e órgãos vegetativos têm sido cuidadosamente conservados a cada final de safra. No entanto, no princípio esta conservação era um ato instintivo de sobrevivência e durante milhares de anos não houve o cuidado de separar sementes e propágulos que bem representassem as plantas matrizes; eram até mesmo separados aqueles que por sua aparência não tinham valor. Numa fase mais recente, somente os representantes mais vigorosos por ocasião da colheita eram escolhidos para o próximo plantio. Esta seqüência seletiva foi que propiciou o surgimento dos recursos genéticos que serviram de base à agricultura de nossos dias.

A conservação de germoplasma hoje tem seus princípios bem definidos graças à iniciativa da FAO que na década de 70, com o apoio de cientistas do mundo todo, definiu regras e prioridades para a conservação de germoplasma. Na época surgiram

em vários países os primeiros centros de conservação de germoplasma. O governo brasileiro, sensibilizado com a causa, em 1974, criou em Brasília o Cenargen, um centro de pesquisa com a missão de pesquisar, conservar e promover a utilização dos recursos genéticos de importância para o país.

A conservação *ex situ* de germoplasma pode ser definida como aquela em que o germoplasma é conservado fora de seu ambiente natural, por estar sofrendo pressões que podem levá-lo à extinção ou para estar mais facilmente disponível. Na medida do possível esta conservação é feita sob condições de armazenamento que propiciem o aumento do período de sobrevivência e garantam a estabilidade genética do material conservado.

A necessidade da conservação *ex situ* geralmente é motivada pela ação antrópica. O fator mais ameaçador à conservação da diversidade das espécies cultivadas é a introdução de cultivares novas, geralmente de alta produtividade, em substituição às variedades tradicionais, as quais são importantes fontes de genes pelo elevado poder adaptativo que apresentam para os diversos fatores de estresses ambientais, bióticos e abióticos, existentes nos locais onde eram cultivadas. Outro fator importante é a destruição do habitat natural, como o que tem ocorrido com as florestas tropicais, cerrado, mangues e outros biomas hoje em processo de degradação, onde ocorrem espécies de uso atual (via extrativismo) e potencial, além de parentes silvestres de espécies cultivadas. Este processo de perda da variabilidade é conhecido como erosão genética. Além dos fatores já citados, vários outros podem levar à erosão genética, como pode ser observado na Tabela 4, publicada originalmente em relatório da Comissão de Recursos Genéticos para Alimentação e Agricultura (FAO, 1998).

As primeiras coleções *ex situ* foram desenvolvidas nos jardins botânicos, e no caso da Europa estas datam da Idade Média. Poucos sobreviventes existem daquela época em que os exploradores europeus coletavam espécimes em terras recém-conquistadas e levavam para suas coleções de plantas exóticas. Deve-se ressaltar que o valor de tais coleções é mais histórico que científico, pois inicialmente não visavam

TABELA 4. Principais causas da erosão genética segundo relatório da FAO (1998).

Causas	Número de Países
Expansão da fronteira agrícola*	61
Pressão populacional**	46
Degradação do ambiente	33
Políticas governamentais	22
Pragas / Plantas daninhas / Doenças	9
Conflitos civis	6
Extrativismo desenfreado das espécies	52
Redução no tempo de pousio***	6
Pastoreio excessivo	32
Substituição de variedades locais	81
Mudança do sistema agrícola	18

* Incluindo desmatamento e queimadas.

** Incluindo urbanização.

*** Citado em casos de agricultura itinerante.

a conservação genética, mas sim coleções de indivíduos que representassem um pouco da flora exótica de regiões recém-descobertas. Atualmente 698 dos 1.700 jardins botânicos do mundo praticam a conservação *ex situ* de germoplasma, desempenhando papel importante, especialmente na conservação de coleções de plantas de pouco interesse agrônômico atual, envolvendo espécies de uso medicinal, ornamental, florestal e parentes silvestres de plantas cultivadas, além de germoplasma de interesse local (Heywood, 1990; 1993; FAO, 1998).

A conservação *ex situ* pode ser usada tanto para espécies cultivadas como para silvestres e pode ser feita das maneiras já referidas, as quais dependem em primeira instância de características reprodutivas específicas do germoplasma que se deseja conservar. Outros fatores também importantes são os objetivos da coleção, como o tempo que se pretende conservar e disponibilidade de recursos físicos e financeiros. Hoje se somam no mundo cerca de 6 milhões de acessos sendo conservados *ex situ* na forma de sementes desidratadas, embriões e meristemas criopreservados, plântulas *in vitro* e plantas inteiras em coleções de campo (FAO, 1998). No Brasil a estimativa é de 200 mil acessos de germoplasma vegetal, sendo conservados a médio ou longo prazo, distribuídos por todo o território nacional, especialmente em centros da Embrapa, universidades e institutos de pesquisa.

Com relação aos objetivos, uma coleção pode ser usada para conservar o germoplasma a longo ou a médio prazo, para distribuição e pesquisa, em coleções de base e ativa. Recomenda-se que as coleções ativas tenham, sempre que possível, uma duplicação conservada a longo prazo, pois estão sujeitas a perdas por ataques de pragas, doenças, fatores edafoclimáticos, roubo e perdas de identificação.

Basicamente existem três formas de conservação *ex situ*, que dependem de características reprodutivas do germoplasma que se quer conservar:

- a) conservação de sementes, indicada para conservar espécies que produzem sementes ortodoxas e são propagadas sexualmente;
- b) conservação *in vitro*, para plantas de propagação vegetativa e/ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias;
- c) conservação no campo, para espécies produtoras de sementes recalcitrantes ou intermediárias, de propagação vegetativa ou perenes.

A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação de germoplasma vegetal, não só por sua simplicidade e eficácia, mas especialmente porque a maioria das espécies usadas na agricultura moderna produz sementes que na sua maturação podem ter o conteúdo de água reduzido até 4% a 6% e desta forma se conservam por longos períodos em baixas temperaturas; tais sementes são chamadas ortodoxas. A temperatura mais indicada na conservação a longo prazo de sementes ortodoxas varia de -18°C a -20°C (Hanson, 1985; Faiad *et al*, 1998). Testes de germinação são realizados para determinar o poder germinativo (PG) inicial das amostras, o qual deve estar acima de 85% para a maioria das espécies. Mesmo em condições ideais de armazenamento, as sementes podem sofrer uma redução no PG ao longo do tempo, portanto deve ser realizado um monitoramento periódico do germoplasma ao longo dos anos. Quando esta redução se aproxima de 85% do PG inicial, o acesso deve ser regenerado, pois a perda da viabilidade das sementes pode levar a uma erosão genética no próprio banco de germoplasma.

Estima-se que entre 2 a 3 milhões dos 6 milhões acessos do germoplasma vegetal conservados *ex situ*, estejam sendo mantidos em Coleções de Base na forma de sementes ortodoxas. É importante lembrar que este total inclui duplicações, tanto entre coleções como dentro das mesmas, reduzindo este número para cerca de 2 milhões de acessos únicos (FAO, 1998). Não é conhecido ao certo qual o número de duplicações de acessos existente nas coleções de germoplasma. No entanto, duplicações propositais das coleções são de grande importância na conservação *ex situ*, pois proporcionam maior segurança contra riscos que possam levar à erosão genética. Quanto mais riscos apresenta a forma de conservação, maior necessidade de duplicações da coleção. Coleções inteiras ou partes delas devem ser conservadas em outro local no próprio país ou mesmo em outro. O mais importante é que haja infraestrutura adequada. Um exemplo é a coleção mundial de batata (*Solanum tuberosum*) que tem uma parte duplicada *in vitro* na Alemanha e outra no Equador, enquanto a coleção completa é mantida no Peru que é o centro de origem e domesticação da espécie; na forma de sementes em câmaras e clones *in vitro* a 6°C em Lima e em Huancayo no campo, onde é replantada anualmente.

No Brasil, sementes de cerca de 400 espécies de forrageiras, cereais, olerícolas, florestais, oleaginosas, fibrosas, corantes, especiarias, medicinais e outras vêm sendo conservadas a longo prazo em câmaras à -20°C, em Brasília, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), totalizando aproximadamente 76.000 acessos de germoplasma semente.

A conservação a médio prazo de sementes ortodoxas é feita preferencialmente em temperaturas baixas, não sendo, necessariamente, abaixo de zero. Mesmo quando conservadas em câmaras com temperatura reduzida (5°C), devem ser monitoradas periodicamente, sendo regeneradas sempre que o PG baixar, evitando a deterioração do acesso.

A conservação *in vitro* é indicada para espécies com sementes recalcitrantes, tais como as da seringueira (*Hevea* spp.) e do cacau (*Theobroma cacao*) que perdem a viabilidade rapidamente e não suportam desidratação e/ou conservação em temperaturas subzero; espécies de propagação vegetativa, como a banana (*Musa* spp.) e o morango (*Fragaria* sp.) e mesmo para as espécies que apesar de produzirem sementes ortodoxas, são propagadas tradicionalmente por via vegetativa (clonagem) para que mantenham características desejáveis que poderiam desaparecer com a segregação na propagação via semente sexual, como a mandioca (*Manihot esculenta*), batata (*Solanum tuberosum*) e batata-doce (*Ipomoea batatas*).

Levando-se em consideração a estabilidade genética, os explantes mais indicados na conservação *in vitro* são meristemas ou ápices e embriões zigóticos ou sementes inteiras no caso destas serem de tamanho bastante reduzido como as de orquídeas (CIAT, 1986; Scowcroft, 1984). Os acessos são conservados de forma asséptica em recipientes herméticos apropriados, sob cultivo em meio nutritivo, em condições que reduzam o crescimento, possibilitando o máximo de intervalo sem que haja necessidade de subcultivos em meios nutritivos recém-preparados.

Algumas técnicas têm sido desenvolvidas para que esta redução de tempo entre subcultivos das coleções *in vitro* aconteça: alteração do meio nutritivo pela omissão ou redução de fatores essenciais ao crescimento das plântulas e pela introdução

de retardantes de crescimento como ácido abscísico, manitol, sorbitol ou alteração física do ambiente como redução de temperatura, diminuição da intensidade luminosa, redução no suprimento de oxigênio pela submersão em óleo mineral, silicone líquido ou meio de cultura líquido (Goes, 1993; Mendes & Goes, 1996; Ashmore, 1997; Engelmann, 1997). O uso de duas ou mais técnicas integradas também tem dado bons resultados.

A conservação *in vitro* sob cultivo mínimo é considerada como Coleção Ativa por conservar o germoplasma em desenvolvimento (IBPGRI, 1986). Sendo a forma rotineira de conservação deste tipo de germoplasma, é amplamente usada em todo o mundo desde meados da década de 70. Segundo o relatório da FAO (1998), mais de mil espécies vêm sendo conservadas sob crescimento mínimo nos últimos 15 anos, porém esta não é a maneira ideal de conservação pelo fato de ser necessário um grande número de subcultivos ao longo do período de conservação, expondo o germoplasma a riscos de seleção, contaminação, perda de identificação e perda da estabilidade genética, além do fato de ser uma técnica dispendiosa tanto na instalação como manutenção, pois requer equipamentos e mão-de-obra especializada e demanda grande consumo de energia elétrica. Estima-se que apenas 38 mil acessos são conservados *in vitro* em todo o mundo (FAO, 1998).

Uma coleção de germoplasma conservada em nitrogênio líquido é considerada como Coleção de Base, pois nestas condições as atividades metabólicas e divisões celulares do explante são reduzidas a zero, mantendo-o teoricamente por período indefinido, sem que seja necessária manipulação do mesmo e garantindo a estabilidade genética e a segurança do germoplasma. A criopreservação em nitrogênio líquido é a forma ideal de conservação de germoplasma de espécies que não produzem sementes ortodoxas. Hoje mais de 80 espécies já foram congeladas com algum sucesso em nitrogênio líquido (-196°C) ou vapor (entre -154°C e -196°C). Apesar dos resultados de pesquisa, apenas *Rubus* spp., *Pyrus* spp., *Solanum tuberosum* e *Elaeis* spp. têm uma rotina de criopreservação já definida.

O custo desse tipo de conservação é menor que o da conservação sob crescimento mínimo, pois, apesar de usar os mesmos equipamentos da cultura de tecidos para a manipulação do explante antes do congelamento e na regeneração da planta após a conservação, dispensa o uso de energia elétrica e os subcultivos que são bastante dispendiosos ao longo dos anos. Uma vez determinada a rotina, o custo da criopreservação depende basicamente do suprimento de nitrogênio líquido para a manutenção do nível dos botijões. No caso de sementes recalcitrantes é ainda mais barato, pois estas não requerem o uso de equipamentos para cultivo. Stanwood *et al.* (1986) relataram que o custo médio da conservação convencional de uma amostra de sementes de cebola por um período acima de 100 anos é estimado em US\$1,65/ano e pode ser reduzido para US\$0,42/ano usando técnicas de criopreservação. A técnica é recomendada também para sementes ortodoxas, tornando a conservação mais segura e menos dispendiosa.

Ainda não existe uma rotina generalizada de criopreservação de germoplasma, pois poucos são os materiais biológicos que suportam temperaturas abaixo de zero em seu estado natural, sendo necessária a adição de produtos químicos de ação crioprotetora ou um condicionamento prévio que proporcione maior resistência ao

explante (Goes & Mendes, 1996). Pesquisas em criopreservação vêm sendo feitas em todo o mundo, sendo que na última década foram desenvolvidos protocolos cuja aplicação têm sido testada com sucesso para um grande número de espécies. A vitrificação é uma destas técnicas e consiste em usar uma solução crioprotetora altamente concentrada de compostos osmoticamente ativos, como o PVS2, que tem sido a mais usada atualmente e contém 30% de DMSO, 15% de glicerol e 15% de etileno glicol (Towill & Jarret, 1992); tal solução impede que haja cristalização da água no congelamento, ocorrendo uma vitrificação, evitando assim a ruptura de membrana pelos cristais. Os maiores problemas desta técnica são o alto grau de toxidez das soluções crioprotetoras e a possibilidade de ocorrer recristalização durante o descongelamento, o que causa injúrias no explante.

Outra técnica, que tem sido aplicada com sucesso para várias espécies, é a encapsulação e desidratação, onde o explante é encapsulado como nas sementes sintéticas (artificiais), em meio de cultura contendo Alginato de Sódio. Estas cápsulas são desidratadas em câmara de fluxo laminar ou dessecador antes do congelamento ou através do crescimento prévio em meios adicionados de compostos de efeito osmótico como açúcares e polióis.

A regeneração do explante é um dos pontos dos mais cruciais no sucesso da criopreservação, independente da técnica usada no congelamento. Com exceção das sementes as quais geralmente dispensam crioprotetores e técnicas especiais de regeneração, a criopreservação depende da cultura de tecidos, e portanto, só pode ser praticada quando se dispõe de laboratório adequado. A criopreservação tende a se tornar cada vez mais freqüente na conservação dos recursos genéticos vegetais, entretanto esta alternativa não substitui as metodologias *ex situ* convencionais (Engelmann, 1999).

Coleções de campo são usadas na conservação de espécies de propagação vegetativa, espécies que produzem sementes recalcitrantes e espécies arbóreas, além daquelas que produzem quantidades reduzidas de sementes como as forrageiras. São indicadas preferencialmente na conservação de espécies perenes, pois coleções de campo de plantas anuais podem ser mais caras, especialmente em países com menor disponibilidade de terras de uso agrícola e de invernos rigorosos; além do que os riscos de perda são maiores no campo. As coleções de campo devem ser localizadas em áreas geográfica e ambientalmente semelhantes àquelas de origem do germoplasma, no caso de coleções de espécies de grande abrangência territorial, envolvendo vários ecossistemas, recomendando-se que sejam feitas coleções regionais, como é feito com a mandioca (*Manihot esculenta*) no Brasil, que tem quatro coleções regionais, na Amazônia, Bahia, Brasília e Santa Catarina, garantindo a boa sobrevivência do germoplasma sem impor pressões além daquelas naturais.

Coleções de campo geralmente são duplicatas de coleções *in vitro*, usadas na caracterização e avaliação. Estima-se que cerca de 527 mil acessos de germoplasma são conservados em coleções de campo hoje no mundo.

Coleções de trabalho tanto podem ser mantidas em campo como em câmaras. Elas contêm geralmente espécies e acessos de interesse do melhorista e devem estar caracterizadas e avaliadas para que possam ser incluídas em programas de melhoramento.

Coleções dinâmicas são um tipo especial de coleção de campo em que várias espécies silvestres, parentes de uma espécie cultivada, são conservadas em uma só área, não só assegurando sua sobrevivência mas especialmente possibilitando sua co-evolução ao lado de outras espécies do mesmo gênero, facilitando estudos filogenéticos e o controle da produção de sementes (Second *et al.*, 1997; Second, 1998).

Muitas são as vantagens da conservação *ex situ*, com destaque para as seguintes: mantém o material em um espaço pequeno sob cuidado intensivo facilitando a aquisição pelos usuários do sistema, garante a sobrevivência de germoplasma que foi substituído, dá grande segurança ao germoplasma, independe da ação antrópica, evita erosão genética e disponibiliza a diversidade máxima do germoplasma. Além disso, o fato de reunir muitos acessos em um só local, facilita a caracterização/avaliação nas coleções de campo e nas coleções *in vitro* mantém material indexado e livre de patógenos dispensando a quarentena na sua entrada ou saída do país ou da região. No entanto, dependendo da forma de conservação, existem algumas desvantagens como a interrupção da evolução quando são usadas técnicas que reduzem drasticamente as atividades vitais do germoplasma por longos períodos; o risco de instabilidade genética nas coleções de sementes ortodoxas e *in vitro*; o alto custo de algumas técnicas como a regeneração no campo de coleções de sementes ortodoxas ou aquelas que requerem mão-de-obra especializada; o alto consumo de eletricidade e equipamentos sofisticados ou o uso de grandes áreas de campo de boa fertilidade por longos períodos. Outras desvantagens são a deriva genética (perda aleatória de genes devido à amostragem ou à multiplicação de amostras muito pequenas) e pressão de seleção (material geralmente é multiplicado em áreas com condições edafoclimáticas distintas do seu local de coleta). De acordo com Esquinas-Alcázar (1993) ambos os fenômenos, deriva genética e pressão de seleção, produzem uma erosão genética cumulativa, a qual pode em certos casos exceder a erosão genética verificada atualmente no próprio ambiente.

Com o avanço das técnicas do DNA recombinante as barreiras entre as espécies estão sendo quebradas e a possibilidade de transferência de genes tem despertado muito interesse nos pesquisadores. Desta forma, é possível pensar em bibliotecas de DNA, as quais conservariam genes de interesse para os programas de melhoramento (Ford-Lloyd & Jackson, 1986; Peacock, 1989; Rao & Riley, 1994; Adams, 1997). Uma grande vantagem na conservação de DNA é a facilidade com que este material pode ser mantido por tempo indeterminado, sem sofisticação nenhuma e com total garantia da estabilidade.

Hawtin *et al.* (1996) apontaram diversas questões que precisam ser melhor compreendidas na conservação *ex situ*: a) melhor entendimento da relação entre umidade da semente e longevidade, especialmente em níveis de umidade da semente muito reduzidos; b) desenvolver métodos de secagem de sementes de menor custo; c) definir melhor os protocolos para crescimento mínimo de tecidos *in vitro* e para tecidos criopreservados de uma ampla gama de espécies e genótipos; d) desenvolver e aprimorar técnicas de manejo para bancos de germoplasma de campo.

A conservação *ex situ* tem sido recomendada como duplicação de coleções *in situ*, trazendo maior segurança especialmente em áreas com riscos da ação antrópica e de catástrofes como vulcões, terremotos e furacões.

6. UTILIZAÇÃO DO GERMOPLASMA CONSERVADO

De maneira geral, o nível de utilização do germoplasma conservado ao nível mundial ainda é bastante baixo, não chegando a 5%. Isso faz com que consistentes ações e esforços sejam desenvolvidos no sentido de estimular o uso dos acessos estocados, pois apesar da preciosidade genotípica do material conservado é bastante alto o custo operacional de mantê-lo sem a devida utilização. Os principais usuários do germoplasma com grande dimensão de variabilidade genética são os melhoristas, que no entanto preferem usar as suas próprias coleções de trabalho, ou de outros especialistas (Nass *et al.*, 1993), muitas das vezes com reduzida variabilidade, desconhecendo as outras modalidades de bancos e coleções de germoplasma que geralmente têm amplas condições de proporcionar bons ganhos genéticos aos programas e cultivares modernas.

No entanto, para a condução ao incremento do uso do germoplasma conservado têm-se notado a enorme necessidade de serem incentivadas e desenvolvidas em maior escala as atividades de caracterização, avaliação, documentação e informação, bem como a produção e disponibilidade de amostras de modo a atender de imediato as necessidades dos programas, especialmente de melhoramento genético. De fato, conforme salientou Vilela-Morales (1999) os níveis de utilização de germoplasma em programas de melhoramento genético somente deverão aumentar, se além das informações de passaporte e outras de controle burocrático, o material genético disponibilizado apresentar níveis expressivos de informações genéticas e utilitárias, relacionadas com adaptação ambiental, potencial genético, conhecimento etnobiológico, potencial industrial e potencial socioeconômico.

Para serem utilizadas pelos melhoristas as fontes de diversidade genética devem incluir alelos úteis não presentes nas populações elites. Os programas de melhoramento das culturas de maior importância econômica incluem apenas uma pequena porcentagem do germoplasma disponível para cada espécie (Brown, 1983). No caso do milho, por exemplo, a espécie vegetal melhor estudada geneticamente, das cerca de 300 raças conhecidas no Hemisfério Ocidental apenas 5% já foram devidamente exploradas pelo melhoramento (Goodman, 1990).

Dentre as inúmeras razões para o uso limitado do germoplasma disponível nos bancos, a falta de dados de avaliação parece ser um dos mais críticos. Nesse particular, os programas de pré-melhoramento (*pre-breeding*) assumem um papel estratégico, atuando como elo de ligação entre os recursos genéticos e o melhoramento de plantas (Nass, 1999; Nass & Paterniani, 2000). Até esses acessos serem avaliados *per se* e em cruzamentos eles continuarão de limitado valor para os melhoristas.

O *screening* de coleções muito grandes para características específicas pode ser muito caro e lento. Nesse sentido o estabelecimento de coleções nucleares (*core collections*) tem sido sugerido para facilitar o uso dos recursos genéticos vegetais (Brown, 1989; Hodgkin *et al.*, 1995). Caracteres adaptativos específicos podem auxiliar na estratificação dessas coleções (Hawtin *et al.*, 1996).

O melhoramento de plantas depende basicamente de quatro fontes principais de diversidade: parentes silvestres, mutações, raças locais e cultivares modernas. Dessas opções, a variabilidade menos explorada até o momento é a existente entre as raças locais (Hawtin *et al.*, 1996). Análises envolvendo isoenzimas e dados moleculares

evidenciam que as raças locais e os parentes silvestres das plantas cultivadas são os principais portadores de reservas de diversidade genética entre os *gene pools* (Miller & Tanksley, 1990).

O germoplasma caracterizado e avaliado para características de interesse torna-se atrativo para os melhoristas na busca por novas combinações genotípicas. Nesse contexto, a avaliação, a documentação e os programas de pré-melhoramento são fundamentais para aumentar a utilização do germoplasma não melhorado (Chang, 1992). Caso os bancos de germoplasma não consigam manter seus acessos caracterizados, avaliados e com valor agregado oferecido pelo potencial de uso, certamente sua conservação despertará pouco interesse entre os melhoristas e, mais grave ainda, não sensibilizando os executivos que controlam os orçamentos destinados à pesquisa, quanto à importância dos recursos genéticos vegetais. Nos países em desenvolvimento este fato é comumente observado, pois os recursos genéticos continuam a constituir atividades estratégicas, mas com respaldo de segunda categoria (Vilela-Morales, 1999).

Cooper *et al.* (1998) enfatizaram que o Plano Global de Ação para Recursos Genéticos coordenado pela FAO tem por objetivo fortalecer a ligação entre conservação e utilização, disponibilizando melhor a informação, manejando mais eficientemente os acessos disponíveis, priorizando um contato mais estreito entre conservacionistas e melhoristas, principalmente via programas nacionais de recursos genéticos vegetais e também por maiores investimentos em programas de pré-melhoramento.

As tendências atuais de incentivo e de imprimir velocidade na criação de novas cultivares respaldado pelas leis de propriedade intelectual e pela relativa curta vida útil dos genótipos considerados elites, vão conduzir a que os melhoristas voltem as suas atenções, ações e esforços para o uso dos bancos de germoplasma em maior escala, até mesmo com o bom proveito das modernas tecnologias disponíveis de manejo do germoplasma conservado, visando a consistente disponibilização das informações e amostras para pronta utilização. Para isso é primordial a integração e complementação de atividades, o fortalecimento das rotinas quanto ao correto manuseio dos acessos, além do direcionamento das ações e esforços de pesquisa e validação para instruir e proporcionar a real utilização do germoplasma conservado. A formação de coleções nucleares, bem como o desenvolvimento de programas de pré-melhoramento são ações decisivas para a obtenção de bons ganhos genéticos em menor espaço de tempo e com menor custo operacional, principalmente diante da variabilidade genética disponível e das modernas tecnologias alternativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. Conservation of DNA: DNA banking. In: CALLOW, J.A.; FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURY, H.J. (Ed.) *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use*. Wallingford: CAB International, 1997. p.163-174.
- ALTHOFF, M.A. Viabilidade de sementes de mamão criopreservadas. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998. 4p. (Pesquisa em Andamento, 17).
- ASHMORE, S.E. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 67p.
- BENNETT, E. Tactics of plant exploration. In: FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. (Ed.) *Genetic resources in plants*. Oxford: Blackwell, 1970. p.157-179.

- BERJAK, P.; DUMET, D. Cryopreservation of seeds and isolated embryonic axes of neem (*Azadirachta indica*). *Cryo-Letters*, v.17, p.99-104, 1996.
- BERTHAUD, J. Strategies for conservation of genetic resources in relation with their utilization. *Euphytica*, v.96, p.1-12, 1997.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. *Primeiro relatório nacional em decorrência do que dispõe o artigo 26 da Convenção sobre Diversidade Biológica*; Brasil. Brasília, 1998. 283p.
- BRESE, E.L. *Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background*. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1989. 69p.
- BROWN, A.D.H. The case for core collections. In: BROWN, A.D.H.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) *The use of plant genetic resources*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.136-156.
- BROWN, W.L. Genetic diversity and genetic vulnerability: an appraisal. *Economic Botany*, v.37, p.4-12, 1983.
- CHANG, T.T. Germplasm enhancement and utilisation. *Iowa State Journal of Research*, v.54, p.349-364, 1985.
- CHANG, T.T. Availability of plant germplasm for use in crop improvement. In: STALKER, H.T.; MURPHY, J.P. (Ed.) *Plant breeding in the 1990s*. Melksham: Redwood Press, 1992. p.17-35.
- CIAT. *Biotechnology Research Unit: annual report*. Cali: International Centre of Tropical Agriculture, 1986. 67p.
- COOPER, H.D.; SPILLANE, C.; KERMALI, I.; ANISHETY, N.M. Harnessing plant genetic resources for sustainable agriculture. *Plant Genetic Resources Newsletter*, n.114, p.1-8, 1998.
- CORADIN, L. *Coleta de germoplasma*. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1990. 26 p.
- COSTA, I.R.S. Documentação e informatização de recursos genéticos. In: MARIANTE, A.S.; BUSTAMANTE, P.G. (Ed.) *SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2.*, Brasília, 1999. *Anais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/
- COSTA, I.R.S.; VILELA-MORALES, E.A. Cassava genetic resources in South America. In: *INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1.*, Rome, 1994. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1994. p.16-20.
- CREECH, J.L. Tactics of exploration and collection. In: FRANKEL, O.H.; BENNETT, E. (Ed.) *Genetic resources in plants*. Oxford: Blackwell, 1970. p.221-229.
- DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, J.L.; HAMON, S. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. *Cryo-Letters*, v.18, p.269-276, 1997.
- DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, J.L.; HAMON, S. Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research*, v.8, p.9-15, 1998.
- EIRA, M. T. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. da (Ed.) *Conservación de germoplasma vegetal*. Montevideu: IICA; Procisur, 1996. p.119-122.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behavior. II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. *Journal of Experimental Biology*, v.42, p.653-657, 1991.
- EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. *Relatório anual: 1997*. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998. 157p. (Documentos, 29).
- EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. *Relatório anual: 1998*. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1999. 204p. (Documentos, 38).
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In: CALLOW, J.A.; FORD-LLOYD B.V.; NEWBURY, H.J. (Ed.) *Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use*. United Kingdom: Wallingford, 1997. p.119-161.
- ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant genetic resources. In: MARIANTE, A.S.; BUSTAMANTE, P.G. (Ed.) *SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2.*, Brasília, 1999. *Anais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 4p. /CD-ROM/
- ESQUINAS-ALCÁZAR, J.T. Plant genetic resources. In: HAYWARD, M.D.; BOSEMARK, N.O.; RAMAGOSA, I. *Plant breeding: principles and prospects*. London: Chapman & Hall, 1993. p.33-51.
- FALAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; FERREIRA, F.R.; GONDIM, M.T.P.; WETZEL, M.M.V.S.; MENDES, R.A.; GOES, M. DE; MIRANDA, A.R. *Manual de procedimentos para conservação de germoplasma semente a longo prazo na Embrapa*. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998. 21p. (Documentos, 30).
- FAO. *The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 1998. 510p.
- FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. *Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use*. Moulton: Castlefield Press, 1986. 146p.
- FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.E. *Conservation and evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 327p.
- FRANKEL, O.H.; BROWN, A.D.H.; BURDON, J.J. *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 299p.

- GOODMAN, M.M. Genetic and germplasm stocks worth conserving. *Journal of Heredity*, v.81, p.11-16, 1990.
- GOEDERT, C.O.; WETZEL, M.M.V.S. Sistema de curadorias de germoplasma e o programa de conservação e uso de recursos genéticos do sistema Embrapa. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. *Anais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 1999. 9p. /CD-ROM/
- GOES, M. de. Studies on the conservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] germplasm. Bath: University of Bath, 1993. 169p. Thesis (Ph.D)
- GOES, M. de; MENDES, R.A. Conservação de germoplasma vegetal *in vitro*-criopreservação. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. da (Ed.) *Conservación de germoplasma vegetal*. Montevideo: IICA/Procrisur, 1996. p.139-142.
- GREENE, S.L.; GUARINO, L. (Ed.) *Linking genetic resources and geography: emerging strategies for conserving and using crop biodiversity*. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1999. (Special Publication, 27)
- GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. (Ed.) *Collecting plant genetic diversity*. Wallingford: CAB International, 1995. 748p.
- GUARINO, L.; LIBREROS, D.; ASTORGA, C. Enrichment of plant genetic resources collections in Latin America and the Caribbean through germplasm collecting: history and prospects. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. *Anais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 1999. 12p. /CD-ROM/
- HANSON, J. *Procedures for handling seeds in gene banks: practical manuals for gene banks*. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1985. n.1, 115p.
- HARLAN, J.R.; de WET, J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, v.20, p.509-517, 1971.
- HAWTIN, G.; IWANAGA, M.; HODGKIN, T. Genetic resources in breeding for adaptation. *Euphytica*, v.92, p.255-266, 1996.
- HEYWOOD, V.H. Jardins Botânicos e conservação de recursos genéticos vegetais. In: UNESCO. *Como gerir os nossos recursos genéticos*. Mitra-Sintra: Publicações Europa-América, 1990. 11p.
- HEYWOOD, V. H. Broadening the basis of plant resources conservation. In: GUSTALFSON, J. P. (Ed.) *Gene conservation and exploitation*. New York: Plenum Press, 1993. 28p.
- HODGKIN, T.; BROWN, A.D.H.; van HINTUM, T.J.L.; VILELA-MORALES, E.A (Ed.) *Core collections and plant genetic resources*. London: John Wiley & Sons, 1995. p.253-259: Future directions.
- IBPGR. *Design, planning and organization of in vitro genebanks: report of a subcommittee of the IBPGR Advisory Committee on in vitro storage*. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1986. 17p.
- IBPGR. *Elsevier's dictionary of plant genetic resources*. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 187p.
- KHOSHOO, T.N. Biodiversity in the developing countries. In: di CASTRI, F.; YOUNÈS, T. (Ed.) *Biodiversity, science and development: towards a new partnership*. Wallingford: CAB International; International Union of Biological Sciences, 1996. p.304-311.
- LLERAS, E. Coleta de recursos genéticos vegetais. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. *Anais. Jaboticabal: FCAV*, 1988. p.23-42.
- MARSHALL, D.R.; BROWN, A.D.H. Optimum sample strategies in genetic conservation. In: FRANKEL, O.H.; HAWKES, J.G. (Ed.) *Plant genetic resources for today and tomorrow*. London: Cambridge University Press, 1975. p.53-80.
- MENDES, R.A.; GOES, M. de. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. da (Ed.) *Conservación de germoplasma vegetal*. Montevideo: IICA/Procrisur, 1996. p.129-138.
- MILLER, J.S.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.80, p.437-448, 1990.
- NASS, L.L. Pré-melhoramento em milho (*Zea mays* L.). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. *Anais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 1999. 4p. /CD-ROM/
- NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. *Scientia Agricola*, v.57, p.581-587, 2000.
- NASS, L.L.; PELLICANO, I.J.; VALOIS, A.C.C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*, v.16, p.983-988, 1993.
- NORMAH, M.N. Seed storage and cryoexposure behavior in hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Barcelona). *Cryo-Letters*, v.15, p.315-322, 1994.
- PEACOCK, W.J. Molecular biology and genetic resources. In: BROWN, A.D.H.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. (Ed.) *The use of plant genetic resources*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.363-376.
- RAO, V.R.; RILEY, K.W. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter*, n.97, p.3-20, 1994.
- RITSCHER, P.S.; THOMAZELLI, L.F.; HUAMAN, Z. Caracterização morfológica de germoplasma de batata-doce. *Horticultura Brasileira*, v.16, 1998.

- SCOWCROFT, W.R. Genetic variability in tissue culture: impact on the germplasm conservation and utilization. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1984. 41p.
- SECOND, G.; ALLEM, A.C.; EMPERAIRE, L.; INGRAM, C.; COLOMBO, C.; MENDES, R.A.; CARVALHO, L.J.C.B. AFLP based *Manihot* and cassava numerical taxonomy and genetic structure analysis in progress: implications for dynamic conservation and genetic mapping. *African Journal of Root and Tuber Crop*, v.2, p.140-147, 1997.
- SECOND, G. *Manihot glaziovii*, an example for a proposed dynamic conservation of cassava genetic resources. *Revista Brasileira de Mandioca*, v.17, p.18, 1998. Suplemento.
- STANWOOD, P.C.; ROSS, E.E.; TOWIL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm: pilot research project. *Plant Genetic Resources Newsletter*, v.65, p.18-19, 1986.
- TOWILL, L.E.; JARRET, R.L. Cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports*, v.11, p.175-178, 1992.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. *Convention on biological diversity*. s.l., 1992. 24p.
- VENCOVSKY, R. *Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas*. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1986. 15p. (Boletim de Pesquisa, 1).
- VILELA-MORALES, E.A. Documentação e informática de recursos genéticos. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., Jaboticabal, 1988. *Anais*. Jaboticabal: FCAV, 1988. p.135-147.
- VILELA-MORALES, E.A. Princípios genéticos da informação para recursos genéticos vegetais. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2., Brasília, 1999. *Anais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 8p. /CD-ROM/
- VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. *Recursos genéticos vegetales*. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CENARGEN, 1997. 78p.
- WETZEL, M.M.V.S.; BUSTAMANTE, P.G. (Org). *Diretório de recursos genéticos*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 140p.