CAPITOLUL 1. CONSERVAREA RESURSELOR GENETICE VEGETALE

1. 1. Clasificare şi definire (Silvia Străjeru)

Pentru a proteja diversitatea fitogenetică se folosesc două strategii complementare de conservare, şi anume:

- ♦ „*ex situ*" şi
- ♦ „*in situ*"

Conservarea „*ex situ*" se realizează în:

- **bănci de gene**, care, la rândul lor, pot folosi câteva tehnici specifice, precum:
  - stocarea de seminţe;
  - menţinerea de plante vii în colecţii de câmp;
  - depozitarea „in vitro";
  - păstrarea polenului;
  - depozitarea de seminţe cu un conţinut de umiditate ultrascăzut;
  - stocarea de ADN sau a secvenţelor de ADN
- **grădini botanice**, care menţin:
  - colecţii de plante vii în câmp;
  - colecţii de plante vii în sere;
  - colecţii de seminţe

Conservarea „*in situ*" include:

- parcurile şi rezervaţiile naturale;
- populaţiile şi varietăţile tradiţionale păstrate „on farm"

In Convenţia pentru Diversitate Biologică (1992) cele două categorii de prezervare sînt definite astfel:

„***conservarea ex situ*** *presupune păstrarea componentelor diversităţii biologice în afara habitatului lor natural*", în timp ce,

*„**conservarea in situ** implică menţinerea ecosistemelor şi habitatelor naturale iar, în cazul speciilor domestice sau cultivate păstrarea lor în mediul în care s-au format şi dezvoltat.*

In mod tradiţional, conservarea *"in situ"* a fost şi este utilizată pentru prezervarea speciilor forestiere, a speciilor sălbatice sau a unor ecosisteme valoroase, iar conservarea *"ex situ"* se aplică, în general, resurselor genetice vegetale pentru alimentaţie şi agricultură.

1. 2. Avantajele şi dezavantajele celor două strategii de conservare (Silvia Străjeru)

Conservarea *"ex situ"*

Avantaje:

- diversitatea genetică conservată în băncile de gene sau grădinile botanice este, relativ, uşor de identificat, deoarece materialul este, sau ar trebui să fie, bine documentat (studiat);
- diversitatea genetică păstrată este direct controlabilă;
- posibilitatea pierderii materialului biologic este mică, având în vedere că probele sînt menţinute în condiţii adecvate şi regenerate periodic;
- accesul la aceste resurse este, oarecum, simplu.

Dezavantaje:

- procesul evolutiv este, în mod inevitabil, întrerupt prin scoaterea materialului genetic din mediul lui natural;
- unele procedee de păstrare sînt extrem de costisitoare.

Conservarea *"in situ"*

Avantaje:

- este o formă dinamică de conservare şi o sursă de variabilitate continuă datorită faptului că se păstrează, nu doar, materialul genetic, dar şi procesele care generează diversitate;

- în anumite condiţii această metodă poate fi mai ieftină şi mai eficientă.

Dezavantaje:

- identificarea şi accesul la materialul biologic conservat pot fi dificile, ceea ce reprezintă un important inconvenient pentru amelioratori, care folosesc în programele de ameliorare surse de germoplasmă cu însuşiri cunoscute;
- foarte rar este posibil un control direct al materialului conservat;
- eroziunea genetică poate acţiona în circumstanţe neprevăzute (războaie, cataclisme naturale, etc.).

Deoarece fiecare mod de abordare privind prezervarea biodiversităţii vegetale are avantaje şi dezavantaje distincte cel mai eficient sistem de conservare este acela care cuprinde elemente aparţinând ambelor strategii. Cele două modalităţi sînt considerate, în prezent, ca fiind complementare, nu exclusive.

1. 3. Tehnologii şi metode de conservare "*ex situ*" (Silvia Străjeru)

Metodele adoptate în conservarea resurselor genetice vegetale sînt determinate de următorii factori:

a) destinaţia colecţiilor

- conservare de lungă durată
- conservare de medie durată
- conservare de scurtă durată

b) comportamentul în condiţii de depozitare, precum, şi calitatea materialului colectat

- specii cu seminţe ortodoxe
- specii cu seminţe recalcitrante sau intermediare

c) resursele financiare şi umane disponibile, capacitatea instituţională şi tehnologiile.

1. 3. 1. Conservarea resurselor genetice vegetale sub formă de sămânţă

O modalitate de conservare genetică *"ex situ"* este aceea care se realizează în aşa-numitele bănci de gene, instituţii special înfiinţate, care au sarcina de a prospecta, colecta, evalua şi conserva plantele pe termene foarte mari. Cea mai practică şi mai practicată metodă de păstrare a resurselor genetice vegetale este aceea a conservării sub formă de sămânţă.

1. 3. 1. 1. Comportamentul seminţelor în timpul depozitării

Potrivit fiziologiei, în timpul stocării, seminţele pot fi clasificate în două mari grupe. Prima grupă este cea a **seminţelor „ortodoxe"** şi cuprinde majoritatea speciilor de plante. Îmbătrânirea şi, în final, moartea seminţelor din această categorie este nu numai funcţie de timp dar şi de nivelul de temperatură şi conţinutul de umiditate a seminţelor. Prin urmare, este posibil de influenţat perioada de supravieţuire a seminţelor acestor specii prin controlul mediului de depozitare. Cu cît temperatura şi umiditatea vor avea valori mai mici, cu atât va creşte longevitatea seminţelor.
Al doilea grup este cel al **seminţelor „recalcitrante"** , care include multe plante de cultură tropicale şi pomi fructiferi tropicali şi un număr de specii lemnoase, atât din zonele tropicale cât şi din cele temperate (**tabel 1**). În contrast cu seminţele „ortodoxe" rata deteriorărilor seminţelor „recalcitrante" este mai greu de controlat, ele nu suportă desicarea şi, prin urmare, nu pot fi depozitate la temperaturi sub 0°C. Cele mai multe seminţe „recalcitrante", aparţinând speciilor tropicale nu pot fi păstrate la temperaturi sub 10°C. În prezent, majoritatea seminţelor „recalcitrante" pot fi stocate pentru câteva săptămâni sau luni, fără pierderea viabilităţii. Metodele uzuale de conservare pe medie durată implică tratarea seminţelor cu fungicide şi stocarea lor umede şi cu acces de oxigen. Acest lucru poate fi realizat prin împachetarea probelor în pungi de plastic, într-un mediu umed şi inert, precum mangalul sau rumeguşul.

Tabel 1

Specii care produc seminţe recalcitrante

Denumirea ştiinţifică a speciei	**Denumirea populară a speciei**
Castanea sp.	Castan
Cinnamomum ceylanicum	Arborele de scorţişoară
Erythoxylum coca	Arborele de coca
Hevea brasiliensis	Arborele de cauciuc
Cocos nucifera	Cocos
Diospyros sp.	Abanos
Mangifera sp.	Mango
Myristica fragrans	Nucşoară
Swietenia mahogoni	Mahon
Syzgium aromaticum	Arborele de cuişoare
Teobroma cacao	Arborele de cacao
Persea sp.	Avocado
Quercus sp.	Stejar
Thea sinensis	Arborele de ceai
Acer sp.	Arţar
Coffea sp.	Arborele de cafea

Există şi o a treia categorie de seminţe a căror comportare este intermediară primelor două şi a căror denumire este omonimă comportamentului lor.

1. 3. 1. 2. Tipuri de colecţii de seminţe

Centrele de resurse genetice deţin una sau mai multe din următoarele colecţii:

- **colecţie de bază**, destinată conservării de lungă durată;
- **colecţie activă**, pentru conservarea de medie durată, folosită pentru regenerare, multiplicare, evaluare şi distribuire;
- **colecţie duplicat** (a colecţiei de bază), pentru conservarea de lungă durată şi care, din motive de securitate, este găzduită de o altă localitate sau ţară;
- **colecţie de lucru** – creatorii de soiuri păstrează acest tip de colecţii şi sînt folosite în programele de ameliorare (pentru încrucişări, selecţii, etc.); cele mai multe bănci de gene nu menţin asemenea colecţii;
- **colecţie de seminţe a comunităţii** – aceasta poate fi orice tip de colecţie şi serveşte interesele unei anume colectivităţii.

1. 3. 1. 3. Condiţii pentru depozitarea de lungă durată

Metodele pentru conservarea de lungă durată descrise, în continuare, sînt proprii colecţiilor de bază şi duplicat. Nu există motive speciale pentru care colecţiile active sau ale amelioratorilor nu ar trebui păstrate în condiţii de depozitare de lungă durată. În afara raţiunilor economice alţi factori operaţionali, pe care-i vom analiza mai jos, sugerează că sistemele de stocare pe termen mediu sînt mai potrivite pentru colecţiile active.

Longevitatea seminţelor „ortodoxe" poate fi îmbunătăţită considerabil prin controlul mediului de depozitare, deoarece creşterea longevităţii este, aproximativ, exponenţială cu scăderea temperaturii şi a conţinutului de umiditate.

Se recomandă depozitarea seminţelor:

- cu un conţinut de umiditate de 5 ± 1%;
- la temperaturi de -18^{0}C, sau –20^{0}C;
- în containere închise ermetic.

De fapt, -18^{0}C este o temperatură arbitrară şi cele mai multe echipamente frigorifice funcţionează în regim economic la –20^{0}C, aşa încât cele mai multe bănci de gene au adoptat această temperatură.

Conţinutul de umiditate a seminţelor, în timpul depozitării, poate fi controlat pe două căi:

- metoda recomandată este de usca seminţele până la un conţinut de umiditate de 5%, după care acestea se depun în recipiente închise ermetic, astfel încât valoarea umidităţii din momentul împachetării să se menţină pe toată perioada depozitării;
- o alternativă la depozitarea ermetică este păstrarea în containere deschise şi verificarea umidităţii relative a atmosferei încăperii de conservare, ştiindu-se faptul că se stabileşte o inter-relaţie de echilibru între umiditatea relativă a aerului şi conţinutul de umiditate a seminţelor; totuşi, realizarea şi menţinerea unei umidităţi relative care să răspundă acestui scop, adică 10 – 15%, este dificil de obţinut la temperaturi situate sub 0^{0}C iar preţul poate fi prohibitiv pentru multe bănci de gene.

Cea mai sigură metodă este aceea prin care conținutul de umiditate a semințelor este controlat şi menținut la valoarea inițială (de după uscare) cu ajutorul recipientelor închise ermetic.

În standardele elaborate de către Institutul Internațional de Resurse Genetice Vegetale (IPGRI), în colaborare cu FAO, condițiile pentru depozitarea de lungă durată sînt împărțite în trei categorii, astfel:

- acceptabile
  - temperatura de depozitare situată sub 0^0 C
  - conținutul de umiditate a semințelor cuprins între 3 şi 7 % (în funcție de specie)
- preferabile
  - temperatura de depozitare de -18^0 C sau -20^0 C
  - conținutul de umiditate a semințelor cuprins între 3 şi 7 % (în funcție de specie)
- ideale
  - temperatura de depozitare de -18^0 C sau -20^0 C
  - conținutul de umiditate a semințelor de 5 %

Adoptarea acestor standarde va conduce la reducerea frecvenței activităților de regenerare şi monitorizare diminuându-se, astfel, costurile de funcționare, precum, şi riscul pierderii integrității genetice a germoplasmei conservate datorat multiplicărilor repetate.

Alegerea condițiilor de păstrare va fi influențată de următorii doi factori:

- speciile care intră în componența colecției;
- lungimea perioadei până la prima regenerare.

Totuşi, o anumită flexibilitate este admisă şi fiecare bancă va adopta acele condiții care asigură viabilitatea şi integritatea genetică a materialului conservat o perioadă cât mai lungă de timp.

Pornind de la natura relației care se stabileşte între longevitatea semințelor, temperatura de depozitare şi conținutul de umiditate a semințelor putem obține aceeaşi durată de viață a germoplasmei conservate prin folosirea unor combinații diferite de temperaturi şi umidități. Subliniem faptul că trebuie de evitat tendința de a

supraevalua beneficiile aduse de reducerea temperaturii, comparativ cu cele date de scăderea umidității. Privitor la efectul temperaturii, reacția de răspuns a longevității relative la scăderea temperaturii de păstrare este similară pentru multe specii cu semințe „ortodoxe". Efectul benefic dat de o anumită reducere a temperaturii este cu atât mai mic cu cât temperatura este mai joasă; cel puțin, așa se întâmplă în intervalul cuprins între $+20^0$ C și -20^0 C.

Astfel, longevitatea crește de, aproximativ:

- 3 ori când temperatura scade de la $+20^0$ C la $+10^0$ C;
- 2,4 ori când temperatura scade de la $+10^0$ C la 0^0 C;
- 1,9 ori când temperatura scade de la 0^0 C la -10^0 C;
- 1,5 ori când temperatura scade de la -10^0 C la -20^0 C.

În contrast, beneficiile relative aduse longevității prin scăderea umidității semințelor devin mai substanțiale cu fiecare reducere succesivă a conținutului de umiditate și sînt dependente de specie. Variațiile dintre specii se datorează compoziției chimice a semințelor care reprezintă principalul factor de influență a relației de echilibru dintre umiditatea aerului și cea a seminței. Observațiile făcute pe semințe de *Sesamum indicum* L. (susan), dar ale căror rezultate sînt obținute prin extrapolare, au scos în evidență faptul că reducerea conținutului de umiditate de la 5% la 2% rezultă într-o creștere a longevității de 40 de ori. Acest lucru nu este, însă, valabil pentru toate speciile.

Trebuie spus că există o umiditate limită sub care nu se constată efecte pozitive asupra longevității. Această valoare critică variază cu specia și, se estimează, a corespunde unui conținut de umiditate care se află în echilibru cu o umiditate relativă a aerului de 10 – 12%, la temperatura de 20^0 C.

1. 3. 1. 4. Condiții pentru depozitarea de medie durată

Colecțiile active trebuie depozitate în condiții care să permită menținerea unei viabilități de, cel puțin, 65% pentru o perioadă de 10 – 20 de ani. Regimurile de stocare care să susțină acest obiectiv vor fi dependente de:

- specie;
- condiţiile de mediu;
- costurile de funcţionare, în principal, energie electrică şi forţă de muncă.

Majoritatea băncilor de gene asigură colecţiilor active următorii parametri de conservare:

- temperatura de depozitare cuprinsă între 0 şi 10^0C;
- conţinutul de umiditate a seminţelor situat între 3 şi 7%.

Conţinutul de umiditate recomandat poate fi controlat, prin cele două căi descrise la colecţiile de bază. Când se adoptă varianta de stocare a probelor în containere deschise umiditatea relativă a mediului nu trebuie să depăşească 15%, iar umiditatea seminţelor trebuie testată, destul, de frecvent. În aceste condiţii, pentru a evita consumul, prea mare, de seminţe, unele, bănci de gene introduc în fiecare recipient un agent higroscopic cu indicator de culoare, care furnizează informaţii referitoare la umiditatea relativă a mediului de păstrare. Din raţiuni economice se poate utiliza un amestec format dintr-un indicator de culoare şi un agent higroscopic neutru, în raport de 1:10. Cel mai des folosit agent higroscopic este silicagelul care conţine clorură de cobalt, de culoare albastră închis. Schimbarea culorii silicagelului se produce astfel:

- începe să-şi piardă intensitatea culorii la 15% umiditate relativă;
- devine incolor la 30% umiditate relativă;
- devine roz la, aproximativ, 45% umiditate relativă.

Este bine de menţionat că diferite combinaţii între temperatura de depozitare şi conţinutul de umiditate a seminţelor pot avea ca rezultat aceeaşi longevitate. De asemenea, în multe zone geografice, controlul conţinutului de umiditate poate fi mai eficient decât cel al temperaturii.

1. 3. 1. 5. Mărimea probelor

Pentru colecţiile de bază standardul acceptabil este de 1000 de seminţe viabile. În situaţia în care o probă conţine un număr mai mic de 1000 de seminţe se va

proceda la multiplicare sau re-colectare, dacă este posibil. Preferabil este ca fiecare intrare să fie constituită dintr-un număr de 1500 – 2000 de seminţe viabile. In cazul eşantioanelor eterogene genetic (populaţiile locale) vor fi necesare mai multe seminţe.

Mărimea probelor care alcătuiesc colecţia activă este mult mai mare decât a celei de bază, datorită destinaţiei acesteia (evaluare, regenerare, multiplicare, distribuire către diferiţi utilizatori).

1. 3. 1. 6. Containere utilizate pentru stocarea seminţelor

Recipientele ideale folosite la împachetarea seminţelor ar trebui să răspundă următoarelor cerinţe:

- să fie impermeabile la gaze şi vapori de apă;
- să poată fi închise ermetic;
- să fie uşor de mânuit şi etichetat;
- să nu fie fragile;
- să poată fi re-utilizate;
- să nu fie scumpe;
- să fie transparente.

Alegerea se va face în funcţie de costuri, de ce avem la dispoziţie, de tipul colecţiei, precum, şi de spaţiul disponibil pentru depozitare. Când nu suntem siguri de proprietăţile impermeabile ale containerului se recomandă testarea înainte de a lua o decizie asupra tipului de recipient folosit. Se preferă împărţirea lotului de seminţe în mai multe sub-probe, care se vor împacheta separat pentru o mai mare siguranţă.

S-a pus problema emanării unor gaze toxice în timpul stocării de lungă durată care ar afecta longevitatea seminţelor. Totuşi, la temperatura de -18 ÷ - 20^0 C şi la un conţinut de umiditate de 5%, activitatea metabolică este atât de redusă încât emisiile toxice vor fi la un nivel la care longevitatea nu poate fi influenţată.

În practică, cel mai frecvent întâlnite materiale de împachetare sînt:

- sticla;
- metalul;
- folia de aluminiu.

Fiecare dintre ele are avantaje şi dezavantaje.

Recipientele de sticlă a căror închidere se realizează prin capace prevăzute, fie, cu garnitură de etanşare, din cauciuc, fie, cu filet, prezintă următoarele **avantaje**:

- sînt, relativ, ieftine;
- sînt sigure;
- nu necesită investiţii de capital deosebite;
- sînt transparente, permiţând examinarea vizuală în cazul utilizării unui agent higroscopic cu indicator de culoare pentru a ne avertiza asupra schimbărilor survenite în conţinutul de umiditate al seminţelor;
- pot fi reutilizate, cu excepţia acelora care au capace cu garnitură de cauciuc.

În categoria **dezavantajelor** pot fi incluse:

- fragilitatea;
- greutatea în manipulare, sticla fiind, relativ, grea;
- împachetarea necesită un timp de 4 ÷ 10 ori mai mare decât în cazul altor tipuri de containere;
- etanşeizarea nu este, întotdeauna, perfectă când se folosesc capace filetate;
- ocuparea unui spaţiu mai mare în depozit.

Cutiile de metal sînt, relativ, convenabile, având ca **avantaje**:

- siguranţa şi uşurinţa în utilizare;
- preţul mic;
- posibilitatea reutilizării.

Câteva **dezavantaje** semnalate de către diferiţi utilizatori sînt enumerate mai jos:

- probele nu pot fi vizualizate decât prin deschiderea cutiei;
- echipamentul folosit pentru închiderea containerului este scump;
- necesită un spaţiu, suficient de, mare în camerele de conservare.

Plicurile din folie de aluminiu sînt considerate a fi ideale pentru împachetarea seminţelor, având următoarele **avantaje**:

- asigură o foarte bună etanşare;

- pot fi refolosite;
- sînt uşor de etichetat;
- ocupă puţin spaţiu în depozit.

Doar, un singur **dezavantaj,** demn de luat în seamă, este preţul prohibitiv, pentru multe bănci de gene.

Folia de aluminiu, utilizată ca material de împachetare pentru colecţiile de seminţe, are în structura ei trei straturi:

- exterior alcătuit din poliester, cu rol de protecţie a foliei de aluminiu;
- mijlociu din folie de aluminiu, care asigură impermeabilitatea;
- interior din polietilenă, conferind proprietăţi de sigilare.

1. 3. 1. 7. Metodologia de procesare a seminţei

În esenţă, operaţiile care se execută anterior depunerii seminţelor în camerele de păstrare ale băncii sînt simple şi ar putea fi, în mod eronat, comparate cu cele specifice oricărui depozit de mărfuri. Deosebirea majoră stă în faptul că seminţele care alcătuiesc colecţiile băncilor de gene sînt reprezentate de material biologic viu, aşa încât maniera de lucru adoptată va fi una ordonată, eficace, atentă şi precisă în scopul menţinerii viabilităţii şi stabilităţii genetice a germoplasmei respective. Schema prezentată în **figura 1** poate fi urmată atunci când probe de seminţe intră într-o bancă.

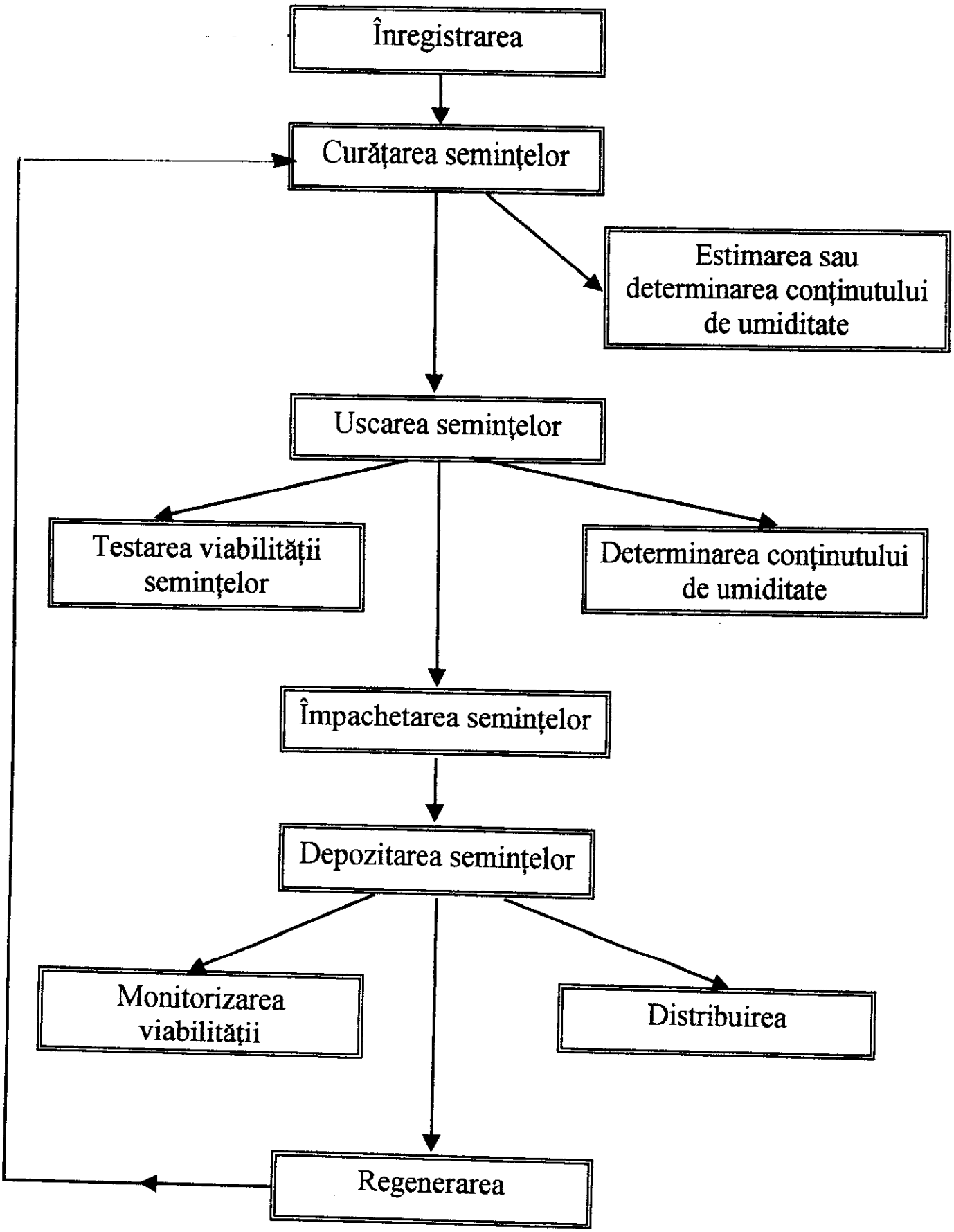


Figura 1. Secvența operațiilor care se execută într-o bancă de gene

Următoarele reguli generale trebuie respectate când lucrăm cu seminţe destinate conservării genetice:

- **Procesaţi seminţele cât mai repede posibil!**





De ce ?

Deoarece probele lăsate neîmpachetate riscă să fie amestecate şi, de asemenea, pot fi lesne infestate de diferite insecte ceea ce va determina o mai rapidă pierdere a viabilităţii.

- **Uscaţi seminţele, pe cât posibil, imediat după primire!**





De ce ?

Deoarece umidităţile scăzute vor avea ca efect păstrarea viabilităţii, chiar, la temperatura din laborator.

- **Nu plasaţi, niciodată, seminţe umede la temperaturi situate sub 0^0 C !**





De ce ?

Deoarece seminţele cu umidităţi situate între 16 – 20 % pot suferi deteriorări celulare prin îngheţare, ceea ce va rezulta în pierderea viabilităţii.

- **Imediat după uscare împachetaţi seminţele în recipiente impermeabile !**





De ce ?

Deoarece conţinutul de umiditate a seminţei va intra în echilibru cu umiditatea relativă a aerului şi, deci, seminţele uscate vor absorbi, din nou, umiditate.

- **Trataţi fiecare probă de seminţe în mod individual !**





De ce?

Fiindcă intrări variate ale aceleiaşi specii pot avea caracteristici de depozitare diferite.

- **Păstraţi toate informaţiile care însoţesc proba !**





De ce?

Deoarece cu cât mai multe informaţii deţinem cu atât este mai uşor, iar anumite date care ni se par irelevante pot deveni importante, mai târziu.

Înregistrarea probelor se face, doar, la prima intrare în bancă prin atribuirea unui număr unic şi irepetabil, care poate fi însoţit şi de iniţialele instituţiei care primeşte acel eşantion de seminţe.

ATENŢIE ! Dacă o probă este, deja, prezentă în colecţie, provenită dintr-o altă sursă, aceasta va păstra numărul de intrare iniţial.