

## COMUNICAÇÃO

### ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO DO CAQUIZEIRO (*Diospyrus kaki* L.)

Rooting *in vitro* and acclimatization in greenhouse of japanese persimmon (*Diospyrus kaki* L.)

Charles Allan Telles<sup>1</sup>, Luiz Antonio Biasi<sup>2</sup>

#### RESUMO

Este trabalho foi conduzido visando a superar as dificuldades de obtenção de mudas de caqui (*Diospyrus kaki* L.), estudando o enraizamento e aclimatização de plantas provenientes da cultura de tecidos, fases crítica na micropropagação de plantas, por ser difícil o estabelecimento de um protocolo ideal. Foram utilizados segmentos nodais com mais de 1 cm de altura e 2 folhas expandidas, provenientes da organogênese direta, a partir de segmentos radiculares. Testaram-se dois tempos de permanência (5 e 10 dias), em meio de cultura MS com ½ NO<sub>3</sub> suplementado com ácido indolbutírico (AIB) em duas concentrações (50 e 100 µM). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições e 12 explantes por parcela. Na aclimatização, as plantas foram acondicionadas em copo plástico com substrato Plantmax®, cobertos ou não com copo plástico transparente e mantidos em câmara de nebulização com irrigação intermitente durante 40 dias. Os resultados obtidos no enraizamento não diferiram significativamente, obtendo-se até 75% de brotações enraizadas. Na aclimatização, as plantas sem cobertura com copo plástico transparente apresentaram maior sobrevivência, atingindo 47,3%.

**Termos para indexação:** micropropagação, AIB, sobrevivência de mudas, fruticultura, *Diospyrus kaki* L.

#### ABSTRACT

This work aimed at surpassing the difficulties of attainment of seedlings studying the rooting and acclimatization of plants from tissue culture, these steps very critic in micropropagation of plants, to be difficult the protocol ideal establishment. It were used nodes segments with one cm of height with 2 leaves from direct organogenesis though root segments. Two times of permanence were tested (5 and 10 days), in MS culture com ½ NO<sub>3</sub> supplemented with AIB in two concentrations (50 and 100 µM). The experimental design used was entirely randomized, with 4 repetitions and 12 explants per plot. In the acclimatization the plants were conditioned in plastic glass with Plantmax® substratum, with and without covering of the plants with transparent plastic glass, in chamber mist with intermittent irrigation during 40 days after. The results obtained in the rooting did not significantly differ, obtained until 75% of rooted buds. In the acclimatization, the plants which were not covered with transparent plastic glass presented greater survival, reaching 47,3%.

**Index terms:** micropropagation, IBA, survival of seedlings, fruit production, *Diospyrus kaki* L.

(Recebido para publicação 27 de abril de 2004 e aprovado em 3 de novembro de 2004)

A fruticultura brasileira apresentou uma produção de 33 milhões de toneladas de frutas no ano 2002, gerando US\$ 11 bilhões do PIB agrícola. A cadeia produtiva das frutas abrange 2 milhões de hectares e gera 4 milhões de empregos diretos, sendo meta do governo para o setor agrícola nos próximos dois anos crescer 25 % (IBRAF, 2002).

A inserção do Estado do Paraná na fruticultura brasileira também ocorre pelo cultivo do caqui (*Diospyrus kaki* L.), sendo o terceiro maior produtor nacional de caquis, tendo contribuído com 13,56% das 113.308 toneladas de frutos produzidos no ano de 2000, produção essa geradora de uma arrecadação agrícola de R\$ 47,8 milhões. A produção paranaense

de caquis é apenas superada pelos Estados de São Paulo (58,39%) e Rio Grande do Sul (16,99%) (IBGE, 2002).

O caqui é propagado usualmente pela enxertia por garfagem ou borbúlia sobre porta-enxertos oriundos de sementes (MARTINS & PEREIRA, 1989). Os porta-enxertos mais utilizados pertencem à própria espécie *Diospyrus kaki* L. e às espécies *Diospyrus virginiana* Lour. e *Diospyrus lotus*. Entretanto, a obtenção de porta-enxertos a partir de sementes causa grande desuniformidade quanto ao porte e vigor das plantas, além de a enxertia ser um processo demorado, oneroso e com baixas taxas de pagamento. Soma-se a isso o fato de que a estaquia

1. Engenheiro Agrônomo, Aluno do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal – Universidade Federal do Paraná/UFPR – Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê – Caixa Postal 19061 – 80035-050 – Curitiba, PR – Bolsista da CAPES – charles.allan@bol.com.br

2. Professor Dr. Adjunto do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo – Setor de Ciências Agrárias/UFPR – Caixa Postal 19.061 – 81531-990 – Curitiba, PR – Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq – biasi@ufpr.br

tanto lenhosa quanto herbácea não pode ser aplicada devido à dificuldade de enraizamento das estacas (BIASI et al., 2002; COOPER & COHEN, 1984; FUKUI et al., 1992; RUBBO, 1989; TAO & SUGIURA, 1992).

A solução para esse problema requer avanços na pesquisa, de forma a estabelecer uma tecnologia de propagação vegetativa para a formação direta das mudas ou de porta-enxertos, o que representará um significativo avanço na cultura do caquizeiro (MARTINS & PEREIRA, 1989).

Métodos para a micropropagação têm sido desenvolvidos; todavia, sua aplicação para a produção comercial de mudas tem sido limitada porque as microestacas de caquizeiro geralmente são difíceis de enraizar (TAO & SUGIURA, 1992).

Pesquisas recentes com o caquizeiro no Brasil demonstraram que as técnicas de cultura de tecidos *in vitro* apresentaram resultados bastante promissores para a clonagem da espécie (BIASI et al., 1999; SALOMÃO et al., 2000). A clonagem poderá se tornar viável após o melhor entendimento e controle da morfogênese do caquizeiro.

Com este trabalho, visou a estudar o potencial de enraizamento *in vitro* do caquizeiro e a forma de aclimatização, oferecendo subsídios para se obter mudas de boa qualidade e em larga escala.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas e na câmara de nebulização intermitente do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no período de 2002 a 2003.

Para o enraizamento *in vitro*, foram utilizados segmentos nodais com tamanho médio de 1,5 cm e com pelo menos 2 folhas expandidas, provenientes do subcultivo das brotações oriundas da organogênese direta de segmentos radiculares, as quais estavam sendo cultivados em meio MS  $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub> suplementados com 5  $\mu$ M de zeatina.

Foram testados os tempos de permanência (5 e 10 dias) em meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub> adicionando AIB (50 e 100  $\mu$ M) e, após inoculados, os explantes foram transferidos para meio MS  $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub> sem reguladores de crescimento e com 1 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, conforme utilizado por Biasi et al. (1994) para o abacateiro.

Os explantes foram acondicionados em frascos de vidro transparente de 250 mL com 30 mL de meio basal. A sala de crescimento possuía fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 25  $\mu$ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e temperatura de 25  $\pm$  2°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial (2 x 2) com 4 repetições e 12 explantes por parcela.

O experimento foi avaliado 28 dias após a instalação, observando-se as seguintes variáveis: número de explantes enraizados, número de raízes emitidas por explante e comprimento médio das raízes.

As plantas enraizadas foram submetidas a um teste de aclimatização em casa-de-vegetação, para verificar a porcentagem de sobrevivência das mudas micropropagadas. Os tratamentos foram os seguintes: plantas acondicionadas em copo plástico de 250 ml com substrato Plantmax®, cobertos com um copo plástico transparente de 300 ml; plantas acondicionadas em apenas copo plástico de 250 ml com substrato Plantmax® sem cobertura.

As plantas foram mantidas em câmara de nebulização intermitente, com 2 minutos de irrigação em intervalos de rega de 30 minutos controladas por um temporizador, sobre uma bancada perfurada, sem nenhuma cobertura (sombrite) acima dos copos.

A avaliação foi após 40 dias de instalação, observando a porcentagem de sobrevivência.

Não houve interação significativa entre o tempo de permanência no meio de cultura com AIB e as suas concentrações testadas, tampouco efeito, significativo desses fatores para as três variáveis analisadas (TABELA 1).

A exposição dos explantes em período curto de tempo (5 dias) em meio com auxina já foi suficiente para estimular o enraizamento. A menor concentração de AIB (50  $\mu$ M), proporcionou a obtenção de 72,49% de brotações enraizadas.

Em experimentos já realizados por Carvalho (2003), também trabalhando com explantes juvenis, verificou-se que o caquizeiro cultivado *in vitro* obteve um enraizamento de 66%, com uma emissão média de 4,7 raízes por brotação, na concentração de 10  $\mu$ M de AIB, porém, sem diferença significativa entre os tempos de permanência no meio. Isso leva a crer que o potencial de enraizamento do caquizeiro pode estar associado à retenção da juvenildade dos explantes (TETSUMURA & YUKINAGA, 1996).

Auxinas geralmente estimulam a formação de raízes em estacas, sugerindo que o alto grau de enraizamento em estacas juvenis é devido à elevada concentração de níveis endógenos desse fitorregulador que as estacas juvenis tipicamente contêm, ou devido à grande sensibilidade nesses tecidos à aplicação exógena (ARTECA, 1995).

A obtenção de mais de 70% das brotações enraizadas, com mais de 2 raízes por broto, possuindo comprimento médio superior a 3 cm, pode ser considerada um ótimo resultado, diante da grande dificuldade que o caquizeiro apresenta para formar raízes adventícias em estacas (FUKUI et al., 1992; RUBBO, 1989; TAO & SUGIURA, 1992).

As mudas de caquizeiro mostraram-se muito sensíveis à transferência para o ambiente *ex vitro*, apresentando uma porcentagem de sobrevivência inferior a 50% (TABELA 2). Porém, não foi possível realizar uma análise estatística devido ao alto índice de mortalidade, o que ocasionou uma redução do número de plântulas.

Foi possível constatar que as plantas sem a cobertura com copo plástico transparente obtiveram maior porcentagem de sobrevivência, e as que foram aclimatizadas numa espécie de microestufa, com a cobertura

com copo plástico transparente, a sobrevivência foi baixa (TABELA 2). Isso pode ter ocorrido devido à elevação da temperatura dentro do copo, causando a morte das mudas e favorecendo o desenvolvimento de fungos no substrato.

O enraizamento das brotações de caquizeiro *in vitro* podem ser obtidas com 5 dias de permanência no meio MS  $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub>, suplementados com 50 $\mu$ M de AIB.

Na aclimatização, não se recomenda a cobertura das mudas com copo plástico transparente.

**TABELA 1** – Porcentagem de explantes enraizados, número médio de raízes por explante e comprimento médio das raízes das brotações de caquizeiro cultivados em meio de cultura MS  $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub> com 50 e 100 $\mu$ M de AIB, em dois tempos de permanência (5 e 10 dias) no meio. UFPR, Curitiba-PR 2002.

Tempo de permanência no meio com AIB	Explantes enraizados (%)	Número médio de raízes por explante	Comprimento médio das raízes (cm)
5 dias	75,00 <sup>ns</sup>	2,65 <sup>ns</sup>	3,78 <sup>ns</sup>
10 dias	70,84	2,49	3,09
Concentração			
50 $\mu$ M	72,49 <sup>ns</sup>	2,24 <sup>ns</sup>	3,70 <sup>ns</sup>
100 $\mu$ M	72,35	2,90	3,18
C.V.(%)	29,07	29,48	12,17

<sup>ns</sup> Não-significativo, médias observadas pelo teste F da análise de variância.

**TABELA 2** – Porcentagem de sobrevivência de plantas de caquizeiro provenientes do enraizamento *in vitro* induzido com duas concentrações de AIB (50 e 100 $\mu$ M), submetidas à aclimatização com e sem cobertura com copo plástico transparente, após 40 dias, sob nebulização intermitente em casa-de-vegetação. UFPR, Curitiba-PR, 2003.

Tipo de Aclimatização	AIB ( $\mu$ M)	Número de plantas	Número de plantas vivas	Sobrevivência (%)
Com cobertura	50 $\mu$ M	42	4	9,5
	100 $\mu$ M	44	1	2,3
Sem cobertura	50 $\mu$ M	45	22	48,9
	100 $\mu$ M	46	21	45,7

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. Pennsylvania: Chapman & Hall, 1995. 332 p.
- BIASI, L. A. et al. Estabelecimento *in vitro* do caqui 'Fuyu' por meio de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 279-283, 1999.
- BIASI, L. A. et al. Potencial organogênico de tecidos caulinares e radiculares de caqui. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 29-34, 2002.
- BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KAMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 7, p. 1051-1058, 1994.
- CARVALHO, D. C. **Organogênese e embriogênese somática do caqui**. 2003. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- COOPER, P. A.; COHEN, D. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, [S.l.], v. 34, p. 118-124, 1984.
- FUKUI, H.; NISHIMOTO, K.; NAKAMURA, M. Varietal differences in rooting ability on *In vitro* subcultures Japanese persimmon shoots. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 60, n. 4, p. 821-825, 1992.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Bancos de dados sobre fruticultura**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 15 dez. 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dados estatísticos**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jan. 2002.
- MARTINS, F. P.; PEREIRA, F. M. **Cultura do caqui**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 71 p.
- RUBBO, M. S. **Estudo do enraizamento de estacas de caqui (*Diospyros kaki* L.)**. 1989. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.
- SALOMÃO, L. C. C. et al. Micropropagação de caqui 'Cereja' por meio de gemas apicais e laterais de plantas juvenis e adultas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 22, n. 1, p. 66-71, 2000.
- TAO, R.; SUGIURA, A. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation II**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 18, cap. 11, p. 423-440.
- TETSUMURA, T.; YUKINAGA, H. High-frequency shoot regeneration from roots of Japanese persimmon. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 3, p. 463-464, 1996.