

MUDAS CLONAIS DE CAFÉ

Produção por meio de
embriogênese somática

João Batista Teixeira



Embrapa

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

MUDAS CLONAIS DE CAFÉ

Produção por meio de
embriogênese somática

João Batista Teixeira

Embrapa
Brasília, DF
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W5 Norte (final)
70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Comitê Local de Publicações

Presidente

Maria Isabela Lourenço Barbirato

Secretária-Executiva

Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Membros

Daniela Aguiar de Souza Kols

Lígia Sardinha Fortes

Lucas Machado de Souza

Márcio Martinelli Sanches

Rosameres Rocha Galvão

João Batista Tavares da Silva (suplente)

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (Final)
CEP 70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
www.embrapa.br/livraria
livraria@embrapa.br

Unidade responsável pela edição

Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial

Selma Lúcia Lira Beltrão

Lucilene Maria de Andrade

Nilda Maria da Cunha Sette

Supervisão editorial

Waldir Aparecido Marouelli

Copidesque

Waldir Aparecido Marouelli

Revisão de texto

Francisco C. Martins

Corina Barra Soares

Normalização bibliográfica

Iara Del Fiaco Rocha

Projeto gráfico e capa

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Foto da capa

João Batista Teixeira

Foto da 2ª e da 3ª capa

Rafael Rocha

1ª edição

1ª impressão (2017): 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Informação Tecnológica

Teixeira, João Batista.

Mudas clonais de café: produção por meio de embriogênese somática / João Batista Teixeira. – Brasília, DF: Embrapa, 2017.

187 p. : il. color. ; 16 cm x 22 cm.

ISBN 978-85-7035-725-0

1. Café. 2. *Coffea arabica*. 3. Clonagem. 4. Cultivo in vitro. 5. Biofábrica. I. Teixeira, João Batista. II. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CDD 633.73

© Embrapa, 2017

Autor

João Batista Teixeira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia de Plantas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

O autor agradece à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, à Embrapa Café e aos bolsistas e estudantes Ana Júlia Prozil Pereira, Ana Paula Domingos da Silva, Célia Takako Arimura, Cristina Salgado Junqueira, Danielle Alves Munding, Marcelo Rodrigues de Abreu Ferreira e Raquel Ivaniscka Soriano de Mello, pelo apoio e colaboração.

Manifesta seu reconhecimento ao pesquisador Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, da Embrapa Café – que testou o presente protocolo em laboratório da Fundação Procafé, estabelecida em Varginha, MG –, com quem durante anos trocou informações sobre os resultados obtidos em cada uma das fases do processo.

Em especial, agradece a Patrícia Monah Cunha Bartos, doutora em Botânica, que muito contribuiu para a produção desta obra.

Finalmente, agradece à Dra. Maria Cléria Valadares Ingris, pela análise cuidadosa do primeiro manuscrito, e ao Dr. Waldir Aparecido Marouelli, pela incansável e exaustiva revisão da obra, os quais permitiram dar a esta publicação o aspecto que ela ora apresenta.



Apresentação

O cultivo do café, atividade agrícola de grande expressão econômica nacional, teve início no Brasil há mais de 150 anos. O processo de melhoramento genético do café no País, por sua vez, superou meio século, sendo que as variedades produzidas, principalmente pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), contribuíram para elevar substancialmente a produção e a produtividade nacional de café.

O melhoramento genético da cultura tem esbarrado, porém, em uma base genética relativamente estreita, o que dificulta o desenvolvimento e o lançamento de variedades que combinem, num mesmo indivíduo, características de interesse, como alta produtividade, resistência a doenças e tolerância a insetos-praga, qualidade de bebida, além de maior adaptação a condições de temperaturas mais elevadas e veranicos mais prolongados. Como as variedades de café são homozigotas, torna-se difícil, quando não impossível, reunir todas as características desejáveis em uma mesma variedade, usando-se métodos de melhoramento tradicional. Assim, o uso de variedades híbridas constitui uma das poucas possibilidades de elevar o melhoramento do café a um novo patamar.

Embora a multiplicação clonal do café possa ser feita em pequena escala por estaquia de ramos, em condições de viveiro, a clonagem pode ser realizada em laboratório, pelo cultivo de gemas ou por meio da embriogênese somática.

Com o lançamento de variedades clonais, cafeicultores poderão dispor de materiais com características altamente desejáveis, que eventualmente possam substituir, com alguma vantagem, as variedades tradicionais. Mas, para que essas variedades possam ser cultivadas em larga escala, é imprescindível dispor de uma metodologia de clonagem vegetal.

Esta obra, destinada, principalmente, a estudantes e profissionais das áreas agrônoma e biológica e a empresários ligados ao setor de produção de mudas, apresenta uma metodologia eficiente de clonagem de café (*Coffea arabica*), que vem sendo ajustada ao longo de mais de 15 anos de pesquisas e ensaios de validação, conduzidos pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em conjunto com a Embrapa Café.

Assim, a obra é mais uma contribuição da Embrapa ao agronegócio brasileiro em um produto de grande importância econômica e social. O autor, Dr. João Batista Teixeira, tem vasta experiência em cultura de tecidos vegetais, tendo desenvolvido metodologias diversas para o aprimoramento da produção *in vitro* de plantas.

A metodologia de produção de mudas clonais de café está pronta para ser usada, mas ainda em escala piloto. Durante essa fase, avaliações globais e específicas das fases do processo serão fundamentais para identificar ajustes necessários para que a produção em larga escala seja conduzida com eficiência e reprodutibilidade. Como sempre, a Embrapa estará à disposição para efetuar a transferência das tecnologias envolvidas de modo a contribuir para o avanço da cafeicultura brasileira.

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe-geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Prefácio

Neste livro é apresentado um protocolo básico de clonagem de café por meio de embriogênese somática, em laboratório. Trata-se de um processo complexo que, fazendo uso de segmentos foliares de uma planta-matriz de café, em sucessivos cultivos in vitro, leva à produção de mudas prontas para serem transplantadas no campo.

A obra é dividida em cinco tópicos: Fatores envolvidos na indução de embriogênese somática; Protocolo básico de embriogênese somática; Preparo de meios de cultura; Preparo de soluções estoques; e Estrutura de uma biofábrica para produção de mudas.

No primeiro tópico, são apresentados e discutidos os principais fatores que podem influenciar, positiva ou negativamente, a resposta embriogênica em folhas de café.

No tópico sobre o protocolo, são descritas, passo a passo, as principais fases do processo embriogênico para a produção de mudas de café, de acordo com o protocolo de clonagem desenvolvido na Embrapa. Foram intencionalmente evitadas discussões muito detalhadas sobre o processo, para facilitar a leitura de cada uma das fases envolvidas.

Posteriormente, são detalhadas todas as recomendações e etapas necessárias ao preparo dos diferentes meios de cultura e das soluções-estoque usadas no preparo dos meios. Tais etapas são extremamente

críticas no processo de produção de mudas por meio de embriogênese somática.

No último tópico, sobre estrutura de uma biofábrica, são apresentadas informações gerais e quantitativas sobre a infraestrutura, os equipamentos, as vidrarias e os frascos, os principais reagentes e outros materiais necessários para a instalação de uma biofábrica de produção de mudas.

No final, foram acrescentados um apêndice com questões sobre os principais aspectos no processo de produção de mudas e um glossário de termos técnicos.

O protocolo proposto é fruto de inúmeros testes e ensaios realizados pelo autor nos laboratórios da Embrapa, com o objetivo de aumentar a taxa de indução de calos embriogênicos para *Coffea arabica* e simplificar os processos envolvidos, o que foi conseguido com sucesso.

Gabriel Ferreira Bartholo
Gerente-geral da Embrapa Café



Sumário

Introdução, 13

Fatores envolvidos na indução de embriogênese somática, 19

- Genótipo, 19
- Planta-matriz, 20
- Sazonalidade, 24
- Tipo de folha, 25

Protocolo de embriogênese somática, 27

- Indução de formação de calos primários, 31
- Indução de formação de setores embriogênicos, 50
- Multiplicação de setores embriogênicos, 53
- Formação de embriões globulares, 64
- Formação de embriões torpedos, 68
- Formação de embriões cotiledonares, 72
- Germinação de embriões cotiledonares, 74
- Aclimatização e formação de mudas, 75
- Rustificação de mudas, 80
- Cronograma de produção de mudas, 81
- Resumo do protocolo, 82

Preparo de soluções-estoque, 89

- Qualidade dos reagentes, 90
- Qualidade da água, 91
- Soluções-estoque de macronutrientes, 93
- Soluções-estoque de micronutrientes, 99
- Solução-estoque de vitaminas, 104
- Soluções-estoque de reguladores de crescimento, 105

Preparo de meios de cultura, 109

- Meio de cultura primário, 109
- Meio de cultura secundário, 111
- Meio de cultura de multiplicação, 112
- Meio de cultura de regeneração, 115
- Meio de cultura de regeneração modificado, 116
- Meio de cultura de diferenciação e maturação, 116
- Meio de cultura de germinação e crescimento, 116

Estrutura de uma biofábrica para produção de mudas, 121

- Infraestrutura, 122
- Equipamentos, 133
- Frascos, 142
- Materiais diversos, 147
- Principais reagentes, 148

Referências, 151

Apêndice, 155

- Questões relativas à clonagem de café, 155

Glossário, 175



Introdução

A obtenção de novas variedades de café depende, basicamente, da seleção dentro de populações híbridas de *Coffea arabica*, tendo como base variedades tradicionais. A vantagem da seleção dentro de populações híbridas é a relativa facilidade com que é feita a seleção de características com alta heritabilidade, o que permite o descarte de genótipos indesejáveis. A desvantagem está na rápida perda das características com baixa heritabilidade, em decorrência da redução do nível de heterozigose dos indivíduos selecionados, quando submetidos a autofecundações ou retrocruzamentos (GALLAIS, 1990). Portanto, no processo de seleção para obter novas variedades geneticamente estáveis, existe o risco de se obter pequeno ganho genético, uma vez que as variedades geradas podem ser muito parecidas com os parentais. Além disso, a criação de uma variedade envolve trabalhos de autofecundação, retrocruzamento e seleção recorrente por um período que pode se estender a 30 anos.

Por volta de 1980, Charrier (1978) e Walyaro (1983) sugeriram a possibilidade de criação de variedades híbridas de café, visando à exploração da heterozigose. Isso se justifica na medida em que o melhoramento genético de café envolve a seleção inicial de plantas híbridas com alto vigor e produtividade. Segundo Etienne et al. (2002), híbridos F1 de café produzem de 20% a 30% mais que as melhores linhagens estáveis, além de poderem carregar genes complementares resistentes a pragas e doenças. Híbridos F1 obtidos de cruzamentos entre variedades tradicionais, avaliados na