

Propagação vegetativa do diospiro: estacaria e cultura de tecidos *in vitro*

Mariana Lobo Borralho Quadrado

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadora: Mariana da Silva Gomes Mota

Júri:

Presidente: Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Mariana Augusta Casadinho Parrinha Duarte Regato, Professora coordenadora da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Resumo

O diospireiro (*Diospyros kaki* L.) pertence à família *Ebenaceae* e é uma espécie originária da China. Existem dois tipos de diospiro – o diospiro mole com casca avermelhada, e o diospiro de roer com casca mais clara, ambos a serem recentemente mais procurados pelos consumidores.

O diospireiro é de difícil propagação e os frutos das variedades cultivadas apresentam poucas sementes, sendo este fator bastante limitante dos níveis de disseminação e de produção desta cultura. Assim, e dado o contexto atual de maior procura, é necessário desenvolver métodos de propagação eficientes e alternativos à propagação seminal, de modo a aumentar a eficiência de propagação desta espécie. Neste seguimento surge o interesse de otimizar os métodos de propagação vegetativa. Neste estudo abordaram-se a propagação *in vivo* por estacas lenhosas e a propagação por cultura de tecidos *in vitro* num genótipo de diospiro mole, recorrendo a gomos dormentes. Nos ensaios de estacas testou-se o efeito do ácido 3-indolbutírico (IBA) como regulador de crescimento a 3000 e a 6000 mg/L para o enraizamento e diferentes tempos de imersão na solução de IBA (5 a 20 segundos). Nos ensaios de micropropagação, testaram-se vários protocolos de desinfecção e duas citocininas no meio de instalação e multiplicação, a benziladenina e a zeatina. Testou-se também o efeito do IBA como indutor do enraizamento *in vitro*. Os resultados obtidos nos ensaios de estacas revelaram que o protocolo testado não foi eficaz, não se tendo conseguido qualquer estaca enraizada. Os ensaios de micropropagação apontaram para que a desinfecção com NaDCC, mancozebe e Tween 20 foi mais eficaz, permitindo percentagens de gomos sem contaminações superiores a 60%, e que o meio com zeatina foi mais eficaz no crescimento e multiplicação dos gomos e rebentos instalados, permitindo uma taxa de multiplicação de 80-100% em cerca de 45-60 dias.

PALAVRAS CHAVE (5): *Diospyros kaki* L., propagação por estaca, micropropagação, zeatina, IBA

Abstract

Persimmon (*Diospyros kaki* L.) belongs to the *Ebenaceae* family and it comes originally from China. There are two types of persimmon – soft persimmon with reddish skin, and gnawing persimmon with lighter skin, recently both of them are more and more requested by consumers.

Persimmon is difficult to propagate and the fruits of the most important cultivars have few seeds, which is a strong limiting factor towards the increase of the production levels of this crop. In frame with the current context of greater demand, it is necessary to develop efficient and alternative propagation methods to seed propagation, in order to increase the propagation efficiency of this crop. Thus, there is a strong interest in optimizing the methods of vegetative propagation. This study addressed *in vivo* propagation by hardwood cuttings and *in vitro* tissue culture propagation in a soft persimmon genotype, using dormant buds. In the cuttings' assays, the effect of indolbutyric acid (IBA) as a growth regulator for rooting was tested at 3000 and 6000 mg/L with different immersion times in the IBA solution (5 to 20 seconds). In the micropropagation assays several disinfection protocols were tested, as well as two cytokinins in the installation and multiplication medium, benzyladenine and zeatin. The effect of IBA as an inducer of *in vitro* rooting was also tested. The results obtained in the experiments of cuttings revealed that the tested protocol was not effective as rooting did not occur in the cuttings.

Micropropagation tests showed that disinfection with NaDCC, mancozeb and Tween20 was more effective, allowing percentages of buds without contamination higher than 60%, and that the culture medium with zeatin was more effective in the growth and multiplication of buds and installed shoots, allowing a multiplication rate of 80-100% in about 45-60 days.

KEYWORDS (5): *Diospyros kaki* L., cuttings, micropropagation, zeatin, IBA

Índice

Índice	v
Índice de figuras	vi
Índice de quadros	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do tema.....	1
1.2. Objetivos do estudo.....	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. A planta do diospireiro.....	2
2.2. A cultura do diospireiro.....	4
2.2.1. Produção mundial e comercialização no mercado nacional e internacional	4
2.2.2. Estados fenológicos.....	5
2.3. Métodos de propagação.....	5
2.3.1. Substratos e meios de cultivo e propagação <i>in vivo</i>	6
2.3.2. Propagação por enxertia	7
2.3.3. Propagação por estacaria	9
2.3.4. Propagação por cultura de tecidos <i>in vitro</i>	11
3. Materiais e métodos	18
3.1. Ensaio de enraizamento de estacas	18
3.2. Ensaio de cultura de tecidos <i>in vitro</i>	19
3.2.1. Preparação dos meios de cultura	19
3.2.2. Esterilização dos materiais	21
3.2.3. Preparação do material vegetal.....	21
3.2.4. Desinfecção dos gomos.....	21
3.2.5. Instalação dos gomos.....	23
3.2.6. Enraizamento de rebentos.....	24
3.2.7. Instalação dos gomos no meio de enraizamento	25
4. Resultados e discussão	26
4.1. Ensaio de estacas	26
4.2. Ensaio de micropropagação	27
5. Conclusões	33
6. Referências bibliográficas	35

Índice de figuras

Figura 1. <i>Diospyros kaki</i> L. antes da época de colheita (utad, jardim botânico).....	2
Figura 2. Flor de <i>Diospyros kaki</i> L. (utad, jardim botânico).....	2
Figura 3. Frutos de <i>Diospyros kaki</i> L. de roer (utad, jardim botânico).	3
Figura 4. Fruto de <i>Diospyros kaki</i> L. mole (Regato <i>et al.</i> , 2013).....	3
Figura 5. Estados fenológicos do <i>Diospyros kaki</i> L. (Regato <i>et al.</i> , 2013).	5
Figura 6. Etapas da enxertia em garfagem simples do <i>Diospyros kaki</i> L.....	8
Figura 7. Enxerto e porta-enxerto de <i>Diospyros kaki</i> L.	9
Figura 8. Estacas de <i>Diospyros kaki</i> L.	10
Figura 9. Estacas de <i>Diospyros kaki</i> L. mergulhadas numa solução com reguladores de crescimento.	11
Figura 10. Micropropagação de <i>Diospyros kaki</i> “Jiro”.	17
Figura 11. Crescimento de gomos de <i>Diospyros kaki</i> L.; (a) amostra 1; (b) amostra 2; (c) amostra 3 (Wardani, 2019).	17
Figura 12. Estacas de <i>Diospyros kaki</i> L.	18
Figura 13. (1) Solução de desinfecção com pinça. (2) Desinfecção das estacas de <i>Diospyros kaki</i> L. ...	18
Figura 14. Tabuleiros de propagadores com as estacas do 1º ensaio na estufa.	19
Figura 15. (1) Meio de cultura MS; (2) Tubos de vidro com meio de cultura na câmara de fluxo laminar.....	20
Figura 16. (1) Métodos de desinfecção inicial: com e sem fungicida; (2) Métodos de desinfecção: M1, M2, M3, M4 e M5.....	23
Figura 17. (1) Material para a instalação dos gomos na câmara de fluxo laminar; (2) Gomos instalados em caixas de Petri; (3) Gomos instalados em tubos de vidro.....	24
Figura 18. Placas de Petri com os meios de enraizamento.....	25
Figura 19. (1) e (2) Caixa para simular as condições sem luminosidade; (3) Caixas de Petri com os gomos instalados em meio de enraizamento.	25
Figura 20. (1) Estacas mergulhadas em 3000 mg/L de IBA durante 20 segundos; (2) estacas mergulhadas em 6000mg/L de IBA durante 20 segundos.....	26
Figura 21. Observações das estacas realizadas no 1º ensaio.	26
Figura 22. Estacas de um material vegetal mais herbáceo, utilizadas no 2º ensaio.	27
Figura 23. Caixas de Petri com os gomos sem fungicida.....	27
Figura 24. Caixas de Petri com os gomos com fungicida.	28
Figura 25. Contagem dos gomos contaminados e não contaminados a dia 02 de maio de 2022.	28
Figura 26. Percentagem de gomos não contaminados para cada método de desinfecção.....	30

Figura 27. Gomos instalados em meio MS modificado com zeatina.	30
Figura 28. Taxa de abrolhamentos no meio de cultura MS modificado com zeatina.	31
Figura 29. Evolução dos gomos/rebentos instalados a 13 de julho de 2022, com os métodos de desinfecção M1 e M4.	31
Figura 30. Evolução dos gomos/rebentos instalados a 21 de julho de 2022, com os métodos M1 e M4.	32
Figura 31. Evolução dos gomos/rebentos instalados a 14 de julho de 2022, com os métodos de desinfecção M2, M3 e M5.	32
Figura 32. Alguns dos gomos mais desenvolvidos utilizados para avaliar a capacidade de multiplicação.	33

Índice de quadros

Quadro 1. Produção mundial do <i>Diospyros kaki</i> L. (Regato <i>et al</i> , 2013) Erro! Marcador não definido.	
Quadro 2. Reguladores de crescimento associados às técnicas de cultura in vitro e respectivas funções (AIA: ácido indolacético, AIB: ácido indolbutírico, ANA: ácido naftalenoacético, 2, 4-D: ácido 2, 4-diclorofenoxiacético, Z: zeatina, 2iP: 2-isopentenyladenina, DHZ: dihidrozeatina, BAP: 6-benzilaminopurina, TDZ: tidiazurão, KIN: cinetina, GA3: ácido giberélico.).....	11
Quadro 3. Concentrações dos componentes para cada meio de cultura.....	20
Quadro 4. Procedimentos de cada método de desinfecção.	21
Quadro 5. Composição base dos meios de cultura para o enraizamento.	24
Quadro 6. Variações do meio MS modificado para indução de raízes.	25
Quadro 7. Observações dos ensaios preliminares feitos em caixas de Petri.	28
Quadro 8. Observações dos gomos instalados em meio MS com BA.	29

Lista de abreviaturas

INE – Instituto Nacional de Estatística

IBA – ácido 3-indolbutírico

Meio MS – Murashige & Skoog

Meio B5 – Meio de Gamborg

Meio SH – Schenk e Hildebrandt

Meio WPM – Wood Plant Medium

BAP – 6-benzilaminopurina

Meio MS Modif – Meio Murashige & Skog modificado

NaDCC – Dicloroisocianurato sódio

PVP – polivinilpirrolidona

ppm – partes por milhão

AIA – ácido 3-indolacético

ANA – ácido naftalenoacético

2, 4-D – ácido 2, 4-diclorofenoxiacético

Z – zeatina

2iP – 2-isopentenyladenina

DHZ - dihidrozeatina

TDZ – tiazurão

KIN – cinetina

GA3 – ácido giberélico

1. Introdução

1.1. Enquadramento do tema

O presente estudo pretende aplicar dois métodos de propagação vegetativa à planta do diospireiro (*Diospyros kaki* L.) – o método de propagação por estacaria e a propagação por cultura de tecidos *in vitro* – de modo a avaliar as respetivas eficiências e sua reprodutibilidade/capacidade de implementação no sector produtivo.

Este tema surge no âmbito da dificuldade de propagação que esta espécie apresenta. Sendo uma fruteira, a sua forma preferencial de propagação para instalação de pomares é a propagação vegetativa, por estaca ou por enxertia. No âmbito da produção de porta-enxertos, teria interesse a propagação seminal, mas tendo esta espécie com reduzido número de sementes no fruto e que não se propaga muito facilmente no campo, acaba por ser também primordial a propagação vegetativa no campo do viveirismo, tornando de todo o interesse desenvolver um método de propagação que apresente elevada eficiência.

Tem-se verificado um aumento da procura e do consumo de diospiro, o que pode ser justificado pela sua importância em termos nutricionais e pelos benefícios que este tem para a saúde humana. Este fruto consiste numa boa fonte de vitaminas C, B e A (rico em carotenoides), com 80% da sua constituição em água, e apresenta teores elevados em fibras solúveis (pectinas e mucilagens), potássio, cálcio, fósforo e magnésio. Estes constituintes atribuem-lhe um poder anti-infeccioso, anti-inflamatório e anti-hemorrágico, e contribuem para a saúde ocular, redução do colesterol, produção de glóbulos vermelhos e um correto funcionamento da flora intestinal (Gonzalez e Ruiz, 1985).

Por sua vez, a sua elevada concentração em taninos contribui na prevenção e redução do risco de doenças cardiovasculares e de cancros. Estas substâncias antioxidantes estão presentes em maiores quantidades nos diospiros moles, tornando este tipo de diospiros nutricionalmente mais ricos e, conseqüentemente, com mais benefícios inerentes ao seu consumo.

Com este aumento da procura, e numa tentativa de diminuir a importação dos mesmos para o mercado nacional, o interesse pela implantação de pomares de diospireiro tem vindo a aumentar, sendo por isso importante que esta cultura tenha uma boa técnica de propagação.

Neste contexto, os métodos de propagação assexuada, por estacaria e por cultura de tecidos, revelam-se muito interessantes, podendo facilitar a propagação do diospireiro e aumentar a eficiência de instalação de pomares, mantendo as características dos génotipos a instalar e ultrapassando a limitação da enxertia e da falta de sementes na produção de porta-enxertos.

1.2. Objetivos do estudo

Esta dissertação tem como objetivo desenvolver um método de propagação vegetativa eficiente para o diospireiro (*Diospyros kaki* L.), de modo a ultrapassar as dificuldades associadas à sua propagação seminal. Para tal, pretende-se obter estacas de diospireiro e enraizá-las *in vivo*, bem como estabelecer esta cultura *in vitro*, desenvolvendo protocolos de estabelecimento, multiplicação e de enraizamento de diospireiro em cultura de tecidos. Não se abordará a enxertia pela falta de disponibilidade de material e de condições para conduzir o ensaio de forma adequada na época de verão.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A planta do diospireiro

O diospireiro, também designado por caquizeiro, pertence à Família *Ebenaceae*, género *Diospyros* e espécie *Diospyros kaki*.

A árvore pode atingir até 18 metros de altura, embora nos pomares não costume ultrapassar os 5 a 6 metros. O seu porte em jovem é piramidal, desenvolvendo-se posteriormente numa forma globosa, possuindo poucas ramificações (Gonzalez e Ruiz, 1985).

Apresenta folha caduca, com um pecíolo curto, inteira, alternada e de cor verde escura ou verde alaranjada, com uma forma ovado-elíptica e oblongo-ovada, e com uma ligeira pubescência na página inferior (Gonzalez e Ruiz, 1985) (**Figura 1**). Antes da época de colheita, as folhas passam a ter uma coloração avermelhada.



Figura 1. *Diospyros kaki* L. antes da época de colheita (utad, jardim botânico).
(fonte: https://jb.utad.pt/fotografia/Diospyros_kaki.5332008969345359b3f894.pq.jpg)

As flores podem variar entre femininas, masculinas ou hermafroditas, podendo existir árvores com um ou mais tipos de flor (**Figura 2**). As cultivares produtoras de frutos apresentam geralmente só flores femininas, uma vez que os frutos partenocárpicos são os mais aceites pelo mercado, não significando isto que estes sejam os frutos com melhor qualidade organolética (Gonzalez e Ruiz, 1985).



Figura 2. Flor de *Diospyros kaki* L. (utad, jardim botânico).
(fonte: https://jb.utad.pt/fotografia/Diospyros_kaki.3930219059f5c1b8865d32.pq.jpg)

Relativamente ao fruto, o diospiro, no seu estado de maturação, tem uma forma esférica, ligeiramente achatada, de cor laranja, avermelhada ou amarela, consoante o seu teor em carotenos (**Figura 3, Figura 4**). A sua polpa apresenta uma textura mais ou menos áspera, em função do seu teor de taninos, viscosa e de cor vermelha-alaranjada. A composição é à base de mucilagem e pectina, responsáveis pela aparência característica deste fruto. As sementes são achatadas e de cor castanha.

A sua cor exterior varia consoante a fase de desenvolvimento, apresentando uma cor verde azeitona no início do crescimento, e posteriormente uma cor amarelada, correspondente a um crescimento mais acentuado. Ao atingir um ritmo de crescimento mais lento, a cor passa a amarela-alaranjada. Por fim, na fase de maturação, passa a ser alaranjada, o que se pode relacionar com a presença de carotenoides e xantofilas (Gonzalez e Ruiz, 1985) (**Figura 3**).



Figura 3. Frutos de *Diospyros kaki* L. de roer (utad, jardim botânico).
(fonte: https://jb.utad.pt/fotografia/Diospyros_kaki.38e83cf59209344b8f7288.pq.jpg)

Os frutos podem ser distinguidos entre adstringentes e não adstringentes. Os primeiros necessitam de maturação após a colheita, devido à polimerização dos taninos, através da ação do acetaldeído presente no fruto desde o início da fase de maturação. Os segundos não necessitam de maturação após a colheita, podendo ser logo consumidos.

O diospiro é considerado um fruto climatérico, uma vez que a sua intensidade respiratória diminui durante as fases de desenvolvimento e pré maturação, verificando-se o seu mínimo antes do início da fase de maturação, e aumenta durante esta fase, atingindo o seu máximo na fase de amadurecimento. Esta intensidade respiratória é mais elevada nos frutos com sementes e é proporcional ao número de sementes que o fruto apresenta (Gonzalez e Ruiz, 1985).

Algumas das cultivares deste fruto são bastante sensíveis, existindo alguma dificuldade no seu manuseamento e comercialização.



Figura 4. Fruto de *Diospyros kaki* L. mole (Regato *et al.*, 2013).

2.2. A cultura do diospireiro

Esta cultura teve origem na China e no Japão (Collins & Tisdell, 1995), difundindo-se posteriormente para a Índia e por todos os continentes (Ferrão, 1999), tendo uma boa adaptação em climas temperados.

Em Portugal, a sua presença já é observada há muitos anos. Atualmente, existem alguns pomares de diospireiro, na sua maioria localizados no Algarve. No entanto, esta cultura tem maior representatividade através de plantações dispersas ou em bordaduras espalhadas pelo país.

De um modo geral, os diospireiros costumavam ser obtidos a partir de sementes, conferindo elevados níveis de adstringência ao fruto, mesmo após a maturação (Ferrão, 1999).

Quanto às suas cultivares, estas dividem-se mediante a adstringência. Assim, as cultivares Coroa de Rei, Kaki Tipo e Rojo Brillante são as mais adstringentes, necessitando de uma maturação adequada para serem consumidas, sendo estas as mais comuns. Por sua vez, as cultivares Fuyo, Hana Fuyo, O Goshō, Giro, Cai-Fuyo, Fau-fau e Sharon são designadas como não adstringentes, podendo ser consumidas imediatamente após a sua colheita (Nakasone & Paull, 1998).

2.2.1. Produção mundial e comercialização no mercado nacional e internacional

Produção mundial

O cultivo do diospireiro teve início na China, no Japão e na Coreia, no final do século VIII (Gonzalez e Ruiz, 1985). Esta espécie é atualmente produzida na maioria do continente asiático, correspondendo a 96% da produção mundial. A China é o país que apresenta uma maior produção desta cultura a nível mundial (Erro! A origem da referência não foi encontrada.).

A nível Europeu, a Itália é o produtor com maior importância económica, representando 2% da produção mundial, seguindo-se a Espanha (**Quadro 1**).

Quadro 1. Produção mundial do *Diospyros kaki* L. (Regato *et al.*, 2013).

Países produtores	Percentagem produzida
China	72%
República da Coreia	12%
Japão	9%
Itália	2%

Produção nacional

A nível nacional, esta cultura ocupa uma área de 246 ha, originando uma produção superior a 4164 toneladas anuais, sendo a sua maioria proveniente da região do Algarve (Agrogarante, 2019). É por isso possível verificar um aumento da área ocupada pela cultura, e consequentemente da produção nacional, face a 2010. Cerca de 85 a

90% desta produção nacional destina-se aos mercados abastecedores dos grandes centros urbanos e 5 a 10% às grandes superfícies de venda (Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares, 2011).

Quanto às importações deste fruto, segundo as estatísticas do INE (2019), é possível observar que Portugal é um país maioritariamente importador, tendo-se verificado aumentos anuais destas importações, sobretudo a nível europeu. Quanto às exportações, verificou-se um crescimento entre os anos 2010 e 2017, e posteriormente uma queda em 2018, tendo-se atingido cerca de 2 milhões de euros, na sua maioria no espaço europeu.

Este fruto tem vindo a aumentar a sua comercialização, o que pode ser justificado pelo início da importação de cultivares de elevada qualidade provenientes de Espanha e Itália.

Quanto à época de comercialização, esta situa-se entre o início de outubro e meados de dezembro.

2.2.2. Estados fenológicos

Em condições mediterrânicas, o abrolhamento (**Figura 5**) ocorre geralmente entre fevereiro e março,, podendo em algumas regiões (sobretudo no centro e norte do país) ser ainda afetado pelas geadas primaveris. Por sua vez, a floração ocorre geralmente entre abril e maio, e o vingamento do fruto entre os finais de abril e finais de maio, o que acaba também por favorecer esta cultura quanto às condições adversas. dado que nesta época do ano o risco de geada é já diminuto. Na fase de maturação, a temperatura é o fator mais condicionante para a qualidade do fruto, uma vez que a percentagem de açúcares redutores diminui com o aumento da temperatura (Regato *et al.*, 2013).

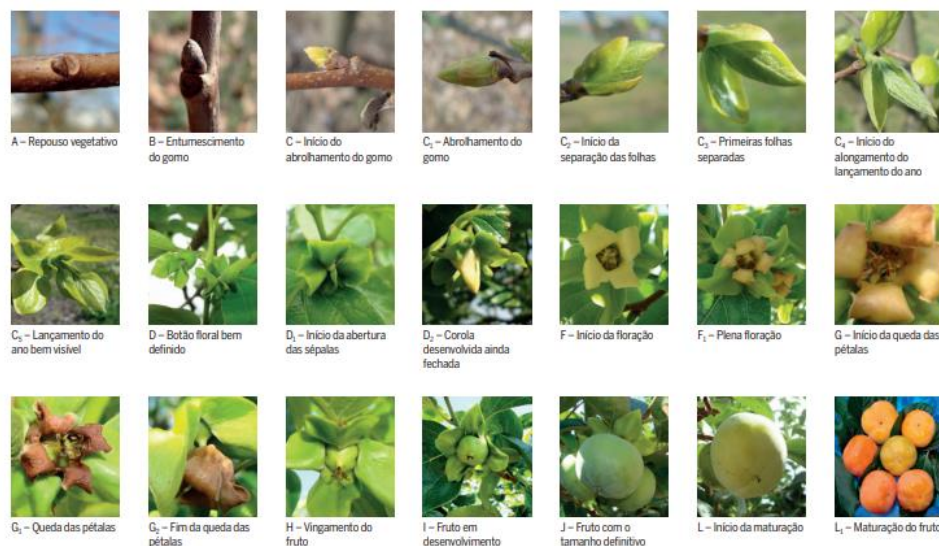


Figura 5. Estados fenológicos do *Diospyros kaki* L. (Regato *et al.*, 2013)

2.3. Métodos de propagação

A propagação das plantas diz respeito à multiplicação de indivíduos assexuada ou sexuadamente. Para a propagação ter sucesso, é necessário ter conhecimentos sobre o material vegetal em causa (a sua morfologia,

desenvolvimento e crescimento), as condições ambientais e os métodos de propagação a utilizar. Deve ainda ter-se em conta os métodos de propagação possíveis para cada espécie de planta (Hartmann, 2002; Peixoto, 2017).

Ao longo dos anos, têm vindo a ser desenvolvidos avanços na agricultura, através da seleção de espécies de interesse e do desenvolvimento de métodos de reprodução e propagação das mesmas em grande escala, permitindo assim preservar as características de interesse para o ser humano.

Os principais métodos de propagação são a propagação sexuada (por sementes) e a propagação assexuada (vegetativa). Inseridas na propagação vegetativa, podem distinguir-se entre outras, a propagação por estacaria, por enxertia (métodos de propagação *in vivo*) e a propagação por cultura de tecidos *in vitro*. No caso das fruteiras, o método mais comum é a propagação vegetativa por enxertia.

A propagação vegetativa é utilizada com o objetivo de produzir uma planta genotipicamente idêntica à planta-mãe ou com características de interesse (Hartmann, 2002). Para isso, recorre-se a diferentes métodos, consoante a finalidade pretendida. As plantas resultantes de propagação vegetativa apresentam uma produção mais rápida de flores, comparativamente às plantas resultantes de propagação seminal (Peixoto, 2017).

Por sua vez, existem diversas espécies com elevado interesse agronómico que são preferencialmente propagadas por métodos assexuados, evitando a propagação seminal, uma vez que esta última pode apresentar maior dificuldade (Peixoto, 2017). No caso particular do *Diospyros kaki* L., para além de não ser interessante a propagação seminal, a não ser para a produção de porta-enxertos ou em contexto de melhoramento, a propagação por enxertia (geralmente com recurso ao porta-enxertos *Diospyros lotus*) considera-se pouco eficiente, tornando necessário desenvolver um método de propagação vegetativa alternativo que facilite a multiplicação da mesma.

2.3.1. Substratos e meios de cultivo e propagação *in vivo*

O substrato de cultivo e de propagação deve apresentar determinadas características que facilitem e aumentem o sucesso do processo. O meio deve ser suficientemente firme e denso de modo a suportar as estacas ou o material vegetativo a utilizar. Este deve também reter a quantidade de água suficiente para a espécie em questão, e ser suficientemente poroso, evitando o encharcamento (Peixoto, 2017).

Por sua vez, o meio deve ser livre de sementes de espécies invasoras e de pragas, passível e tolerante à pasteurização ou a tratamentos químicos, e fornecer uma nutrição mineral adequada quando as plantas são mantidas por períodos prolongados no substrato de propagação (Hartmann, 2002).

Os principais substratos utilizados na propagação de plantas utilizam misturas de diferentes materiais (como areia, turfa, vermiculite, perlite, fibra de coco, flocos de poliestireno expandido, húmus de folhas e as cascas ou derivados de outros materiais em decomposição, fibras e restos de culturas). O substrato deve ser escolhido consoante a espécie com interesse em propagar (Hartmann, 2002).

Em situações em que o material ou a região são fontes de doenças fúngicas e bacterianas, é fundamental fazer-se um tratamento do substrato (Hartmann, 2002).

Todo o material utilizado nos procedimentos de propagação deve ser corretamente desinfestado e mantido em condições assépticas, bem como o ambiente em que estes se realizam (Wendling, 2003).

Quanto ao material vegetal a utilizar, este deve ser selecionado consoante o método escolhido, e tendo em atenção a qualidade do mesmo. Deve optar-se por ramificações mais novas, de preferência as porções superiores dos ramos e com aspeto saudável (Hartmann, 2002).

Depois do material ser implantado para enraizar, deve aplicar-se uma solução nutritiva no mesmo, de modo a fornecer os elementos necessários ao desenvolvimento da nova planta (Peixoto, 2017).

Deve também ter-se em atenção a qualidade microbiológica e química da água, como forma de obter sucesso na propagação em curso. Devem eliminar-se algas, bactérias e coliformes fecais, sempre que existentes, através de análises periódicas e da utilização de filtros ou sistemas de tratamentos locais (Peixoto, 2017). Os níveis de salinidade da água devem ser analisados periodicamente, para impedir que estes excedam os limites viáveis ao sucesso da propagação vegetativa. Quanto ao pH do substrato a utilizar, este deve situar-se entre os 5,5 e os 7,0 (Hartmann, 2002; Peche *et al.*, 2016).

Em alguns casos, torna-se necessário fornecer uma iluminação complementar, através de lâmpadas fluorescentes, de halogénio ou a vapor de sódio. Atualmente, as lâmpadas LED são as mais utilizadas, devido ao baixo consumo de energia, à sua durabilidade e à possibilidade do controlo da qualidade e da intensidade da radiação. Cada espécie apresenta uma necessidade mínima de radiação, a qual deve ser sempre fornecida para obter um bom resultado (Peixoto, 2017).

Para certas espécies, e em determinadas condições de propagação, pode ser interessante ter um fornecimento adicional de dióxido de carbono (CO₂), de modo a favorecer o desenvolvimento das plantas, contrabalançando assim as possíveis diminuições de CO₂ que possam existir (Peixoto, 2017). Este fornecimento adicional pode ser bastante importante uma vez que as plantas necessitam de CO₂ para a fotossíntese, e consequentemente para o seu crescimento.

2.3.2. Propagação por enxertia

A enxertia consiste no método de ligar duas ou mais partes de tecidos vivos, de modo a uni-los através do câmbio (camada fina de células meristemáticas localizadas entre o floema e o xilema) e consequentemente originar uma planta única, após o seu crescimento. O material utilizado deve ser obtido a partir de uma cultura de interesse e livre de patogénicos. O enxerto, também designado por epibioto, é geralmente a parte superior da planta e é constituída por tecido vegetal que contém gomos e que se une ao porta-enxerto, também designado por hipobioto. Este último é, por norma, a parte inferior da planta, sendo o responsável pela formação do sistema radicular da nova planta obtida (Peixoto, 2017). Convém selecionar porta-enxertos que sejam resistentes a algumas condições adversas e organismos fitopatogénicos, ou que permitam controlar o vigor da planta obtida.

O inter-enxerto, também designado por interbioto, diz respeito à parte do ramo que é inserido entre dois enxertos (enxerto e porta-enxerto), quando existe incompatibilidade entre estes, ou quando se pretende inserir determinadas vantagens na planta futura.

Para se obter uma união do enxerto com o porta-enxerto de sucesso, é necessário que o câmbio do enxerto seja colocado de forma rigorosa em contacto com o câmbio do porta-enxerto.

Existem diversos motivos para a aplicação de técnicas de enxertia, desde as plantas com dificuldade de enraizamento, a introdução de características de interesse de determinadas plantas noutras.

Relativamente às técnicas de enxertia, estas podem ser agrupadas em três categorias – garfagem, borbulhia e encostia.

A garfagem é caracterizada pela utilização de um segmento de caule – garfo – com tamanho variável, com 2 a 4 gomos. Esta pode ser em fenda, fenda dupla, fenda incrustada, fenda lateral, meia-fenda, fenda a cavalo, entre outras menos comuns (Peixoto, 2017).

A garfagem em fenda consiste em cortar o futuro porta-enxerto a uma determinada altura do solo e fazer uma fenda de 3 a 4 cm no mesmo, e cortar em cunha o futuro enxerto, de modo a que os diâmetros de ambos sejam coincidentes aquando da sua união. Isto impede a existência de um espaço vazio entre o enxerto e o porta-enxerto (Peixoto, 2017). Posteriormente, este conjunto deve ser amarrado, de modo a permanecerem unidos durante o seu crescimento (**Figura 6**). Por sua vez, se se optar por colocar dois garfos (enxertos) no mesmo porta-enxerto, designa-se por garfagem em fenda dupla, e é habitualmente feita quando o diâmetro do porta-enxerto é grande.



Figura 6. Etapas da enxertia em garfagem simples do *Diospyros kaki* L.

(fonte: <https://deerassociation.com/wp-content/uploads/2016/07/Grafting-Persimmons.pdf>)

A garfagem em fenda incrustada (**Figura 7**) é utilizada quando os enxertos a utilizar são ligeiramente mais finos que os porta-enxertos, e consiste em fazer uma incrustação na lateral do porta-enxerto na forma triangular. Quanto ao enxerto, a extremidade deste é cortada de forma inversa à incrustação do porta-enxerto, e é unido a este (Peixoto, 2017).

A garfagem em fenda lateral diz respeito à remoção de um segmento do caule do porta-enxerto e do enxerto, com cerca de 5 a 6 cm, colocando-os em contacto, de modo a que fiquem unidos (Peixoto, 2017).

A garfagem em meia fenda consiste em fazer um corte oblíquo duplo no enxerto, e cortar o porta-enxerto transversalmente, fazendo uma incisão igual à largura do corte do enxerto. Este é introduzido na fenda do porta-enxerto, unindo ambas as partes (Peixoto, 2017).

Por sua vez, a garfagem em fenda a cavalo é feita cortando o porta-enxerto em cunha e fazendo uma fenda no enxerto. De seguida procede-se à junção de ambas as partes, de forma a mantê-las unidas.

Por último, pode optar-se pela garfagem à inglesa simples ou complexa. A simples consiste em fazer um corte oblíquo, tanto no porta-enxerto como no enxerto e uni-los, cobrindo-os posteriormente com um saco de plástico. Por outro lado, a complexa consiste em fazer um corte oblíquo no porta-enxerto e um segundo corte a 1/3 da extensão do primeiro, aumentando bastante a aderência e a área de contacto enxerto/porta-enxerto. No entanto, a realização deste tipo de garfagem apresenta maior dificuldade.

Por sua vez, a borbulhia é um método bastante rápido e pode utilizar um gomo ativo ou um gomo dormente. a união enxerto/porta-enxerto resultante pode ser mais forte e menos suscetível a ventos fortes. Existem diferentes tipos de borbulhia – a borbulhia em T normal, em T invertido, em janela, em escudo e anelar (Peixoto, 2017).



Figura 7. Enxerto e porta-enxerto de *Diospyros kaki* L.

(fonte: <https://encrypted->

[tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTUQ4EMSW2Zwnp10qTmwdOt3QrkuGdXLmvI6w&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTUQ4EMSW2Zwnp10qTmwdOt3QrkuGdXLmvI6w&usqp=CAU))

2.3.3. Propagação por estacaria

Este método de propagação apresenta bastantes vantagens, tendo capacidade de originar um elevado número de plantas a partir de um número inicial mais reduzido, sendo rápido, simples e de custos reduzidos. Permite ainda obter plantas homogêneas entre si, uma vez que estas não irão apresentar variações genéticas (Peixoto, 2017).

Por sua vez, não é possível obter algumas espécies de plantas diretamente a partir de estacas, podendo nesses casos ser necessário ou vantajoso recorrer à enxertia com um determinado porta-enxerto (Hartmann, 2002).

Podem ser usados diferentes tipos de estacas para a maioria das plantas, mas estes devem ser escolhidos consoante as características da espécie, os custos associados e a facilidade do método escolhido.

Relativamente aos reguladores de crescimento que estão envolvidos no processo, foram feitos diversos testes até serem descobertos os reguladores mais eficazes para o enraizamento. Alguns gases insaturados, como etileno, monóxido de carbono e acetileno estimulam a iniciação de raízes adventícias e o aumento do enraizamento. Por sua vez, as auxinas naturais (como o ácido indol-acético e o ácido indolbutírico) e sintéticas (como ácido naftaleno-acético) estimulam a produção de raízes em estacas de ramos e de folhas. Alguns dos compostos fenólicos, quando em baixas concentrações, contribuem também para o processo de enraizamento (Hartmann, 2002).

O uso combinado destes reguladores de crescimento pode apresentar mais vantagens para o enraizamento, comparativamente ao uso isolado destes mesmos reguladores (Peixoto, 2017).

Propagação de *Diospyros kaki* L. por estacaria

O *Diospyros kaki* L. é uma espécie de difícil propagação por estacas, sendo pouco recorrente a utilização deste método de propagação vegetativa. Existem diversos processos para a elaboração deste método de propagação, embora todos tenham etapas base bastante idênticas. A propagação por estaca começa genericamente pela recolha e conservação do material vegetal, podendo este ser recolhido de ramos do ano anterior com gomos dormentes ou de ramos do próprio ano (**Figura 8**) (Tetsumura *et al.*, 2017). Após a colheita, este deve ser envolvido em papel de filtro húmido e colocado num saco de plástico no frigorífico, até à preparação das estacas (Izhaki *et al.*, 2018). Segue-se uma fase de desinfeção do material vegetal e dos instrumentos a utilizar, de modo a prevenir o aparecimento de fungos (Izhaki *et al.*, 2018).

Antes de implantar as estacas, a base destas deve ser mergulhada numa solução com reguladores de crescimento, normalmente auxinas, durante um tempo específico (**Figura 9**) podendo variar entre os 5 a 20 segundos. Em trabalhos anteriores, esta solução foi constituída por etanol 50% e 3000 ou 6000 mg/L de IBA (Tetsumura *et al.*, 2017) ou apenas por 6000 mg/L de IBA (Izhaki *et al.*, 2018).

O substrato a utilizar para o enraizamento pode ser constituído por Metro-Mix 360 (Tetsumura *et al.*, 2017), constituído por turfa, vermiculite, casca de pinheiro, calcário dolomítico, agente humectante de longa duração, nutrientes e nitrogénio de libertação lenta; ou por vermiculite e poliestireno, numa proporção de 1:1 (v/v) (Izhaki *et al.*, 2018), e os vasos devem ser colocados numa estufa sob uma rede de alumínio vaporizado com 70-80% de sombra, com temperatura entre os 25 °C e os 29 °C. É fundamental proceder à nebulização intermitente da estufa (por exemplo 10 a 30 segundos de humedificação, alternando com 15 minutos de pausa). Este procedimento deve efetuar-se entre as 8 e as 18 horas, utilizando microaspersores ou equipamentos equivalentes que produzam gotículas de água muito finas (10 µm de diâmetro). Se a temperatura ambiente atingir os 38 °C, deve fazer-se ventilação regular e nebulização contínua, podendo utilizar ventiladores localizados nas laterais superiores da estufa. Ao fim de 30 dias deve ser possível observar o crescimento dos rebentos e o enraizamento das estacas. Nessa altura, as estacas enraizadas devem ser transplantadas individualmente para um contentor com substrato, com uma fertilização de libertação controlada, sendo mantidas em condições de estufa, com temperatura, humidade e radiação controladas (Tetsumura *et al.*, 2017; Izhaki *et al.*, 2018).



Figura 8. Estacas de *Diospyros kaki* L.

(fonte: <https://i.ytimg.com/vi/AnWBO76PqtI/maxresdefault.jpg>)



Figura 9. Estacas de *Diospyros kaki* L. mergulhadas numa solução com reguladores de crescimento.
(fonte: <https://i.ytimg.com/vi/XKWKpnF7lN0/maxresdefault.jpg>)

2.3.4. Propagação por cultura de tecidos *in vitro*

Vantagens e limitações da cultura de tecidos *in vitro*

A micropropagação, ou cultura de tecidos *in vitro*, permite a produção de novas plantas a partir de pequenas estruturas como embriões, gomos apicais, meristemas, protoplastos, células, *calli*, micrósporos e outros tecidos (Torres *et al.*, 2000). Permite ainda produzir plantas mais uniformes, saudáveis, com uma elevada velocidade de propagação comparativamente aos métodos de propagação convencionais (propagação seminal), e a obtenção de elevadas quantidades de plantas por metro quadrado dentro dos frascos. Este método de propagação vegetativa é possível devido à totipotência celular. Esta propriedade das células vegetais está associada à capacidade que estas células vivas têm de conter a informação genética e gerar uma nova planta, com características idênticas à planta já existente (Torres *et al.*, 2000) e à disponibilidade de diferentes reguladores de crescimento que induzem respostas diferentes ao nível dos tecidos vegetais (**Quadro 2**).

Quadro 2. Reguladores de crescimento associados às técnicas de cultura *in vitro* e respetivas funções (AIA: ácido indolacético, AIB: ácido indolbutírico, ANA: ácido naftalenoacético, 2, 4-D: ácido 2, 4-diclorofenoxiacético, Z: zeatina, 2iP: 2-isopentenyadenina, DHZ: dihidrozeatina, BAP: 6-benzilaminopurina, TDZ: tidiazurão, KIN: cinetina, GA3: ácido giberélico.).

Reguladores de crescimento	Funções		
Auxinas	Indução do alongamento celular e diferenciação de raízes, indução da embriogénese, aumento da friabilidade de <i>calli</i> , alongamento dos entrenós, etc	Naturais	AIA; AIB
		De síntese	ANA; 2,4-D; dicamba
		Inibidores de oxidação	Fluoroglucinol; ácido ferrúlico
Citocininas	Indispensáveis à divisão celular, à quebra da dominância apical, à indução e proliferação dos gomos axilares e diferenciação dos gomos adventícios e à indução da parte aérea em <i>calli</i>	Naturais	Z; 2iP; DHZ e ribósidos
		De síntese	BAP (ribósidos e adeninas); TDZ; KIN

Giberelinas	Estimulação do crescimento de órgãos, alongamento dos caules e raízes, desenvolvimento de embriões somáticos e florescimentos.	GA3
Ácido abscísico	Inibição do crescimento e indução da maturação de embriões	Inibidores (paclobutrazol)
Etileno		Inibidores (nitrato de prata) e práticas inibitórias
Poliaminas		Putrescina; spermidina
Jasmonatos		Ácido jasmónico
Brassinosteroides		

Ao colocar em prática a técnica de cultura de tecidos *in vitro*, deve ter-se em atenção os problemas que podem estar associados a esta. Um exemplo deste é a produção de plantas com características morfológicas bastante distintas da planta-mãe, podendo este facto resultar de excessivas repicagens ou na passagem da fase de *callus* (Peixoto, 2017). Por outro lado, é fundamental ter em conta a dificuldade de enraizamento que algumas espécies apresentam (Wendling, 2003).

Técnicas de micropropagação

A produção comercial de plantas *in vitro* tem vindo a tornar-se numa prática bastante recorrente em diversos países da Europa, Ásia, Estados Unidos e Brasil.

Um dos procedimentos associados à técnica de cultura de tecidos *in vitro*, é a regeneração de plantas a partir de protoplastos (Peixoto, 2017). O protoplasto consiste numa célula vegetal individualizada e desprovida de parede celular. Neste sentido, são isolados os protoplastos de um determinado tecido vegetal.

Os tecidos herbáceos e não lenhificados apresentam uma maior facilidade de isolamento, permitindo obter um maior rendimento de protoplastos viáveis (Wendling, 2003). A eliminação das paredes celulares é feita através das enzimas pectocelulolíticas, uma vez que estas digerem os constituintes das paredes celulares, ficando a célula vegetal apenas envolvida pela membrana celular. Nestas condições, as células podem ser manipuladas de diversas formas e para diversas aplicações. No entanto, estes protoplastos apresentam as suas maiores potencialidades associadas ao melhoramento de plantas (Peixoto, 2017).

No que toca ao resgate de embriões a partir de técnicas de cultura de tecidos *in vitro* (embriogénese somática), é mais comum recorrer-se à proliferação de *calli* para a indução dos embriões somáticos (Yokoyama *et al.*, 2011). No entanto, é também possível que a embriogénese somática ocorra diretamente de um explante, sem que haja aparecimento de *calli* (Andrade, 2002). O meio artificial a utilizar deve ter a capacidade de substituir o endosperma na função de nutrir o embrião. Para isso é necessário conhecer todas as exigências nutricionais do mesmo, em cada uma das suas fases de desenvolvimento. O embrião pode necessitar apenas de um meio de cultura com nutrientes inorgânicos e uma fonte de hidratos de carbono, como também de um suplemento com fitohormonas, antioxidantes, vitaminas e outras substâncias, caso se trate de um embrião bastante jovem (Peixoto, 2017; Yokoyama *et al.*, 2011).

Por fim, outra técnica de cultura de tecidos *in vitro*, é a micropropagação por explantes meristemáticos. Esta técnica apresenta a vantagem de regenerar as plantas a partir de tecidos vegetais organizados, sem ser necessário recorrer a *calli* (Andrade, 2002). Esta abordagem recorre a explantes meristemáticos, como um meristema apical ou um gomo apical, e baseia-se na instalação do mesmo num meio nutritivo adequado ao genótipo após um processo de desinfecção superficial. Após a iniciação da cultura, os meristemas dão origem a rebentos que vão alongando, podendo depois ser divididos e repicados para novo meio (fase de multiplicação), originando novos rebentos (Isac *et al.*, 2010).

A propagação *in vitro* obriga à escolha de um método de desinfecção dos explantes, que lhes retire eventuais contaminações não comprometendo a viabilidade dos mesmos, bem como, de um meio de cultura favorável ao crescimento dos tecidos vegetais. Os métodos de desinfecção são muito variados, e recorrem a várias substâncias, sendo frequentemente usados o etanol, o hipoclorito de sódio ou de cálcio, o NaDCC, Tween 20, para além de fungicidas e antibióticos (Parkinson *et al.*, 1996; Eziashi *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de procedimentos de regeneração *in vitro* fiáveis pode ter um papel fundamental para a produção de porta-enxertos clonais e de cultivares auto-enraizadas.

Segundo Bown e Thorpe (1986), as composições química e física do meio de cultura são fatores determinantes para a iniciação e desenvolvimento das culturas (Quisen e Angelo, 2008). Este meio pode ter diferentes composições consoante as necessidades da espécie escolhida e as condições em que se procede.

Preparação e características do meio de cultura

A preparação do meio de cultura consiste numa das etapas do método de propagação de cultura *in vitro*. Os meios são constituídos por uma mistura equilibrada de macronutrientes, micronutrientes, hidratos de carbono, fontes orgânicas de azoto, vitaminas e reguladores de crescimento. Estas substâncias costumam ser agrupadas consoante a sua composição e são preparadas soluções concentradas para serem utilizadas na elaboração do meio de cultura, uma vez que este processo é bastante moroso (Quisen e Angelo, 2008). Existem diversos procedimentos para a preparação dos meios de cultura, sendo necessário ter os devidos cuidados ao combinar determinados sais numa mesma solução.

Uma vez que existem várias formulações de meios para a cultura de tecidos, consoante a espécie a propagar e a sua fase de desenvolvimento da cultura *in vitro*, deve escolher-se o meio de cultura mais adequado para cada caso, procurando-se estudos prévios sobre as exigências nutricionais das plantas a propagar (Peixoto, 2017).

Os meios a utilizar na cultura de tecidos podem ser semissólidos ou líquidos. Os semissólidos costumam apresentar uma substância com ação gelificante, o agar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas que fornece uma consistência ao meio, permitindo que este suporte as plantas. Para além desta substância, existem ainda outras alternativas, que têm vindo a ser estudadas, como é o caso do fitagel, da agarose e do amido (Quisen e Angelo, 2008).

Através dos estudos realizados por White (1951), foi obtido um meio líquido para o cultivo de ápices radiculares de tomate, permitindo cultivar estes tecidos por longos períodos de tempo. Este meio era constituído por sais inorgânicos, sacarose e extrato de levedura, responsáveis pela manutenção do desenvolvimento das plantas

(Peixoto, 2017). Atualmente, este meio é ainda utilizado na cultura de tecidos *in vitro*, substituindo o extrato de levedura por vitaminas.

Por sua vez, Murashige & Skoog (1962) desenvolveram um meio nutritivo, denominado por meio “MS”, onde os níveis de nutrientes inorgânicos tiveram como base a constituição do extrato de folhas de tabaco, apresentando uma elevada concentração de sais minerais. Este meio reproduz de forma mais fidedigna os níveis de nutrientes naturalmente necessários ao desenvolvimento das plantas (Peixoto, 2017). É universalmente utilizado, sobretudo na morfogênese, na cultura de meristemas e na regeneração de plantas (Quisen e Angelo, 2008).

Para além destes meios existem ainda outros, como o meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), o meio SH (Schenk e Hildebrandt, 1972), que é mais utilizado em leguminosas, o meio Anderson (1978, 1980), que é mais utilizado em lenhosas e o meio WPM (Lloyd e Mc Cown, 1981), bastante utilizado na propagação de arbustos e árvores (Quisen e Angelo, 2008).

Atualmente, o meio MS é um dos mais utilizados na cultura de tecidos, sendo adequado para as diversas finalidades.

Por sua vez, é também frequentemente utilizado o meio MS modificado (Lambardi, 2013), constituído por metade das concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 presentes no meio MS, mantendo as concentrações das restantes soluções iguais.

○ **Preparação do meio MS**

Todas as soluções a usar para o meio de cultura devem ser preparadas com água destilada e desionizada, tendo em conta as exigências de solubilidade e de armazenamento de cada substância química. Não é recomendada a utilização de água da torneira, uma vez que esta pode apresentar impurezas.

As soluções de macronutrientes são preparadas dissolvendo estas substâncias em 500 mL de água destilada e desionizada cada. Posteriormente, deve completar-se os respetivos volumes até atingir os 1000 mL e agitar bem as soluções. Por fim, as soluções obtidas devem ser armazenadas em frasco num local frio (Quisen e Angelo, 2008).

Por sua vez, para a preparação das soluções de micronutrientes dissolve-se cada um deles em 300 mL de água destilada e deionizada, completando posteriormente até perfazer o volume de 1000 mL e agitar bem. Estas soluções são também armazenadas em frasco e colocadas num local frio (Quisen e Angelo, 2008).

A solução $Na_2EDTA \cdot 2H_2O + FeSO_4 \cdot 7H_2O$ é preparada dissolvendo $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ em 800 mL de água destilada e deionizada morna, e posteriormente é adicionado o $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ enquanto se agita lentamente a solução. Por fim, completa-se o volume até perfazer os 1000 mL, agita-se bem e coloca-se num frasco coberto com papel de alumínio num local frio (Quisen e Angelo, 2008).

Após ter todas estas soluções preparadas, para formular 1000 mL do meio de cultura MS, devem utilizar-se 10 mL de cada uma delas (Quisen e Angelo, 2008).

No que diz respeito à preparação das soluções de vitaminas, sendo estas compostos orgânicos, devem prepara-se em frascos de menores dimensões, evitando o desenvolvimento de microrganismos. A solução de tiamina, ácido nicotínico e piridoxina é preparada através da dissolução destes três constituintes em 300 mL de água destilada e

desionizada, completando o volume obtido até perfazer os 1000 mL. Por fim, deve agitar-se bem a solução e armazená-la num frasco em local frio. As soluções de glicina e mio-inositol são preparadas do mesmo modo (Quisen e Angelo, 2008).

Por sua vez, associado aos métodos de micropropagação torna-se também fundamental o conhecimento das fitohormonas (ou reguladores de crescimento) e saber quando e quais usar. Exemplos de fitohormonas mais utilizadas na micropropagação são as auxinas e as citocininas, sendo substâncias bastante importantes na cultura de tecidos (Quisen e Angelo, 2008; Jaganathan *et al.*, 2020).

Uma vez que estas substâncias apresentam uma elevada influência no padrão de desenvolvimento de células, órgãos e tecidos vegetais, é essencial manter um correto equilíbrio entre a quantidade de fitohormonas e de nutrientes, de modo a obter sucesso na micropropagação.

As soluções de fitohormonas são preparadas dissolvendo estas substâncias em água destilada, solução alcalina ou solução alcoólica, e armazenando-as em frascos pequenos num local frio. Os reguladores de crescimento são mais exigentes no que toca à solubilidade, comparativamente às vitaminas (Quisen e Angelo, 2008).

A maioria dos reguladores de crescimento são relativamente solúveis em água, sendo mais eficazes em solução alcalina. Assim, as auxinas em base devem ser dissolvidas na porção de 3 gotas da base para 10 mg de auxina e água. As citocininas apresentam uma fácil dissolução em base, e devem ser dissolvidas em ácido na mesma proporção das auxinas (Quisen e Angelo, 2008). Gamborg (1968) recomendou a utilização de álcool etílico na dissolução dos reguladores de crescimento, no entanto deve ter-se em atenção o seu uso, uma vez que este inibe a embriogénese *in vitro*. Os reguladores de crescimento podem ser preparados em soluções concentradas, de modo que sejam adicionadas apenas pequenas quantidades ao meio de cultura sem que haja alteração das restantes características (Quisen e Angelo, 2008).

Os reguladores de crescimento termolábeis devem ser esterilizados por ultrafiltração, sendo este processo mais moroso e mais caro, comparativamente à autoclavagem. No entanto, a ultrafiltração garante a integridade dos reguladores no meio de cultura (Jaganathan *et al.*, 2020).

Após ser calculada a quantidade necessária à preparação do meio de cultura, a solução filtrada é adicionada ao meio previamente autoclavado que se encontrava em local frio, até atingir aproximadamente 45 °C. Este passo é feito com recurso a uma micropipeta com pontas autoclavadas dentro da câmara de fluxo (Quisen e Angelo, 2008).

Quando se trata de grandes volumes de solução, torna-se necessário utilizar um filtro de maior diâmetro, sob pressão ou vácuo.

Assim, tem-se todas as soluções necessárias à elaboração do meio de cultura prontas, sendo rápido este último processo. Antes deste ser preparado, devem ser calculadas as quantidades necessárias de cada uma das soluções requeridas para obter o volume desejado do meio de cultura, bem como as quantidades de sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e o agente solidificante (Quisen e Angelo, 2008).

O volume de cada solução deve ser retirado com o auxílio de uma pipeta, devendo utilizar-se uma diferente para cada tipo de solução. Deste modo consegue obter-se uma maior precisão e evitar a contaminação das soluções (Bolwell *et al.*, 1985).

A elaboração do meio de cultura pode ser feita recorrendo a diferentes procedimentos, mas essencialmente envolve a mistura de todas as soluções de acordo com as quantidades previamente calculadas num recipiente com 30% da quantidade total de água destilada (Isac *et al.*, 2010). Segue-se a junção desta mistura à restante água, sacarose e agar, elevando-se a temperatura para dissolver o agar. De seguida, ajusta-se o pH para os valores previamente estabelecidos, comumente entre 5,6 e 5,8, ajusta-se o volume final e distribui-se pelos recipientes apropriados para levar à autoclave. A esterilização ocorre normalmente a 120°C, 1,5 bar, durante 15-20 minutos (Jaganathan *et al.*, 2020).

Micropropagação de *Diospyros kaki* L. com recurso a explantes meristemáticos

As principais técnicas de cultura de tecidos *in vitro* utilizadas para esta espécie baseiam-se na regeneração direta (de botões e ápices de raízes dormentes) e na regeneração indireta por meio de *calli* de gomos, ápices e folhas, em condições de assepsia (Lambardi, 2013). A utilização de explantes de raízes promove um aumento da capacidade de enraizamento das microestacas comparativamente à utilização dos gomos dormentes (Peixoto, 2017).

O protocolo para a micropropagação do diospiro baseia-se no estabelecimento de gomos dormentes de inverno *in vitro*, no desenvolvimento destes e subsequente enraizamento dos explantes, depois de multiplicados e alongados, através do uso de citocininas em meio MS, fazendo-se um pré-tratamento auxínico para a indução do enraizamento (Peixoto, 2017; Jaganathan *et al.*, 2020; Telles *et al.*, 2005).

A recolha do material vegetal é feita durante o inverno (em janeiro), período em que os gomos se encontram dormentes.

Quanto ao meio de cultura associado à micropropagação do diospiro, o mais utilizado é o meio MS modificado (Lambardi, 2013). Este meio apresenta agentes gelificantes que podem contribuir para impedir o escurecimento do meio e dos tecidos vegetais, aumentar a proliferação dos gomos e aumentar a taxa de crescimento dos mesmos.

Para esta cultura em particular, as etapas inerentes à cultura de tecidos *in vitro* baseiam-se em (**Figura 10**):

- 1) Preparação do meio de cultura MS modificado;
- 2) Seleção e esterilização do material a usar (instrumentos e material vegetal) e estabelecimento dos explantes no meio de cultura;
- 3) Cultura, multiplicação, alongamento e manutenção dos explantes (com adição de citocininas para promover o desenvolvimento dos gomos);
- 4) Indução das raízes em raízes regeneradas a partir de um pré-tratamento com auxinas;
- 5) Transplante e aclimatização das plântulas enraizadas (passagem de condições *in vitro* para condições *ex vitro*).

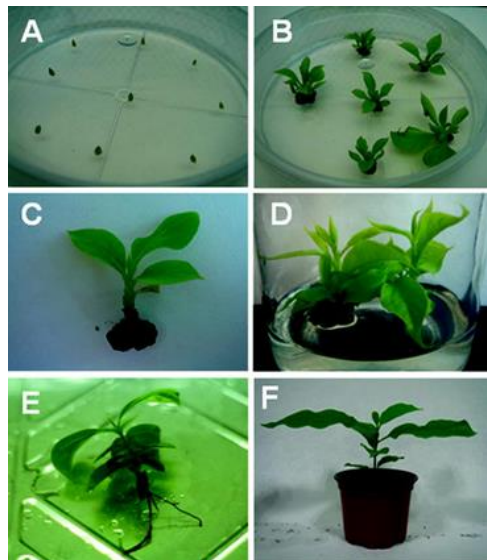


Figura 10. Micropropagação de *Diospyros kaki* “Jiro”

(A) amostras dos tecidos vegetais no meio de cultura; (B) crescimento e desenvolvimento dos explantes (folhas); (C) explante obtido no primeiro meio de cultura; (D) explantes introduzidos noutra meio de cultura; (E) explantes com desenvolvimento de raízes; (F) implantação do explante no substrato. (Lambardi, 2013)

Quanto aos obstáculos da micropropagação desta cultura (**Figura 11**), estes baseiam-se na recalcitrância de muitas cultivares para o estabelecimento *in vitro* (*D. kaki*, *D. lotus* e *D. virginiana*), na reduzida taxa de multiplicação de *Diospyros kaki* L. comparativamente a outras espécies fruteiras, no escurecimento dos tecidos e do meio, na baixa capacidade de enraizamento de microestacas (para ambos os tipos de regeneração) e na elevada sensibilidade de transplantar de *in vitro* para as condições *in vivo* (Jaganathan *et al.*, 2020).

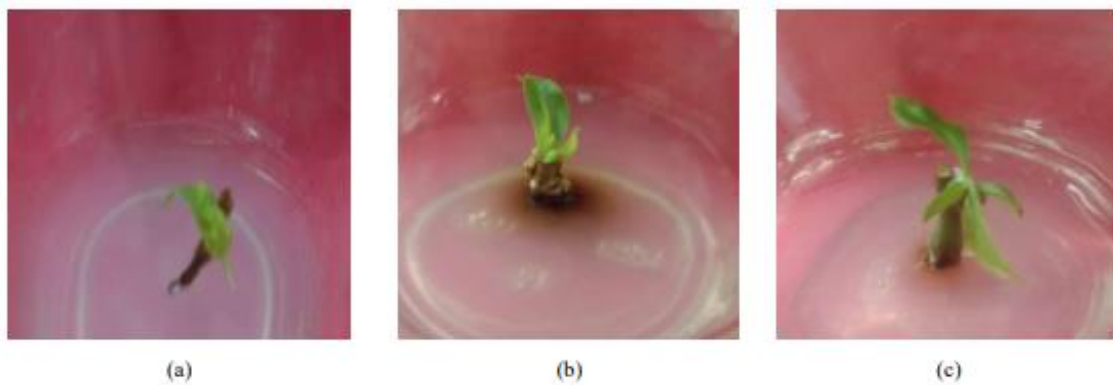


Figura 11. Crescimento de gomos de *Diospyros kaki* L.; (a) amostra 1; (b) amostra 2; (c) amostra 3 (Wardani, 2019).

3. Materiais e métodos

Este estudo foi realizado no Instituto Superior de Agronomia, englobando uma componente laboratorial, que se realizou no laboratório de biologia molecular e micropropagação de Horticultura, e uma componente de campo, realizada nas estufas.

3.1. Ensaio de enraizamento de estacas

Foram realizados dois ensaios de enraizamento de estacas. Para o 1º ensaio, colheram-se vários ramos de diospireiro (cultivares adstringentes, com polpa vermelha) de um produtor da zona de Setúbal, nos estados fenológicos A-B, cortando-os em secções com 2-4 gomos dormentes (258 estacas) (**Figura 12**) e colocando-os em água e/ou envolvidos em papel a uma temperatura de 4-8°C até serem processados.



Figura 12. Estacas de *Diospyros kaki* L.

De seguida, procedeu-se à desinfeção do material vegetal, mergulhando as estacas numa solução constituída por carbendazime (10 mg de fungicida por 100 mL de solução) durante 2 minutos e deixando secar sobre um papel absorvente (**Figura 13**).



Figura 13. (1) Solução de desinfeção com pinça; (2) Desinfeção das estacas de *Diospyros kaki* L.

Foram preparadas duas soluções, uma com 3000 mg/L de IBA e outra com 6000 mg/L de IBA, bem como tabuleiros de propagadores com substrato para o enraizamento: vermiculite e perlite, numa porção 50:50. Foram feitos 6 grupos de estacas, de modo a ter 6 modalidades: duas concentrações de IBA e 3 tempos de imersão, respetivamente 5, 10 e 20 segundos. Mergulhou-se então a parte inferior de cada estaca na solução de auxina durante o tempo previamente definido e enterrou-se no substrato previamente preparado nos tabuleiros.

O substrato foi regularmente humedecido, bem como as tampas dos propagadores, com um pulverizador manual, por forma a simular a nebulização. As estacas permaneceram na estufa a uma temperatura ambiente oscilando entre 18°C e 27°C e fotoperíodo natural durante aproximadamente 2 meses (**Figura 14**). Ao fim deste período, avaliou-se a sobrevivência, o abrolhamento e o enraizamento das estacas.



Figura 14. Tabuleiros de propagadores com as estacas do 1º ensaio na estufa.

No 2º ensaio, preparam-se de forma semelhante 120 estacas, recorrendo-se apenas à concentração de 6000 mg/L de IBA e 20 segundos de imersão da base da estaca. O resto do ensaio decorreu como anteriormente descrito.

3.2. Ensaio de cultura de tecidos *in vitro*

Os ensaios de estabelecimento da cultura *in vitro* foram todos conduzidos com explantes com gomos axilares dormentes.

3.2.1. Preparação dos meios de cultura

Foram preparados dois tipos de meio de cultura: o meio MS com BA e o meio MS modificado com zeatina, cujas composições se encontram no **Quadro 3**.

Quadro 3. Concentrações dos componentes para cada meio de cultura.

Concentrações dos componentes		Meio MS com BA	Meio MS modificado com zeatina
Soluções de Macronutrientes	KH ₂ PO ₄	10 mL/L	10 mL/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	10 mL/L	10 mL/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	10 mL/L	10 mL/L
	NH ₄ NO ₃	10 mL/L	5 mL/L
	KNO ₃	10 mL/L	5 mL/L
Solução de Micronutrientes		5 mL/L	5 mL/L
Ferro		5 mL/L	5 mL/L
Mio-inositol		0,1 g/L	0,1 g/L
Sacarose		20 g/L	20 g/L
Agar		20 g/L	20 g/L
Vitaminas	Pirimidina	1 mL/L	1 mL/L
	Tiamina	0,2 mL/L	0,2 mL/L
	Ácido nicotínico	1 mL/L	1 mL/L
	Glicina	4 mL/L	4 mL/L
BA		5 mg/L	-
Zeatina		-	2,2 mg/L

Os meios (**Figura 15** (1)) foram esterilizados por autoclavagem a 120°C, 1,5 bar, durante 20 min. A BA não se degrada com a autoclavagem, pelo que foi incluída no meio antes da esterilização. Os meios aditivados com zeatina foram previamente preparados e esterilizados, adicionando-se a citocinina após a esterilização, já na câmara de fluxo laminar. Após arrefecimento, cada meio foi distribuído por placas de Petri de 90 mm (ensaios iniciais) ou por tubos (**Figura 15** (2)).

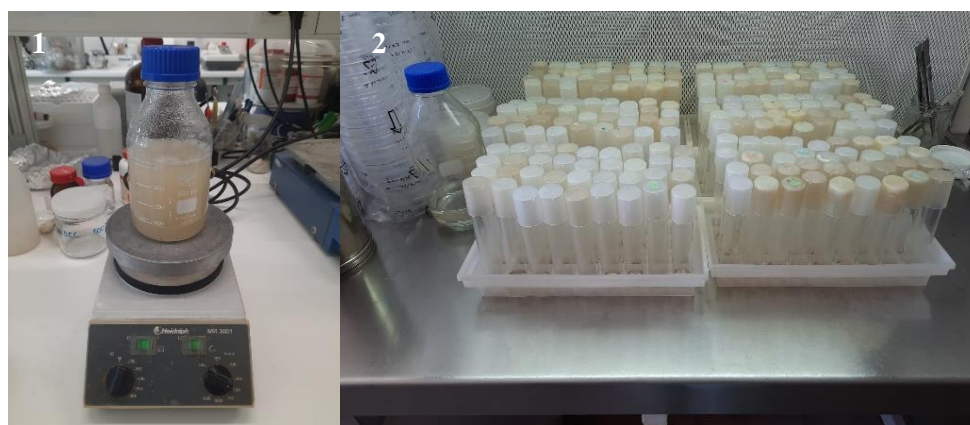


Figura 15. (1) Meio de cultura MS no agitador magnético; (2) Tubos de vidro com meio de cultura na câmara de fluxo laminar.

3.2.2. Esterilização dos materiais

Os materiais a utilizar na instalação dos gomos devem ser esterilizados previamente à sua utilização. Assim, procedeu-se à esterilização dos tubos, do papel absorvente, de bisturis e pinças por autoclavagem nas condições já referidas.

3.2.3. Preparação do material vegetal

O material vegetal teve a origem anteriormente indicada. Os ramos com gomos dormentes (estados fenológicos A-B) foram trazidos para o laboratório e deixados com a base imersa em água, por um ou dois dias. De seguida, com uma tesoura de poda cortaram-se os gomos isolados ou secções dos ramos com o gomo dormente (explantes caulinares com o gomo dormente). Alguns dos ramos foram humedecidos e armazenados em sacos de plástico, e deixados no frigorífico (a 4 °C), para serem utilizados mais tarde.

3.2.4. Desinfecção dos gomos

Em cada ensaio, os gomos foram colocados num frasco para proceder à desinfecção dos mesmos. Foram testados diferentes métodos de desinfecção dos gomos, que se explicitam no **Quadro 4**:

Quadro 4. Procedimentos de cada método de desinfecção.

Métodos de Desinfecção	Procedimentos
M inicial	1º) Retirar os gomos axilares de boa qualidade; 2º) Mergulhar os gomos axilares em água destilada, durante 30 minutos, sempre a agitar; repetir este processo; 4º) Passar os gomos para uma solução de água destilada com 2-3 gotas de detergente da louça, durante 30 minutos; 4º) Retirar os gomos dessa solução e mergulhá-los numa solução com 2% de hipoclorito de sódio e 0,1% de Tween 20, durante 5 minutos, com agitação contínua. Repetir o processo. (Em alguns casos, dividiu-se os gomos por dois frascos, um com a solução descrita em cima e outro com a mesma solução (100 mL) e 1,5% de fungicida carbendazime. O objetivo era perceber se o fungicida melhorava a desinfecção dos gomos); 5º) Retirar os gomos da solução e mergulhá-los em água destilada esterilizada, durante 5 minutos, com agitação contínua. Fazer esta lavagem 3 vezes, sendo a última na câmara de fluxo laminar;
M inicial melhorado	1º) Manter os gomos em água corrente com adição de umas gotas de detergente da louça, durante 30 minutos, 2º) Retirar os gomos da água e mergulhá-los numa solução constituída por hipoclorito de sódio (2%), Tween 20 e fungicida (carbendazime) como no M inicial, durante 30 minutos com agitação contínua. Drenar a solução e repetir esta etapa;

	<p>3º) Retirar os gomos desta solução e mergulhá-los em água destilada, durante 30 minutos, com agitação contínua. Drenar a água e repetir esta etapa;</p> <p>4º) Fazer uma terceira lavagem dos gomos com água destilada na câmara de fluxo laminar;</p> <p>5º) Proceder à instalação dos gomos no meio de cultura, e adicionar uma gota de fungicida carbendazime no meio.</p>
M inicial melhorado 2	<p>1º) Manter os gomos em água destilada durante 30 minutos, com agitação constante e repetir o processo;</p> <p>2º) Escorrer os gomos e mergulhá-los em água com 2-3 gotas de detergente de louça, deixando-os de um dia para o outro, com agitação constante;</p> <p>3º) Escorrer os gomos e mergulhá-los na solução com hipoclorito de sódio, fungicida e Tween 20 como no método anterior durante 20 minutos, repetir 2 vezes;</p> <p>4º) Drenar a solução e fazer 3 lavagens com água destilada, de 20 minutos cada. A última lavagem é feita na câmara de fluxo laminar.</p>
M1	<p>1º) Passar os gomos por água corrente e escorrer;</p> <p>2º) Mergulhá-los numa solução com mancozebe (1,5 g/100 mL), durante 20 minutos;</p> <p>3º) Drenar a solução e fazer 3 lavagens com água destilada autoclavada;</p> <p>4º) Mergulhar os gomos numa solução com 5000 ppm NaDCC, durante 10 minutos;</p> <p>5º) Drenar a solução e passar os gomos por uma solução com hipoclorito de sódio (50% de lixívia comercial a 5%) e Tween (0,1%), durante 20 minutos;</p> <p>6º) Drenar a solução e fazer 3 lavagens dos gomos com água destilada autoclavada, levar para a câmara de fluxo laminar.</p>
M2	<p>1º) Mergulhar os gomos em etanol 95% durante 1 minuto;</p> <p>2º) Drenar a solução (etanol 95%) e fazer uma lavagem com água destilada autoclavada;</p> <p>3º) Mergulhar os gomos numa solução saturada de hipoclorito de cálcio (CaClO₂) e 0,1% Tween 20 durante 20 minutos;</p> <p>4º) Drenar a solução e fazer uma lavagem com água destilada autoclavada.</p>
M3	<p>1º) Passar os gomos por água corrente durante 5 minutos;</p> <p>2º) Mergulhar os gomos numa solução de fungicida (mancozebe, como anteriormente) com antibiótico (cefotaxime, 250 µg/ml), durante 20 minutos;</p> <p>3º) Drenar a solução e fazer 5 lavagens com água destilada autoclavada;</p> <p>4º) Levar para a câmara de fluxo laminar;</p> <p>5º) Fazer mais 2 lavagens com água destilada autoclavada;</p> <p>6º) Mergulhar os gomos em NaClO (4%) durante 4 minutos;</p> <p>7º) Drenar e mergulhar os gomos em ácido ascórbico (10%), durante 20 minutos;</p> <p>8º) Drenar e fazer 3 lavagens com água destilada autoclavada.</p>
M4	<p>1º) Passar os gomos por etanol 70%;</p> <p>2º) Mergulhar os gomos numa solução com 0,1% Tween 20, durante 2 minutos;</p> <p>3º) Drenar a solução e fazer uma lavagem com água destilada autoclavada;</p> <p>4º) Passar os gomos numa solução com fungicida (1,5% mancozebe) e antibiótico (250 µg/ml cefotaxime);</p>

	<p>5º) Mergulhar os gomos em etanol 70%, durante 30 minutos;</p> <p>6º) Drenar a solução (etanol 70%) e passar os gomos por uma solução com 5000 ppm NaDCC e PVP (1%);</p> <p>7º) Fazer uma lavagem com água destilada autoclavada.</p>
M5	<p>1º) Mergulhar os gomos numa solução com fungicida (1,5% mancozebe), durante 16 horas, com agitação constante;</p> <p>2º) Drenar a solução e mergulhar os gomos em etanol 70%, durante 1 minutos;</p> <p>3º) Drenar a solução (etanol 70%) e mergulhar os gomos numa solução com NaClO (2,5%) e Tween 20, durante 30 minutos;</p> <p>4º) Escorrer e fazer uma lavagem com água destilada autoclavada.</p>

Foram feitas previamente todas as soluções presentes nos diferentes métodos de desinfecção (**Figura 16**), numa quantidade de 20 mL cada.

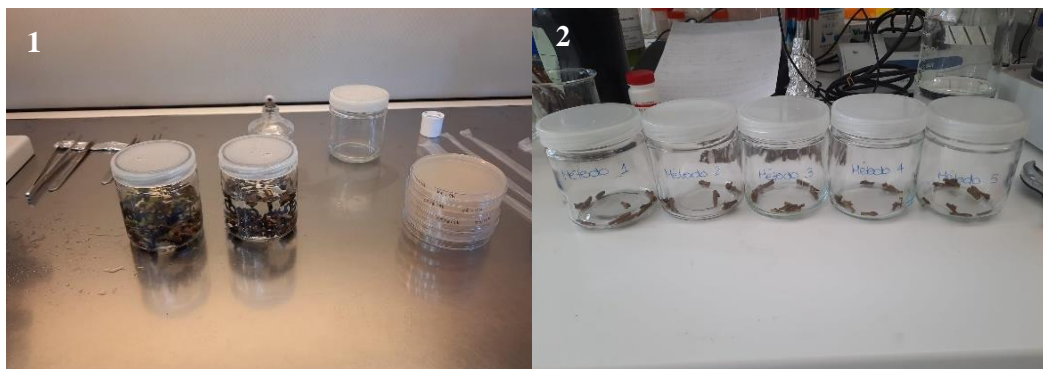


Figura 16. (1) Métodos de desinfecção inicial: com e sem fungicida; (2) Métodos de desinfecção: M1, M2, M3, M4 e M5.

3.2.5. Instalação dos gomos

Após a desinfecção, os gomos permaneceram em água, na câmara de fluxo laminar, sendo instalados no meio de cultura. Todos os gomos desinfetados foram instalados no próprio dia ou no dia seguinte à desinfecção. Para instalar cada gomo, colocou-se este sobre um papel absorvente esterilizado e cortou-se o gomo pela base, removendo-se as escamas e folhas primordiais exteriores, com a ajuda de um bisturi e de uma pinça previamente esterilizados (**Figura 17** (1)); o gomo foi introduzido no meio de cultura, nos primeiros ensaios em caixas de Petri (8 a 10 gomos/caixa) (**Figura 17** (2)), depois em tubos de vidro (1 gomo/tubo) (**Figura 17** (3)), passando a abertura de cada tubo de vidro pela chama da lamparina. Por avaria do fitoclima, as placas e os tubos foram deixados em tabuleiros, num local com temperatura entre os 20 e os 25 °C e fotoperíodo natural. Periodicamente, registou-se a evolução de cada gomo, retirando-se os gomos contaminados e repicando-se cada vez que o meio estava a ficar oxidado. Pelo menos uma vez por mês, procedeu-se à repicagem de todos os explantes e multiplicação sempre que possível. Os primeiros ensaios foram realizados com o meio MS com BA, tendo depois passado a ser utilizado o meio MS modificado com zeatina.



Figura 17. (1) Material para a instalação dos gomos na câmara de fluxo laminar; (2) Gomos instalados em caixas de Petri; (3) Gomos instalados em tubos de vidro.

3.2.6. Enraizamento de rebentos

Os gomos que deram origem a rebentos com maior crescimento foram utilizados para testar o protocolo de enraizamento. Para este prepararam-se dois meios, o meio de indução com auxinas, e o meio de desenvolvimento das raízes, sem auxinas, cuja composição se apresenta no **Quadro 5**, variando-se a concentração de IBA no meio de indução e a quantidade de agar (**Quadro 6**).

Quadro 5. Composição base dos meios de cultura para o enraizamento.

Concentrações dos componentes		Meio MS modificado com IBA	Meio MS modificado sem IBA
Soluções de Macronutrientes	KH ₂ PO ₄	10 mL/L	10 mL/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	10 mL/L	10 mL/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	10 mL/L	10 mL/L
	NH ₄ NO ₃	5 mL/L	5 mL/L
	KNO ₃	5 mL/L	5 mL/L
Solução de Micronutrientes		5 mL/L	5 mL/L
Ferro		5 mL/L	5 mL/L
Mio-inositol		0,1 g/L	0,1 g/L
Sacarose		15 g/L	15 g/L
Agar		-	6 g/L
Vitaminas	Pirimidina	1 mL/L	1 mL/L
	Tiamina	0,2 mL/L	0,2 mL/L
	Ácido nicotínico	1 mL/L	1 mL/L
	Glicina	4 mL/L	4 mL/L
pH		5,7	5,7

Quadro 6. Variações do meio MS modificado para indução de raízes.

Frascos	1	2	3	4	5	6	7	8
IBA (μM)	100	100	50	50	10	10	5	5
Agar (g)	0,75	-	0,75	-	0,75	-	0,75	-

Os meios foram esterilizados por autoclavagem e plaqueados em caixas de Petri na câmara de fluxo laminar (**Figura 18**). Nas caixas utilizadas para o meio sem agar, colocou-se um papel de filtro esterilizado com furos na base, de modo a fixar os gomos nessa posição.



Figura 18. Placas de Petri com os meios de enraizamento.

3.2.7. Instalação dos gomos no meio de enraizamento

Os rebentos com maior crescimento foram repicados para caixas de Petri com os meios de cultura com IBA, repartindo os rebentos por caixas com diferentes concentrações de IBA, com e sem agar, de modo a avaliar quais as melhores condições para o enraizamento. Após a instalação dos rebentos, as caixas foram seladas com parafilm e colocadas na obscuridade durante uma semana (**Figura 19** (1) e (2)). Ao fim deste período, os rebentos foram repicados para o meio de cultura sem IBA e mantidos no escuro por mais uma semana. Após esse tempo, os rebentos foram transferidos para condições de luz natural mantendo-os no mesmo meio de cultura (**Figura 19** (3)). Os rebentos que apresentaram oxidação ou alguma condição que o justificasse, foram repicados.



Figura 19. (1) e (2) Caixa para simular as condições sem luminosidade; (3) Caixas de Petri com os gomos instalados em meio de enraizamento.

4. Resultados e discussão

Com a elaboração deste estudo, pretendeu-se avaliar a possibilidade de propagação do diospireiro através dos métodos de propagação *in vivo*, por estacaria, e *in vitro*, por micropropagação. Estabeleceu-se um conjunto de ensaios de estacaria *in vivo* e outro de propagação vegetativa *in vitro*, para analisar as condições em que estes métodos devem ser executados, bem como a eficiência de cada um, de modo a selecionar o método alternativo à propagação seminal mais favorável à propagação desta cultura.

4.1. Ensaio de estacas

No primeiro ensaio (13/04/22), verificou-se que as estacas mergulhadas em 6000 mg/L de IBA durante 20 segundos apresentaram um maior número de gomos desenvolvidos (**Figura 21**). No entanto, nenhuma estaca enraizou nem teve um crescimento visível, acabando por secar ao fim de algumas semanas (**Figura 21**). A falta de controlo ambiental (temperatura e humidade) e a ausência de nebulização poderão ter sido as causas deste resultado.

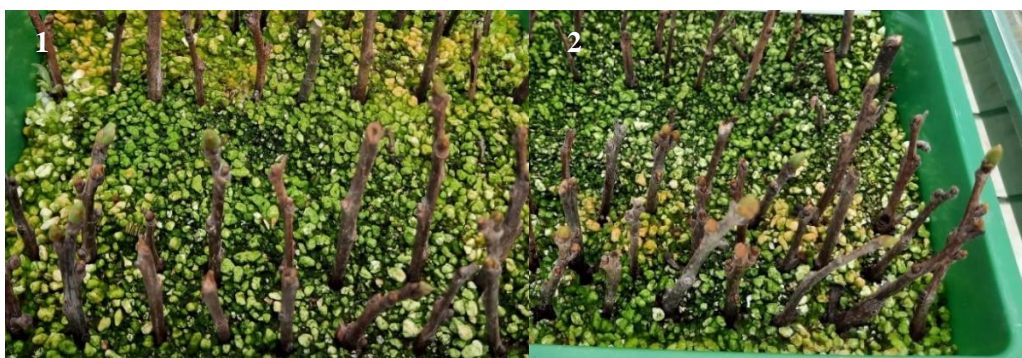


Figura 20. (1) Estacas mergulhadas em 3000 mg/L de IBA durante 20 segundos; (2) estacas mergulhadas em 6000 mg/L de IBA durante 20 segundos.

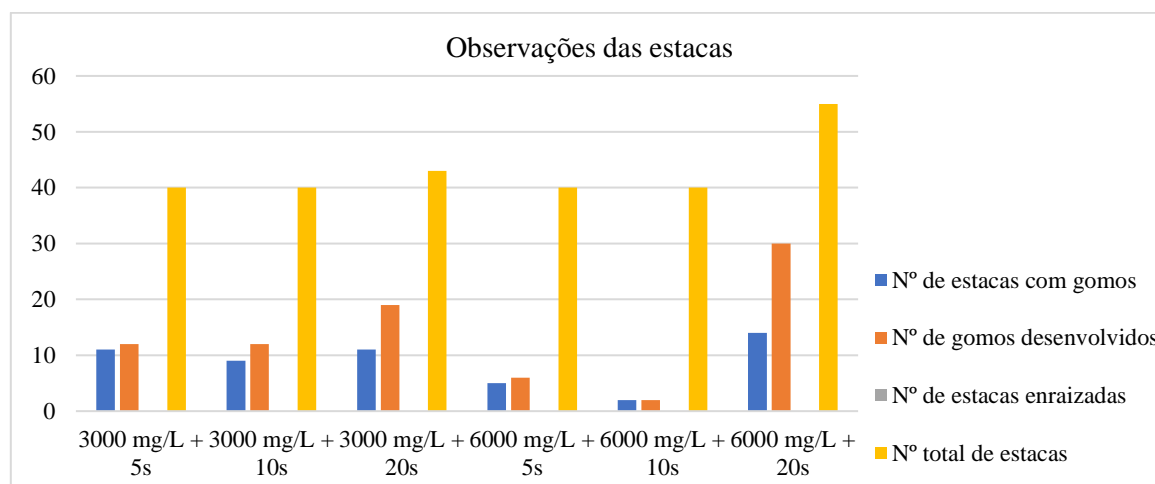


Figura 21. Observações das estacas realizadas no 1º ensaio.

No segundo ensaio realizado (17/5/2022), o material vegetal estava já num estado mais herbáceo (**Figura 22**) e foi apenas utilizada a solução com 6000 mg/L de IBA e todas as estacas foram mergulhadas nesta durante 20 segundos. Deste ensaio não sobreviveu nenhuma estaca, nem se observaram gomos com desenvolvimento. Também foi registado o aparecimento de fungos na maioria das estacas. Durante este ensaio as temperaturas atmosféricas foram bastante elevadas, o que, associado à incapacidade de humedecimento permanente (por falta de meios), poderá ter levado à morte das estacas por excesso de calor.



Figura 22. Estacas de um material vegetal mais herbáceo, utilizadas no 2º ensaio.

Apesar da escolha do IBA para estes ensaios ter sido baseada em estudos de diferentes autores, o regulador de crescimento escolhido – o IBA – e a sua concentração podem não ter sido os mais eficazes para o genótipo em teste nas condições disponíveis.

Assim, os resultados de ambos os ensaios de estacas foram condicionados negativamente pelas condições da estufa e da falta de nebulização, bem como porventura pelo regulador de crescimento escolhido.

4.2. Ensaio de micropropagação

Nos ensaios preliminares de micropropagação, realizados em caixas de Petri (**Figura 23** e **Figura 24**), verificou-se que as placas com gomos sujeitos ao tratamento com fungicida apresentaram uma maior taxa de gomos não contaminados (**Figura 25**).

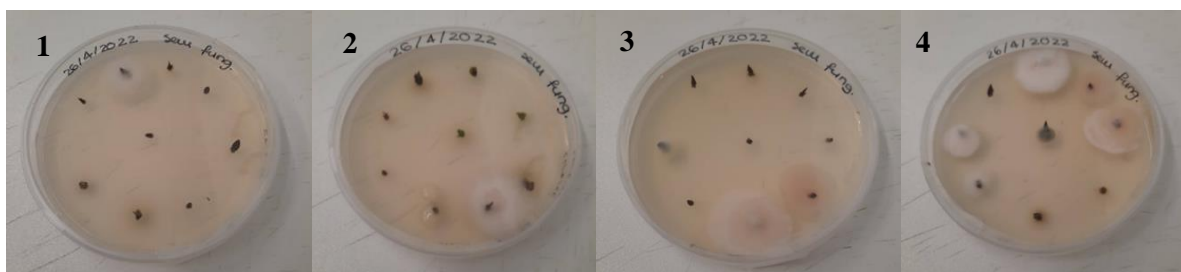


Figura 23. Caixas de Petri com os gomos sem fungicida.

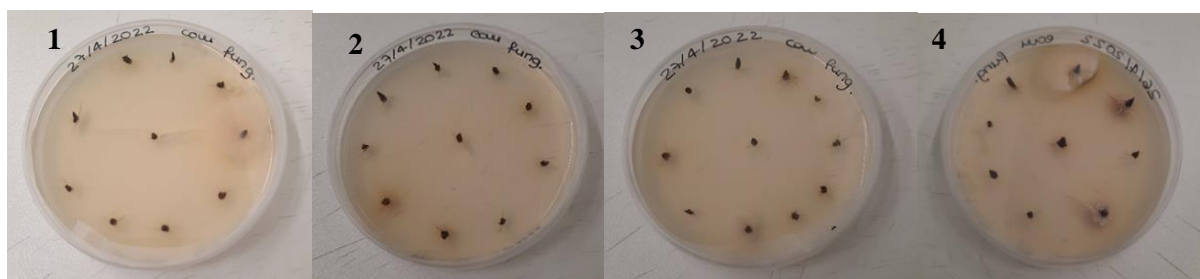


Figura 24. Caixas de Petri com os gomos com fungicida.

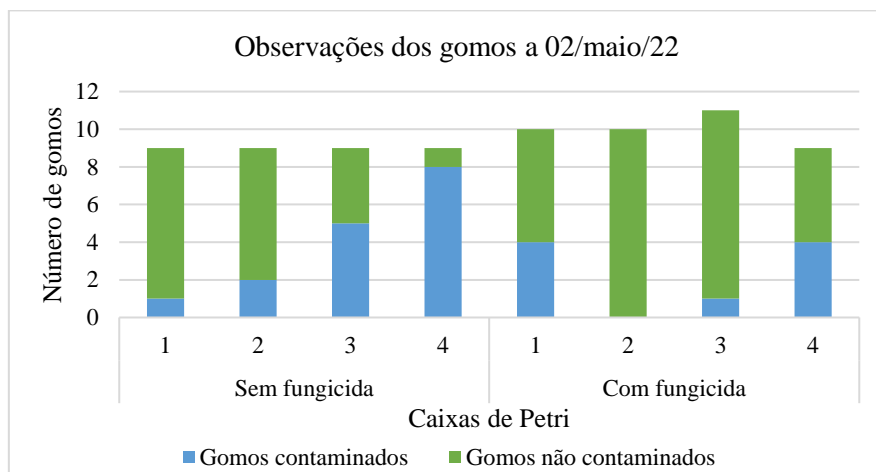


Figura 25. Contagem dos gomos contaminados e não contaminados a dia 02 de maio de 2022.

As contaminações mais frequentemente observadas resultaram de fungos, como se pode ver no **Quadro 7**.

Quadro 7. Observações dos ensaios preliminares feitos em caixas de Petri.

Data da observação	Método de Desinfecção	Caixas	Gomos			Porcentagem de gomos não contaminados
			Contaminados	Não contaminados	Total	
2/maio/22	M inicial	1	1 (com fungos)	8	9	88,89
		2	2 (1 com bactérias e 1 com fungos)	7	9	77,78
		3	5 (4 com fungos e 1 com bactérias)	4	9	44,44
		4	8 (6 com fungos e 2 com bactérias)	1	9	11,11
	M inicial com carbendazim e	1	4 (1 com fungos e 3 com bactérias)	6	10	60
		2	0	10	10	100
		3	1 (fungo)	10	11	90,91
		4	4 (1 por fungos e 3 por bactérias)	5	9	55,56

Os gomos sem contaminação visível instalados em placa de Petri foram mantidos em cultura, mas não houve desenvolvimento de nenhum deles, acabando por ficarem oxidados e inviáveis ao fim de alguns dias. No seguimento destes resultados, optou-se por mudar as culturas para tubos, de modo a que os gomos ficassem instalados individualmente e não houvesse o problema da disseminação das contaminações.

Relativamente aos ensaios de micropropagação realizados em tubos e utilizando o meio MS com BA, verificou-se que, independentemente do método de desinfeção utilizado – M inicial, M inicial melhorado ou M inicial melhorado 2 – os gomos apresentaram uma grande taxa de contaminações, acabando por não sobreviver nenhum (**Quadro 8**).

Também foi possível observar que a utilização de um fungicida aplicado diretamente no gomo instalado, não conferiu um aumento da eficiência de desinfeção dos mesmos.

Quadro 8. Observações dos gomos instalados em meio MS com BA.

Data da instalação	Data da observação	Método de desinfeção	Percentagem de gomos (%)		Total de gomos instalados
			Contaminados	Não contaminados	
4/maio/22	10/maio/22	M inicial sem fungicida	82,61	17,39	23
		M inicial com fungicida	100	0	13
5/maio/22	10/maio/22	M inicial sem fungicida	100	0	9
		M inicial com fungicida	100	0	11
9/maio/22	23/maio/22	M inicial sem fungicida	57,14	42,86	14
		M inicial melhorado	100	0	11
23/maio/22	30/maio/22	M inicial sem fungicida	100	0	3
		M inicial melhorado	25	75	4
26/maio/22	30/maio/22	M inicial sem fungicida	64,29	35,71	14
		M inicial sem fungicida (com fungicida no meio)	22,22	77,78	9
		M inicial com fungicida	37,5	62,5	8
		M inicial melhorado	66,67	33,33	9
02/junho/22	07/junho/22	M inicial melhorado 2	75	25	44
03/junho/22	07/junho/22	M inicial melhorado 2	56	44	25

Os gomos instalados que não apresentaram contaminações à data da primeira observação, foram repicados para tubos com meio de cultura fresco. No entanto, não se observou nenhum desenvolvimento considerável dos gomos, e estes acabaram por desenvolver contaminações ou oxidar, não sobrevivendo nenhum. Optou-se então por seguir duas novas vias, novas abordagens de desinfecção, que porventura comprometessem menos a viabilidade dos gomos, e um meio de cultura com outra citocinina, uma vez que o MS com BA não pareceu ser muito apropriado para esta cultura, uma vez que os gomos não apresentaram um bom desenvolvimento e acabaram por não sobreviver (embora a esta data não se pudesse quantificar qual o contributo do meio e o contributo do processo de desinfecção para o insucesso do desenvolvimento dos gomos).

Testaram-se então 5 métodos de desinfecção diferentes (M1 a M5), passando a instalação a ser feita em meio MS modificado com zeatina. Os resultados obtidos mostraram que os métodos de desinfecção **M1** e **M4** apresentaram uma maior eficácia em termos de descontaminação, permitindo obter uma menor percentagem de gomos contaminados (**Figura 26**). Em conjugação com estes métodos de desinfecção, a instalação em MS modificado com zeatina permitiu observar o desenvolvimento dos gomos (**Figura 27**).

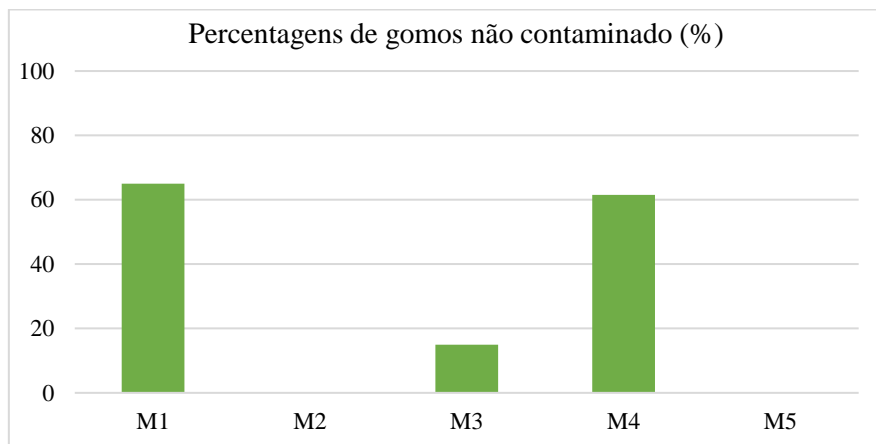


Figura 26. Percentagem de gomos não contaminados para cada método de desinfecção.



Figura 27. Gomos instalados em meio MS modificado com zeatina.

Relativamente ao meio de cultura MS modificado com zeatina, os ensaios revelaram que os gomos (e, posteriormente, os rebentos) instalados neste meio apresentaram melhor desempenho comparativamente aos gomos instalados no meio MS com BA. Efetivamente, o meio MS modificado com zeatina permitiu obter uma elevada taxa de abrolhamentos dos gomos instalados (**Figura 28**).

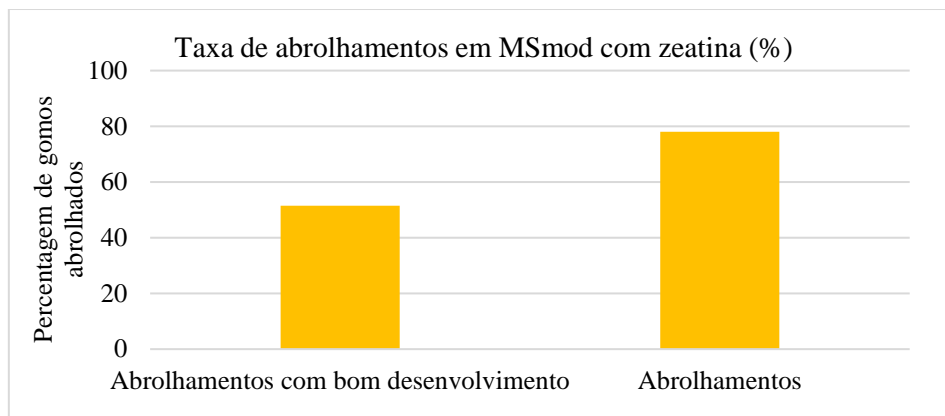


Figura 28. Taxa de abrolhamentos no meio de cultura MS modificado com zeatina.

Os métodos de desinfecção com melhor eficácia de descontaminações (M1 e M4) não parecem ter influenciado diferencialmente a viabilidade dos gomos, sendo semelhantes os padrões de evolução dos mesmos provenientes destes dois métodos nas duas datas ensaiadas (**Figura 29** e **Figura 30**).

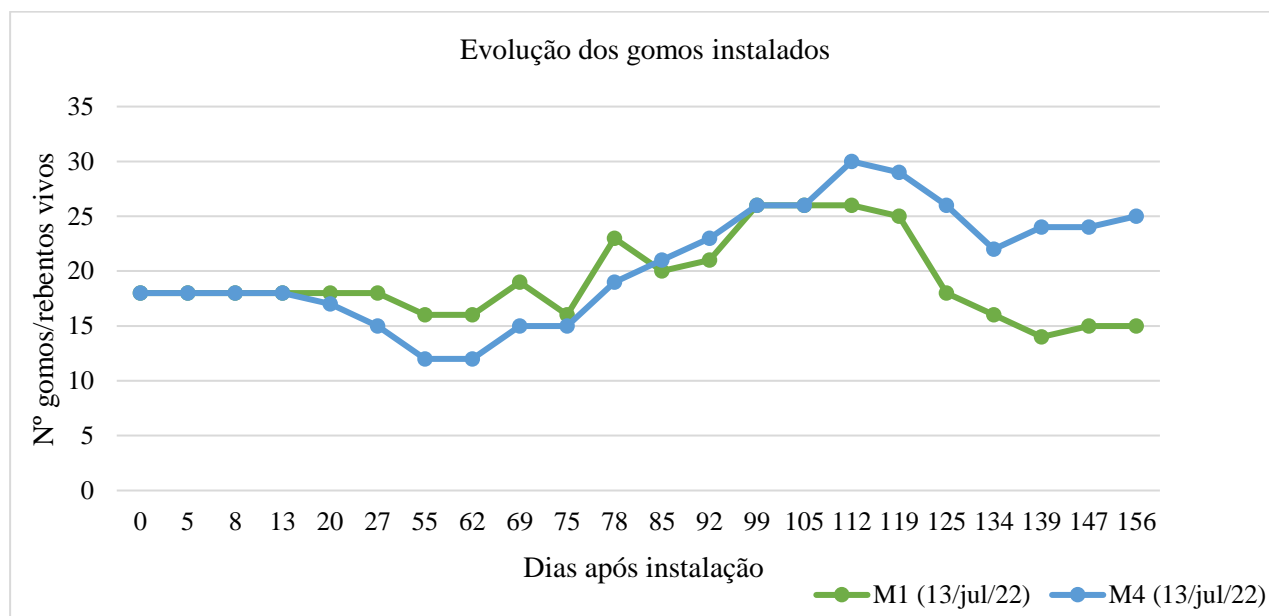


Figura 29. Evolução dos gomos/rebentos instalados a 13 de julho de 2022, com os métodos de desinfecção M1 e M4.

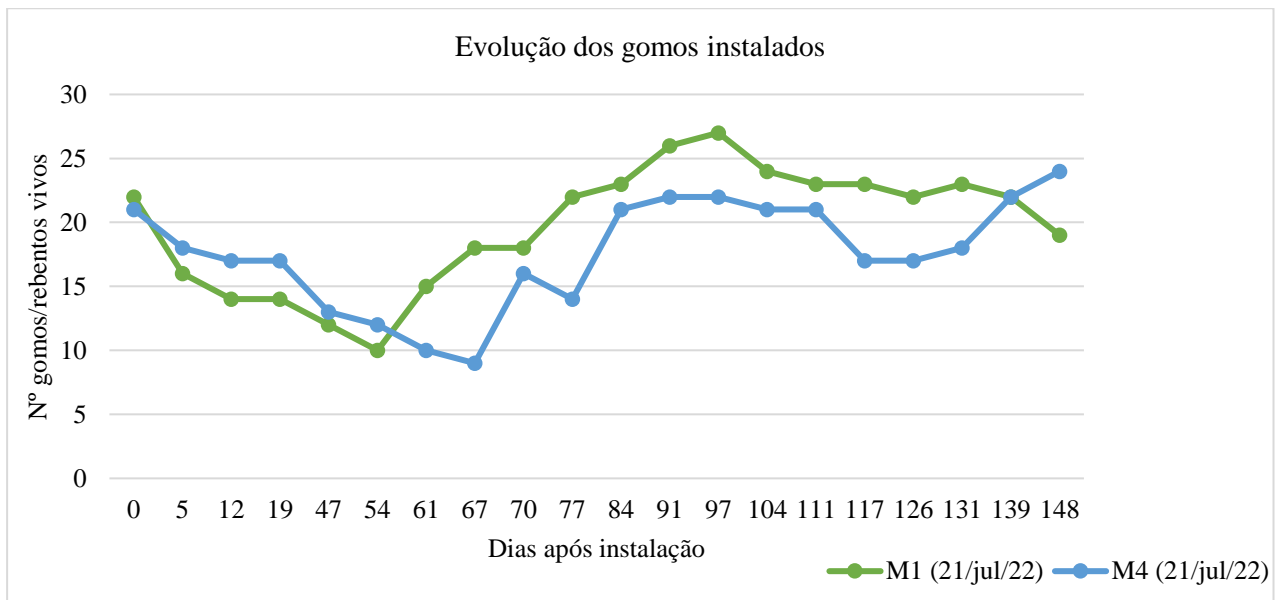


Figura 30. Evolução dos gomos/rebentos instalados a 21 de julho de 2022, com os métodos M1 e M4.

Relativamente aos métodos de desinfeção M2, M3 e M5, estes consideraram-se ineficazes para a desinfeção de gomos desta cultura, acabando por aparecerem contaminações na maioria dos gomos desinfetados com estes métodos (**Figura 31**).

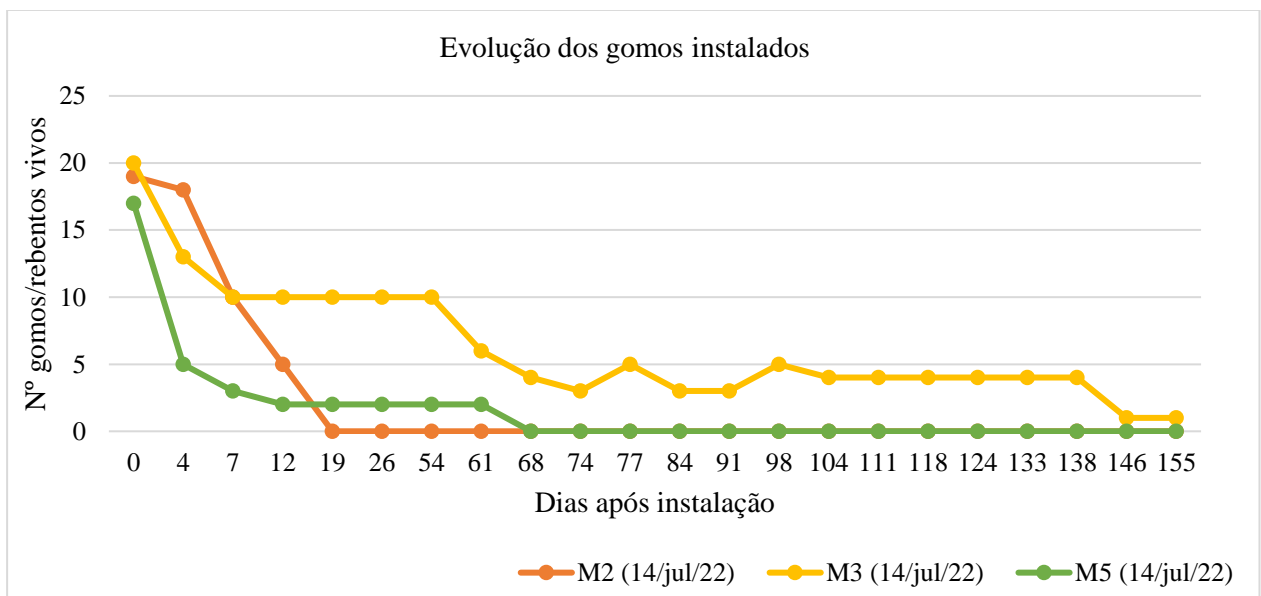


Figura 31. Evolução dos gomos/rebentos instalados a 14 de julho de 2022, com os métodos de desinfeção M2, M3 e M5.

Os rebentos que tiveram um maior desenvolvimento (**Figura 32**) foram utilizados para avaliar a capacidade de multiplicação dos mesmos, repicando-os para novos tubos com meio fresco (novamente meio MS modificado com

zeatina). A capacidade de multiplicação foi manifestada, como se pode ver nas **Figura 29** e **Figura 30**, pelo aumento de rebentos que se registou a partir dos 50-60 dias após instalação, tendo-se conseguido quase duplicar o número de rebentos no período subsequente de cerca de 60 dias.

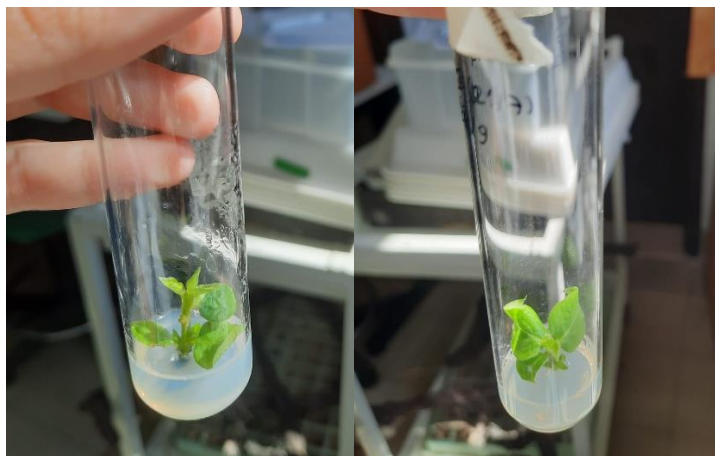


Figura 32. Alguns dos gomos mais desenvolvidos utilizados para avaliar a capacidade de multiplicação.

Os rebentos que apresentaram um bom desenvolvimento até então foram utilizados para os ensaios de enraizamento. Embora os rebentos se tenham mantido verdes e viáveis durante bastante tempo, esta etapa não obteve bons resultados, uma vez que os rebentos sujeitos à indução em meio com IBA e depois instalados no meio de enraizamento acabaram por não apresentar qualquer desenvolvimento radicular e por ficarem oxidados e inviáveis ao fim de 4 a 6 semanas. Este resultado sugere que o protocolo de enraizamento carece ainda de otimização.

5. Conclusões

Com este trabalho procurou-se avaliar a possibilidade de propagação do diospireiro através da propagação por estacaria *in vivo* e da cultura de tecidos *in vitro*.

Com base nos ensaios de estacas, a concentração de IBA e o respetivo tempo de imersão mais favoráveis ao desenvolvimento dos gomos foi de 6000 mg/L durante 20 segundos, no entanto não se observou enraizamento de nenhuma das estacas. Conclui-se que este método de propagação não é eficaz para a cultura do diospireiro, pelo menos para este genótipo e nas condições em que decorreram os ensaios. Os resultados obtidos podem ser explicados pelo regulador de crescimento utilizado e sua concentração, e também pelas condições inadequadas de humidade (falta de nebulização) e pelas temperaturas excecionalmente elevadas que existiram durante o período de tempo em que foram feitos os ensaios. De forma a contornar as limitações inerentes às temperaturas elevadas, seria mais apropriado realizar estes ensaios nos primeiros meses de primavera, em estufa com luz, temperatura e nebulização adequadas e, se possível, com bancada de enraizamento aquecida. Seria também preferível usar estacas do terço médio do ramo, onde há maior acumulação de hidratos de carbono e gomos menos diferenciados.

Com base nos resultados obtidos nos diferentes ensaios de micropropagação, sugere-se a utilização das substâncias utilizadas nos métodos de desinfecção M1 e M4 e o meio de cultura MS modificado com zeatina para a instalação de explantes de diospireiro. Estes ensaios demonstraram a possibilidade de estabelecer e desenvolver com sucesso gomos desta cultura, dando origem a rebentos micropropagados. Novamente, é necessário frisar a relevância do genótipo, sendo importante referir que, para outros genótipos, alguma adaptação poderá ser necessária.

Por sua vez, os ensaios de enraizamento demonstraram que o método escolhido foi ineficaz para esta espécie/genótipo. É de notar que estes resultados de alguma forma corroboram os resultados dos ensaios de estacas, sugerindo que pode ser necessária uma otimização da concentração de auxina usada em ambos os casos, ou da própria auxina.

Assim, globalmente, pode concluir-se que nenhum dos métodos foi muito eficaz para a propagação assexuada do diospireiro, no entanto o método de propagação que apresenta melhores condições para ser implementado é a micropropagação com o meio MS modificado com zeatina, utilizando os métodos de desinfecção M1 ou M4, que, nestas condições, permitiram a instalação e multiplicação de rebentos de diospireiro. A taxa de multiplicação observada foi próxima de 100% ao fim de dois meses.

6. Referências bibliográficas

- Agrogarante (2019). Departamento Análise Risco. Divulgação setorial – subsetor do diospiro.
- Andrade, S. R. M. (2002). Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. Embrapa, 58 (1), 9 – 16.
- Hamalton, T., Jaganathan, R. (2020). *In vitro* culture establishment and seed studies of *Diospyros buxifolia* (Blume) hiern: A slow growing timber species of Western Ghats. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 8 (1), 15 – 20. <http://www.biosciencejournals.com/>
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. Jr., Geneve, R. L. (2002). Plant Propagation: Principles and Practices (7th ed). Part III, Vegetative Propagation, Principles of Propagation by Cuttings (pp. 277 – 292). New Jersey: Prentice Hall.
- Instituto Nacional de Estatística. (2019). Estatísticas Agrícolas.
- Izhakia, A., Yitzhaka, Y., Blaua, T., Davida, I., Rotbauma, A., Riovb, J., Zilkaha, S. (2018). Rooting of cuttings of selected *Diospyros virginiana* clonal rootstocks and bud growth in rooted cuttings. Scientia Horticulturae, 232, 13 – 21. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.051>
- Lambardi, M., Ozudogru, E. A., Jain, S. M. (2013). Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. 7, (pp. 90 – 95). New York: Humana Press.
- Peche, P. M., Barbosa, C. M. A., Pio, R., Sousa, P. H. A., Valle, M. H. (2016). Estratificação das sementes, ácido giberélico e temperatura na obtenção de porta-enxertos de caquizeiros. Revista Ciência Agronômica, 47, (2), 387-392. <http://www.ccarevista.ufc.br/>
- Peixoto, P. H. P. (2017). Propagação das Plantas. Princípios e Práticas. Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Quisen, R. C., Angelo, P. C. S. (2008). Manual de Procedimento do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Embrapa, 61(1), 9 – 44.
- Regado, M. D., Guerreiro, I. M. (2013). A cultura do diospireiro no Alentejo. Vida Rural, 38 – 41.
- Soares, S. (2016) Técnicas de Manutenção do Solo na Cultura do Dióspiro. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária.
- Telles, C. A., Biasi, L. A. (2005). Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa-de-vegetação do caquizeiro (*Diospyrus kaki* L.). Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 29 (2), 481-484.
- Tetsumura, T., Ishimura, S., Takita, T., Funaki, S., Uchida, H., Hidaka, T., Haranoushiro, S., Udatsu, Y., Matsuo, M., Honsho, C., Asakuma, H. (2019). Tree Growth, Flowering, and Fruiting of ‘Taishuu’ Japanese Persimmon Grafted onto Dwarfing Rootstocks. The Horticulture Journal, 88 (1), 57 – 66. doi: 10.2503/hortj.UTD-020
- Tetsumura, T., Ishimura, S., Hidaka, T., Hirano, E., Uchida, H., Kai, Y., Kuroki, S., Uchida, Y., Honsho, C. (2015). Growth and production of adult Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) trees grafted onto dwarfing rootstocks. Scientia Horticulturae, 187, 87 – 92. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.007>

Tetsumuraa, T., Ishimuraa, S., Honshoa, C., Chijiwa, H. (2017). Improved rooting of softwood cuttings of dwarfing rootstock for persimmon under fog irrigation. *Scientia Horticulturae*, 224, 150 – 155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.007>

Tetsumura, T., Tao, R., Sugiura, A. (2001). Factors Affecting Rooting of Japanese Persimmon Hardwood Cuttings. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 70 (2), 163 – 169.

Wardani, N. C., Yuniastuti, E., Sulandjari. (2019). Micropropagation protocol of juvenile buds derived from mature persimmon (*Diospyros kaki* L.) tree. *AIP Conference Proceedings*, 030005, 1 – 5. <https://doi.org/10.1063/1.5115609>

Wendling, I. (2003). Propagação vegetativa. *I Semana do Estudante Universitário – 2003, Floresta e Meio Ambiente*. Embrapa.

Yakushiji, H., Sugiura, H., Yamasaki, A., Azuma, A., Koshita, Y. (2021). Tree growth, productivity, and fruit quality of ‘Fuyu’ persimmon trees onto different dwarfing rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 278, 1 - 7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109869>