

MICROPROPAGAÇÃO DE CAQUIZEIRO (*Diospyros kaki* L.) POR MEIO DE GEMAS LATERAIS E APICAIS DE PLANTAS ADULTAS¹

Luiz Carlos Chamhum Salomão²
Juliana Cristina Vieccelli²
Dalmo Lopes de Siqueira²
Wagner Campos Otoni³
Carlos Eduardo Siste²

1. INTRODUÇÃO

O caquizeiro é espécie de clima subtropical, originária da China e cultivada extensivamente no Japão. Seu fruto é rico em açúcares (10), sais minerais e vitamina A (3).

Esta espécie pode ser propagada via sexuada, por meio de sementes, ou via assexuada, por meio de rebentos, estacas de caule e raízes, enxertia e, mais recentemente, via cultura de tecidos.

O cultivar Giombo pertence ao tipo variável, que inclui frutos de polpa taninosa e cor amarelada, quando sem sementes, e não-taninosa, parcial ou totalmente, quando apresenta uma ou mais sementes. Quando estas são numerosas, a polpa é de cor escura, enquanto nos frutos com poucas sementes a tonalidade escura aparece apenas ao redor delas (5).

De acordo com SUGIURA *et al.* (11), a micropropagação pode ser um meio de multiplicação rápido e em larga escala. Assim, esta técnica tem

¹ Apoio financeiro: CAPES e FAPEMIG. Aceito para publicação em 07.09.1998.

² Departamento de Fitotecnia, UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

³ Departamento de Biologia Vegetal, UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

sido buscada, pois oferece a possibilidade de alta taxa de multiplicação, maior uniformidade das plantas e menor tempo de formação das mudas. Além disso, os métodos mais tradicionais de multiplicação sexuada podem acarretar alguns problemas, como dificuldade na obtenção de sementes em muitas variedades de caquizeiro, pela sua tendência em produzir frutos partenocárpicos (5) o período de juvenilidade muito longo, além da segregação, que normalmente ocorre nesse tipo de propagação. No caso de propagação assexuada, a dificuldade no enraizamento de estacas de caule é outro problema, já detectado por RUBBO (8) e que, segundo Assaf (1966) citado por RUBBO (8), tem como uma das possíveis causas a oxidação do tanino presente, que confere coloração escura ao calo e, por fim, pode-se citar também como um problema a lentidão do processo da formação de mudas por enxertia.

Os trabalhos pioneiros nesta linha de pesquisa, com a cultura do caquizeiro, foram feitos por YOKOYAMA E TAKEUCHI (14) e, posteriormente, alguns trabalhos vêm sendo feitos em diferentes países, como Japão e Nova Zelândia (4, 11, 13). No Brasil, não foram encontrados trabalhos semelhantes, ainda que se saiba da necessidade de maior estímulo aos produtores de caqui, pela oferta de mudas que venham proporcionar maior uniformidade e precocidade de produção.

Assim, ante às possibilidades da obtenção de mudas de caquizeiro, pelas técnicas de micropropagação, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo geral de estudar e estabelecer um protocolo para tal, a partir de gemas laterais e apicais de plantas adultas do cultivar Giombo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, no Setor de Fruticultura, do Departamento de Fitotecnia da UFV.

Em junho de 1996, plantas adultas de caquizeiro 'Giombo', com aproximadamente quinze anos, sofreram poda drástica, que consistiu na remoção de todos os ramos e, ou, extremidades de ramos com diâmetro inferior a 20 mm. Aproximadamente trinta dias após a poda, foram coletadas as brotações, que consistiam de ramos com 100 a 150 mm de comprimento.

O material vegetal coletado foi conduzido ao laboratório, onde as gemas laterais (Figura 1A) e apicais dos ramos foram então removidas com auxílio de bisturi e, após, desinfestadas e inoculadas nos meios de estabelecimento.

A desinfestação consistiu da imersão das gemas, após sua remoção dos ramos, em álcool 70% por um minuto, seguida de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, acrescida de 0,1% de Tween 20 por

15 minutos. Em seguida, as gemas passaram por quatro a seis lavagens em água deionizada e autoclavada, para remoção dos resíduos de desinfetante.

Após a desinfestação, as gemas tiveram de quatro a seis primórdios foliares removidos e, em seguida, foram inoculadas nos meios de estabelecimento (Figura 1).

Para seu estabelecimento *in vitro*, as gemas foram cultivadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL dos sais básicos MS (6) reduzidos a 50% da sua concentração inicial e suplementados com oito diferentes combinações de fitorreguladores.

Todos os meios foram suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 50 mg.L⁻¹ de inositol, 5 ml.L⁻¹ de complexo vitamínico de MS (ácido nicotínico e piridoxina a 0,5 ml.L⁻¹ e tiamina a 0,4 ml.L⁻¹) e 5 g.L⁻¹ de ágar Merck. Após o preparo, o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, os meios distribuídos nos tubos, que foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Os tratamentos foram: meio 1, MS “meia força” + 10 µM de Zeatina; meio 2, MS “meia força” + 10 µM de Zeatina + 0,05 µM de AIA; meio 3, MS “meia força” + 10 µM de Zeatina + 0,10 µM de AIA; meio 4, MS “meia força” + 10 µM de Zeatina + 0,20 µM de AIA; meio 5, MS “meia força” + 10 µM de Zeatina + 0,40 µM de AIA; meio 6, MS “meia força” + 10 µM de Zeatina + 0,10 µM de ANA; meio 7, MS “meia força” + 0,10 µM de Cinetina e, meio 8, MS “meia força”.

Cada tratamento continha 30 tubos inicialmente, e sua distribuição nas estantes da sala de cultivo foi aleatória. Para efeito de análise estatística, utilizou-se a estatística descritiva, em que os tratamentos foram comparados por meio de suas médias, e as dispersões dos dados, pelos respectivos desvios-padrão.

Durante o estabelecimento foi feita a contagem dos tubos contaminados e o seu posterior descarte.

Cada um dos oito meios de cultura foi testado em gemas laterais e apicais de plantas adultas de caquizeiro, constituindo, cada tipo de gema, um experimento individual. Em cada experimento foram estudados o estabelecimento, o desenvolvimento, a multiplicação e o enraizamento nos diferentes explantes.

Os explantes foram mantidos em sala de cultivo, à temperatura de 27 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $8,77 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em média, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz-do-dia. Os explantes foram mantidos nestas condições até serem submetidos às repicagens, no caso de desenvolvimento, ou até serem descartados, no caso de contaminação, oxidação ou calejamento. Após cada repicagem, 50% dos explantes resultantes foram levados ao mesmo meio em que se

encontravam, renovado, e 50% foram inoculados em meio para enraizamento.

Foram multiplicados os explantes em que ocorreu desenvolvimento da parte aérea (Figuras 1E, F, G e H). Os que não se desenvolveram (gemas oxidadas, contaminadas ou que apenas formaram massas de calo) foram descartados (Figuras 1B e C).

Quándo 50% ou mais dos explantes de um mesmo tratamento aproximadamente 5 mm, contendo pelo menos uma gema cada. As repicagens ocorreram, em média, a cada 59 dias após cada inoculação.

Visando o enraizamento, a metade dos explantes resultantes das repicagens era transferida para meio MS "meia força" acrescido de 0,20 μ M de AIB e, em seguida, submetida a 16 dias em ausência de luz. Após esses dias, esses explantes foram levados novamente à condição de fotoperíodo de 16 horas.

Durante as repicagens foram coletados os seguintes dados de cada segmento de caule: altura do segmento de caule, número de brotações secundárias e número de folhas. O trabalho foi conduzido até a segunda repicagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Predominaram as contaminações por fungos. Quando se utilizaram gemas apicais, ocorreu em média 21,87% de contaminação, sendo 14,92% por fungos e 6,95% por bactérias. No caso de gemas laterais, ocorreu em média 9,50% de contaminação, sendo, nesse caso, 6,62% por fungos e 2,88% por bactérias. No entanto, esta metodologia parece ter sido satisfatória para a descontaminação do material, uma vez que em vários tratamentos houve 0% de contaminação. Esta mesma metodologia já foi usada por vários autores, em trabalhos semelhantes (11,12).

De modo geral, os explantes utilizados neste trabalho, provenientes de plantas adultas, não tiveram resposta satisfatória. Lyrene (1982), citado por SANTOS (9), afirma que o crescimento de um explante adulto é mais lento e sem vigor, muitas vezes sem sucesso, ao passo que um explante juvenil permite rápido crescimento e alta taxa de sobrevivência. Cheng (1975) citado por OTONI (7), estudando o cultivo *in vitro* de algumas plantas lenhosas, concluiu que a capacidade regenerativa dos tecidos diminui a cada ano de maturação das plantas, embora características juvenis ainda possam se manifestar. No caso de espécies lenhosas, com a

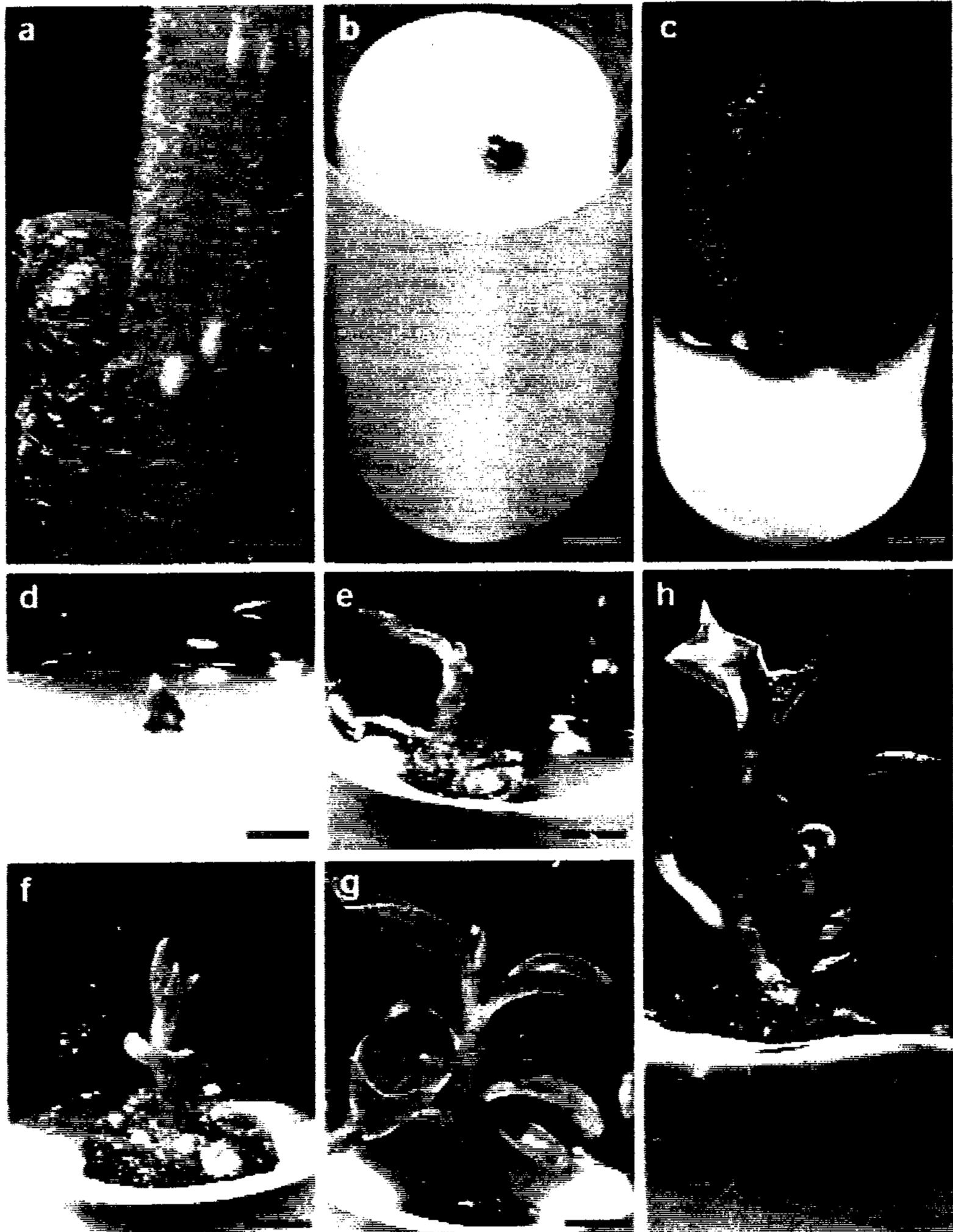


FIGURA 1 – Gema verde, em ramo de planta adulta de caquizeiro (a); gema oxidada (b); massa de calo (c); gema verde em meio de cultura (d); gema em início de desenvolvimento (e); início da formação de um segmento de caule (f); segmento de caule formado, com folhas (g) e brotação múltipla (h).

passagem do estado juvenil para o adulto, ocorre uma série de alterações na capacidade morfogênica dos tecidos (2), e Bonga e Hackett (1987) citados por GRATTAPAGLIA e MACHADO (2) afirmam que tais processos de envelhecimento dos tecidos são complexos e ainda pouco compreendidos.

No entanto, para promover o rejuvenescimento, podem ser adotadas práticas culturais, como podas drásticas e sucessivas em plantas adultas (1). Tal prática foi, então, adotada no presente trabalho, com intuito de se obterem melhores resultados no desenvolvimento dos explantes provenientes das plantas adultas.

No presente caso, também pode-se observar que os explantes desenvolveram-se satisfatoriamente apenas quando submetidos aos meios 1, 2, 3 e 4 (meios de MS "meia força", suplementados com 10 μ M de zeatina; 10 μ M de zeatina + 0,05 μ M de AIA; 10 μ M de zeatina + 0,10 μ M de AIA e, 10 μ M de zeatina + 0,20 μ M de AIA, respectivamente) (Figuras 2A, B e C). Nos outros meios não houve desenvolvimento algum ou apenas calejamento, já na fase de estabelecimento.

Apenas explantes provenientes de gemas laterais chegaram até a segunda repicagem, que ocorreu em aproximadamente 50 dias após a inoculação. No entanto, o maior número de brotações secundárias (Figura 1H) ocorreu em segmentos de caule provenientes de gemas apicais, assim como maior número de folhas/explante (Quadro 1). Explantes de gemas apicais desenvolveram-se, mas após a primeira repicagem não houve mais desenvolvimento e os explantes provenientes desta repicagem oxidaram (Figura 1B) e foram descartados. GRATTAPAGLIA e MACHADO (2) afirmam que a utilização de fitorreguladores no meio de cultura, após o isolamento do explante da planta-matriz pode estimular respostas indesejáveis. No entanto, no presente trabalho, quando não se utilizou nenhum fitorregulador no meio de estabelecimento (meio 8), os explantes oxidaram (Figura 1B) e morreram em torno de duas semanas após a inoculação.

Aproximadamente 50 dias após a inoculação, segmentos de caule desenvolvidos foram multiplicados pela repicagem. Cerca de 67 dias após a primeira repicagem, explantes que se desenvolveram novamente em segmentos de caule, neste caso, os provenientes de gemas laterais, foram novamente repicados.

Obteve-se taxa média de multiplicação de 1:2,82 e 1:3,18 para explantes submetidos a primeira e segunda repicagens, respectivamente, demonstrando que a taxa de multiplicação aumenta com as sucessivas repicagens. Esse aumento deveu-se ao maior alongamento dos segmentos de caule, já que praticamente não houve desenvolvimento de brotações secundárias após a segunda repicagem.

No momento das multiplicações, realizaram-se várias avaliações, como altura dos segmentos de caule, número de folhas e número de brotações secundárias/segmento de caule.

De acordo com as Figuras 2A, B e C, pode-se observar que os melhores meios para o desenvolvimento dos segmentos de caule foram 2, 3 e 4, para gemas apicais, e apenas o meio 1, para gemas laterais.

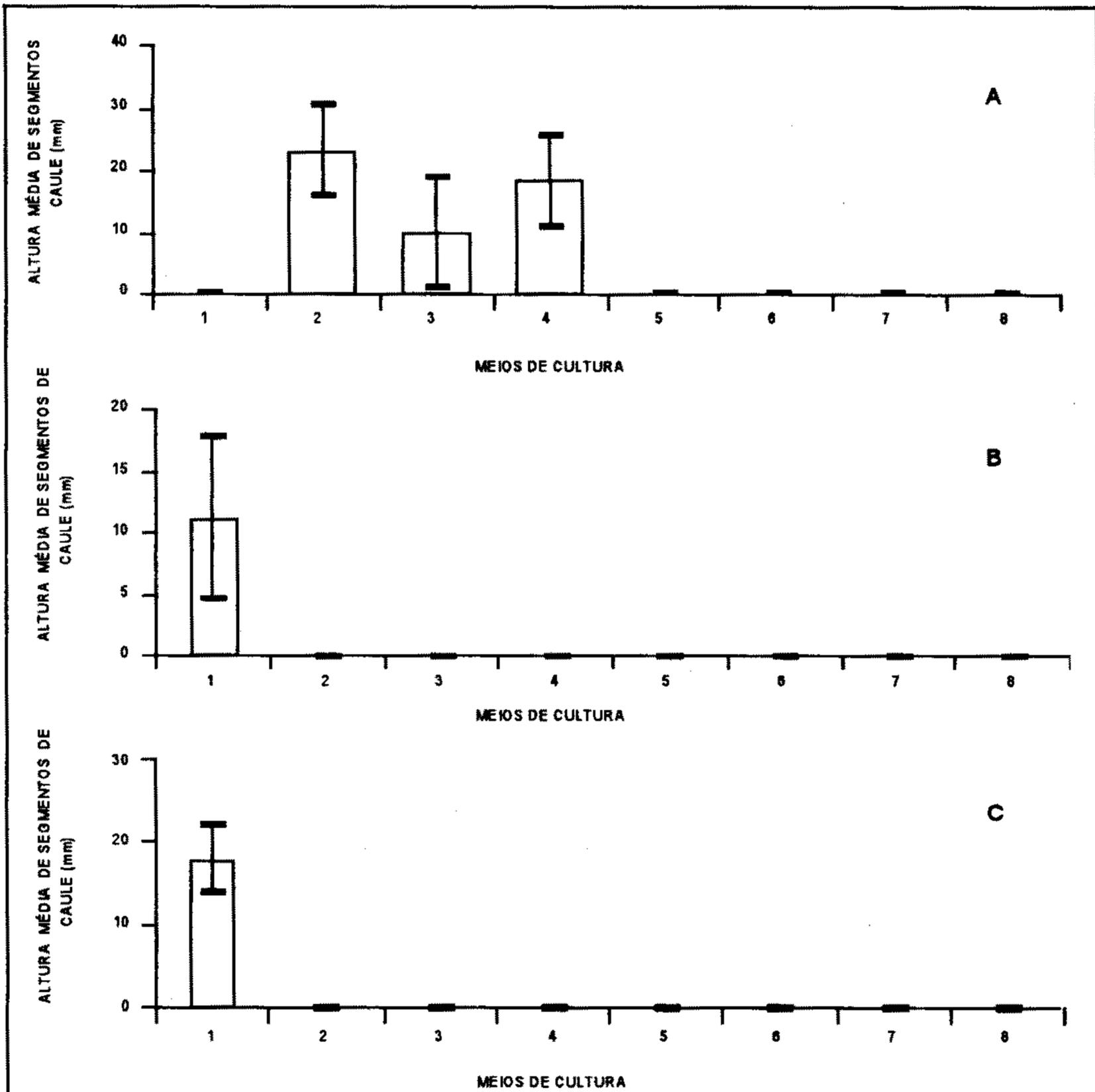


FIGURA 2 - Altura média de segmentos de caule provenientes de gemas apicais (A) e laterais (B) no momento da primeira repicagem, e de gemas laterais (C) no momento da segunda repicagem, em função dos oito meios de cultura. As barras em cada coluna representam os respectivos desvios-padrão.

A combinação do meio com o tipo de explante parece influenciar no desenvolvimento ou não dos explantes, ou seja, meios que continham zeatina sempre foram superiores aos demais testados.

Após a primeira repicagem, explantes de gemas apicais não se desenvolveram em nenhum dos meios testados, porém foram estes que tiveram, em geral, o melhor desempenho em termos de altura (Figura 1A).

De acordo com o Quadro 1, brotações secundárias foram emitidas por explantes provenientes de gemas apicais, submetidos aos meios 2, 3 e 4, que chegaram até a primeira repicagem. Explantes provenientes de gemas laterais, submetidos ao meio 1 (MS "meia força" + 10 μ M de zeatina), que chegaram até a segunda repicagem, também emitiram brotações secundárias. Nos demais meios (5, 6, 7 e 8) não houve emissão de brotações primárias e, conseqüentemente, de secundárias.

QUADRO 1 - Médias (\bar{X}) e desvios-padrão (s) do número de brotações secundárias (NBS) e do número de folhas de segmentos de caule, provenientes de gemas apicais (GA) e de gemas laterais (GL), no momento da primeira e segunda repicagens, em função dos meios de cultura								
Meios	\bar{X} / s	NBS		Nº de Folhas				
		GA	GL	GA		GL		
		1ª rep.	2ª rep.	1ª rep.	2ª rep.	1ª rep.	2ª rep.	
1	\bar{X}	0	0,90	0	0	6,60	8,75	
	s	0	0,87	0	0	3,72	2,76	
2	\bar{X}	0,60	0	11,20	0	0	0	
	s	0,54	0	1,79	0	0	0	
3	\bar{X}	0,57	0	6,21	0	0	0	
	s	0,75	0	4,04	0	0	0	
4	\bar{X}	0,20	0	0	0	0	0	
	s	0,44	0	0	0	0	0	
5	\bar{X}	0	0	0	0	0	0	
	s	0	0	0	0	0	0	
6	\bar{X}	0	0	0	0	0	0	
	s	0	0	0	0	0	0	
7	\bar{X}	0	0	0	0	0	0	
	s	0	0	0	0	0	0	
8	\bar{X}	0	0	0	0	0	0	
	s	0	0	0	0	0	0	

No Quadro 1, observa-se que o NF, em média, foi maior em segmentos de caules provenientes de gemas apicais, até o momento da primeira repicagem. No momento da segunda repicagem, haviam se desenvolvido apenas segmentos de caules provenientes de explantes de gemas laterais e, a média do NF nestes explantes foi superior ao mesmo tipo de explante no momento da primeira repicagem.

Também no Quadro 1, observa-se que o número de folhas, em média, foi maior em segmentos de caules provenientes de gemas apicais, até o momento da primeira repicagem. No momento da segunda, haviam se desenvolvido apenas segmentos de caule provenientes de explantes de gemas laterais, e a média do número de folhas nestes explantes foi superior ao mesmo tipo de explante no momento da primeira repicagem.

Os explantes submetidos a 0,20 μM de AIB e ausência de luz, visando a indução de raízes, apenas calejaram ou emitiram poucas raízes, mas não desenvolveram parte aérea.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de obter uma metodologia de micropropagação do caquizeiro (*Diospyros kaki* L.), utilizaram-se como explantes gemas apicais e laterais de plantas adultas do cultivar Giombo. As gemas foram cultivadas em meio MS “meia força” (concentração de sais reduzida a 50%), acrescido de oito diferentes combinações de fitorreguladores, a saber, 10 μM de zeatina (meio 1); 10 μM de zeatina + 0,05 μM de AIA (meio 2); 10 μM de zeatina + 0,10 μM de AIA (meio 3); 10 μM de zeatina + 0,20 μM de AIA (meio 4); 10 μM de zeatina + 0,40 μM de AIA (meio 5); 10 μM de zeatina + 0,10 μM de ANA (meio 6); 0,10 μM de Cinetina (meio 7); e MS “meia força” (meio 8). Após a inoculação das gemas nos oito meios de cultura, observou-se visualmente o desenvolvimento dos explantes. Aqueles que se desenvolveram em segmentos de caule foram submetidos às repicagens; 50% dos explantes provenientes destas foram inoculados no mesmo meio, renovado, nas condições de luz e temperatura em que se encontravam anteriormente. Os outros 50% foram então submetidos ao meio MS “meia força”, acrescido de 0,20 μM de AIB, e mantidos por 16 dias em ausência de luz. Após esse período, foram submetidos às condições de luz e temperatura em que se encontravam os outros explantes, na tentativa de se induzir enraizamento. Os explantes foram submetidos a até duas repicagens. As taxas de multiplicação foram de 1:2,82 e 1:3,18, em média, para explantes que chegaram até a primeira e segunda repicagens, respectivamente. Praticamente não ocorreu desenvolvimento de brotações

secundárias após a segunda repicagem. Nos meios 5, 6, 7 e 8 não ocorreu desenvolvimento de segmentos de caule, ou seja, os explantes apenas calejaram e, ou, oxidaram. O melhor tipo de explante, de modo geral, foram gemas laterais. Explantes submetidos a 0,20 μM de AIB e ausência de luz apenas calejaram ou emitiram raízes, mas não emitiram parte aérea.

5. SUMMARY

(MICROPROPAGATION OF PERSIMMON (*Diospyros kaki* L.) FROM THE AXILLARY AND APICAL BUDS OF ADULT PLANTS)

The objective of this work was to improve a methodology to micropropagate the persimmon tree (*Diospyros kaki* L.) from axillary and apical buds of adult cultivar Giombo. These buds were cultivated in MS "half strength" medium (salt concentrations reduced to 50% from the original concentration), added to eight growth regulators as follows: 10 μM of zeatin (medium 1); 10 μM of zeatin + 0.05 μM of IAA (medium 2); 10 μM of zeatin + 0.10 μM of IAA (medium 3); 10 μM of zeatin + 0.20 μM of IAA (medium 4); 10 μM of zeatin + 0.40 μM of IAA (medium 5); 10 μM of zeatin + 0.10 μM of NAA (medium 6); 0.10 μM of kinetin (medium 7); and MS "half strength" (medium 8). Fifty percent of the explants obtained in each passage were subcultivated in the same medium. The other fifty percent were transferred to MS medium added to 0.20 μM of IBA for rooting, and kept for 16 days in the dark. After that period, they were submitted to the light and temperature conditions of the other explants. The explants were submitted to up to two subcultivations. The multiplication rates were 1:2.82 and 1:3.18, on the average, for explants submitted to the first and the second subcultivation, respectively. Explants introduced in MS medium or MS medium added to kinetin did not develop shoots, only forming callus. The best kind of explant for development was found in the medium with zeatin or zeatin + IAA. The MS medium added to 0.20 μM of IBA and kept in the dark for rooting developed roots or callus but did not develop shoots.

6. LITERATURA CITADA

1. CALDAS, L.S., HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (Eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-70.

2. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (Eds.) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP/ EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99- 169.
3. HOMNAVA, A., PAYNE, J., KOEHLER, P. & GITENMILLER, R. Provitamin A (alfa-carotene, beta-carotene and beta-cryptoxanthin) and ascorbic acid content of American persimmons. *Journal of Food Quality*, 13: 85-89, 1990.
4. KITAGAWA, H. & GLUCINA, P.G. *Persimmon: Culture in New Zealand*. Wellington, DSIR - Science Information Publishing Centre, 1984. 74p.
5. MARTINS, F.P. & PEREIRA, F.M. *Cultura do caquizeiro*. Jaboticabal, FUNEP, 1989. 71p.
6. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
7. OTONI, W.C. *Estudos de propagação "in vitro" de Citrus sinensis L. Osb. cv. Pera, a partir da cultura de segmentos nodais juvenis*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1988. 108 p. (Tese de MS).
8. RUBBO, M.S. *Estudo do enraizamento de estacas de caquizeiro (Diospyros kaki L.)*. Piracicaba, ESALQ, 1989. 90p. (Tese de MS).
9. SANTOS, A.M. *Estudos de propagação de seringueira (Hevea spp.)*. Viçosa, UFV, 1986. 47p. (Tese de MS).
10. SIMÃO, S. Caqui: um ótimo fruto. *O Estado de São Paulo*, 25 fev., 1970. Suplemento agrícola, p.14.
11. SUGIURA, A., RYUTARO, T., MURAYAMA, H. & TOMANA, T. "In vitro" propagation of Japanese persimmon. *HortScience*, 21: 1205-1207, 1986.
12. TAO, R., ITO, J. & SUGIURA, A. Comparison of growth and rooting characteristics of micropropagation adult plants and juvenile seedlings of persimmon (*Diospyros kaki L.*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 63:537-541, 1994.
13. TAO, R.; MURAYAMA, H.; MORIGUCHI, K. & SUGIURA, A. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. *HortScience*, 23: 1055-1056, 1988.
14. YOKOYAMA, T. & TAKEUCHI, M. Organ and plantlet formation from callus in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). *Phytomorphology*, 26: 273-275, 1976.