

DAYSE CRISTINA DE CARVALHO

# **ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE SOMÁTICA DO CAQUIZEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Biasi

CURITIBA

2003



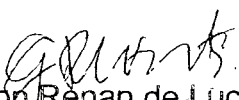
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

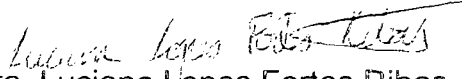
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **DAYSE CRISTINA DE CARVALHO**, sob o título "**ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE SOMÁTICA DO CAQUIZEIRO**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

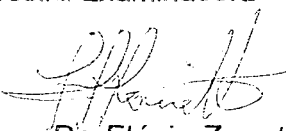
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

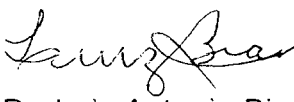
Curitiba, 10 de Março de 2003.

  
Dr. Gerson Renan de Luces Fortes  
Primeiro Examinador

  
Professor Dr. Miguel Pedro Guerra  
Segundo Examinador

  
Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas  
Terceira Examinadora

  
Professor Dr. Flávio Zanette  
Quarto Examinador

  
Professor Dr. Luiz Antonio Biasi  
Presidente da Banca e Orientador

## DEDICATÓRIA

*Mamãe,*

*“Um belo dia abandonarei este corpo que outrora prestimosamente abrigou minha alma... E neste dia vislumbrarei em breves instantes toda a trajetória percorrida... Poderei até concluir que tudo o que fiz foi em vão... Tudo em que acreditei não passaram de tolices... E ainda assim serei feliz, pois só pelo fato de ter conhecido tão nobre pessoa esta existência já terá valido à pena.”*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Antonio Biasi, pela orientação, paciência, compreensão, incentivo e pela amizade e agradável convívio em cinco anos de pesquisas.

À Prof<sup>a</sup> Luciana L.F. Ribas pela co-orientação, empréstimo de material de consulta para discussão dos resultados e pelas valiosas sugestões e apoio.

À Prof<sup>a</sup> Francine L. Cuquel, pela amizade e pelas valiosas sugestões.

Aos professores da banca de pré-defesa: Luiz Antonio Biasi, Luciana Lopes Fortes Ribas e Francine Lorena Cuquel.

Ao professor Miguel Pedro Guerra e ao Dr. Gerson Renan de Luces Fortes pelas valiosas contribuições na banca de defesa.

Ao Prof. Biasi pelas belas fotografias que tirou para este trabalho.

Ao querido José Fernando Rios pela imensurável paciência e dedicação na realização das análises estatísticas deste trabalho.

Ao Charles Allan Telles, pelos trabalhos realizados durante sua Iniciação Científica, os quais muito contribuíram para esta pesquisa.

Aos irmãos Boutin, por permitirem a coleta de material de propagação em sua propriedade.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal por permitir a realização do curso e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Flávio Zanette pela amizade, pelas valiosas sugestões e pela apresentação de parte deste trabalho no XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura.

Aos professores e colegas da Pós-graduação pelo agradável convívio durante o curso e pelas experiências compartilhadas.

À Universidade Federal do Paraná, por permitir o uso de sua estrutura para geração de mais conhecimento para a humanidade.

Obrigada mamãe, por ter aguçado meus olhos rumo à pesquisa científica e por estar constantemente me incentivando a abraçar o trabalho com afinco e dedicação.

À maninha Lucrécia, pelo incentivo, amor e por ser um exemplo pela sua garra, esforço e persistência.

Ao maninho Júlio, pelo amor, pelo auxílio na elaboração dos abstracts e também pelo incentivo ao ingresso na pesquisa na área de Micropropagação Vegetal.

Aos organismos vegetais, por permitirem tão generosamente serem estudados, manipulados e multiplicados pelas mãos humanas.

## BIOGRAFIA DA AUTORA

**DAYSE CRISTINA DE CARVALHO**, filha de Sonia Maria de Carvalho e César de Carvalho, nasceu em Curitiba, Estado do Paraná aos 19 dias do mês de fevereiro do ano de 1973.

Cursou o ensino de primeiro grau no Colégio Nossa Senhora do Rosário (Curitiba, PR) e o segundo grau no Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná (CEFET/PR), onde concluiu o curso de Auxiliar Técnico em Desenho Industrial. Em 1994 ingressou no Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Paraná e em 1996 foi transferida para o Curso de Engenharia Agrônoma, recebendo o grau de engenheiro em março de 2001.

Durante a graduação concluiu vários estágios e cursos de extensão de curta duração. Foi Bolsista de Iniciação Científica no período de 1998 a 2000, desempenhando pesquisa na área de micropropagação vegetal.

No ano de 2001 ingressou no Curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
1.1 REFERÊNCIAS .....	3
<b>2. ORGANOGÊNESE A PARTIR DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS DO CAQUIZEIRO 'FUYU' ....</b>	5
RESUMO .....	5
2.1 INTRODUÇÃO .....	6
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	7
2.2.1 Fonte de explantes e assepsia .....	7
2.2.2 Experimento com agentes solidificantes .....	8
2.2.3 Experimento com aminoácidos .....	8
2.2.4 Tipos e concentrações de citocininas .....	9
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	9
2.3.1 Experimento com agentes solidificantes .....	9
2.3.2 Experimento com aminoácidos .....	11
2.3.3 Tipos e concentrações de citocininas .....	12
2.4 CONCLUSÕES .....	14
2.5 REFERÊNCIAS .....	15
<b>3. ORGANOGÊNESE DE SEGMENTOS RADICULARES DE CAQUIZEIRO</b> .....	18
RESUMO .....	18
3.1 INTRODUÇÃO .....	19
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.2.1 Efeito de reguladores de crescimento na indução de brotações adventícias .....	21
3.2.2 Enraizamento das brotações .....	21
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
3.3.1 Efeito de reguladores de crescimento na indução de brotações adventícias .....	22
3.3.2 Enraizamento das brotações .....	25

3.4 CONCLUSÕES .....	28
3.5 REFERÊNCIAS .....	28
<b>4. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAQUIZEIRO .....</b>	<b>31</b>
RESUMO .....	31
4.1 INTRODUÇÃO .....	32
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.2.1 Efeito do estágio de desenvolvimento do embrião zigótico na indução de culturas embriogênicas .....	33
4.2.2 Efeito de reguladores de crescimento na manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas .....	36
4.2.3 Efeito de reguladores de crescimento na maturação dos embriões somáticos .....	36
4.2.4 Efeito de reguladores de crescimento na conversão de embriões somáticos em plantas .....	36
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.3.1 Efeito do estágio de desenvolvimento do embrião zigótico na indução de culturas embriogênicas .....	37
4.3.2 Efeito de reguladores de crescimento na manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas .....	40
4.3.3 Efeito de reguladores de crescimento na maturação dos embriões somáticos .....	43
4.3.4 Efeito de reguladores de crescimento na conversão de embriões somáticos em plantas .....	46
4.4 CONCLUSÕES .....	49
4.5 REFERÊNCIAS .....	49
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>52</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 Efeito das citocininas BAP, TDZ, 2-iP e Zeatina nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{M}$ , associadas à auxina AIA 0,01 $\mu\text{M}$ sobre o desenvolvimento organogênico de segmentos radiculares de caquizeiro .....	24
FIGURA 3.2 Efeito do período de permanência em meio de cultura com 10 $\mu\text{M}$ de AIB, no enraizamento das brotações de caquizeiro .....	27
FIGURA 4.1 Frutos de caquizeiro utilizados como fonte de explantes para os experimentos de embriogênese somática. A: Fruto com 4 semanas de desenvolvimento; B: Fruto com 7 semanas; C: Fruto com 10 semanas; D: Fruto com 13 semanas; E: Fruto com 16 semanas; F: Fruto com 22 semanas de desenvolvimento .....	35
FIGURA 4.2 Complexos celulares pró-embriogênicos formados a partir de embriões zigóticos em meio $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ suplementado com 10 $\mu\text{M}$ de 2,4-D e 2 $\mu\text{M}$ de cinetina aos 150 dias de cultivo .....	39
FIGURA 4.3 Embriões somáticos globulares formados em meio $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ suplementado com 5 $\mu\text{M}$ de 2,4-D e 2 $\mu\text{M}$ de cinetina aos 90 dias de cultivo .....	42
FIGURA 4.4 Embriões somáticos em estágio torpedo e cotiledonar aos 60 dias de cultivo em meio $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ suplementado com 2-iP em diferentes concentrações. A e B: Embriões em estágio torpedo em meio com 5 $\mu\text{M}$ de 2-iP; C: Embrião em estágio cotiledonar cultivado em meio com 10 $\mu\text{M}$ de 2-iP; D: Embrião em estágio cotiledonar em meio com 5 $\mu\text{M}$ de 2-iP .....	45
FIGURA 4.5 Plântulas formadas a partir de embriões somáticos cultivados durante 30 dias em meio $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ suplementado com 5 $\mu\text{M}$ de 2-iP, 5 $\mu\text{M}$ de $\text{AG}_3$ e 0,5 $\mu\text{M}$ de AIB ..	48



## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 Efeito dos agentes solidificantes do meio de cultura no desenvolvimento de ápices meristemáticos do caquizeiro 'Fuyu' .....	10
TABELA 2.2 Efeito de diferentes aminoácidos no desenvolvimento de ápices meristemáticos do caquizeiro 'Fuyu' .....	11
TABELA 2.3 Efeito de diferentes concentrações de 2-iP na indução do crescimento de ápices meristemáticos do caquizeiro 'Fuyu' .....	13
TABELA 2.4 Efeito de diferentes concentrações da citocinina zeatina na indução do crescimento de ápices meristemáticos do caquizeiro 'Fuyu' .....	13
TABELA 3.1 Efeito das citocininas BAP, TDZ, 2-iP e Zeatina nas concentrações de 1 e 10 $\mu$ M, associadas à auxina AIA 0,01 $\mu$ M sobre o desenvolvimento organogênico de segmentos radiculares de caquizeiro .....	23
TABELA 3.2 Efeito do período de permanência em meio de cultura com 10 $\mu$ M de AIB, no enraizamento das brotações de caquizeiro .....	27
TABELA 4.1 Efeito de duas diferentes concentrações de 2,4-D na indução de massas pró-embriogênicas a partir de calos obtidos em meio de cultura com 20 $\mu$ M de 2,4-D e 2 $\mu$ M de cinetina (150 dias de cultivo) .....	38
TABELA 4.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas (90 dias de cultivo) .....	41
TABELA 4.3 Efeito de reguladores de crescimento na maturação dos embriões somáticos (60 dias de cultivo) .....	43
TABELA 4.4 Efeito de reguladores de crescimento na conversão dos embriões somáticos em plantas (30 dias de cultivo) .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indolacético
BAP	6-benzilaminopurina
Cinetina	6-furfurilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AG <sub>3</sub>	Ácido giberélico = 2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metilene-gib-3-ene-1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
CV (%)	Coefficiente de variação
2-iP	2-isopenteniladenina
MS $\frac{1}{2}$ NO <sub>3</sub>	Meio de cultura MS, modificado com a metade da concentração de nitrato
MS	MURASHIGE & SKOOG (1962)
PIC	Picloram = ácido 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico
TDZ	Tidiazuron = 1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-il) urea
WPM	Woody Plant Medium (LLOYD & MCCOWN, 1980)

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o estudo da regeneração do caquizeiro através da organogênese a partir de ápices meristemáticos, segmentos radiculares e embriogênese somática, de forma a contribuir para o estabelecimento de protocolos eficientes para a propagação *in vitro* do caquizeiro. Ápices meristemáticos foram isolados em meio de cultura MS½NO<sub>3</sub>, solidificado com ágar (6 g.L<sup>-1</sup>) ou Phytigel® (2 g.L<sup>-1</sup>) e também em meio com diferentes aminoácidos (40 mg.L<sup>-1</sup>): adenina, asparagina, glutamina, glicina, cisteína, alanina e arginina. Foram também testadas as citocininas 2-iP e zeatina, nas concentrações 0, 1, 5, 10 e 20 µM. Para o desenvolvimento dos explantes os melhores resultados foram os aminoácidos adenina, cisteína e arginina e o ágar como agente solidificante. Zeatina na concentração de 20 µM induziu as maiores taxas de formação de calos com gemas (55%) e maior número de gemas maiores do que 5mm (40 gemas por calo). Embriões germinados *in vitro* tiveram suas raízes seccionadas e isoladas em meio de cultura MS½NO<sub>3</sub> com 0,01 µM de AIA e 1 e 10 µM de zeatina, BAP, 2-iP e TDZ. Para o enraizamento das brotações foram testados quatro períodos de permanência em meio com 10 µM de AIB: 0, 5, 10 e 15 dias. Para a aclimatização das plantas obtidas foram testados quatro substratos: solo, vermiculita, Plantmax® e casca de arroz carbonizada. A maior regeneração de brotos (1,2 brotos por explante) ocorreu na combinação de 1 µM de zeatina com 0,01 µM de AIA. As brotações juvenis obtidas possuem potencial natural para o enraizamento, não necessitando de tratamento com AIB. A taxa média de sobrevivência das plantas aclimatizadas foi de 7,18%. Embriões zigóticos em diversos estádios de desenvolvimento, retirados de frutos coletados de plantas adultas a campo a partir de 4 semanas após o pleno florescimento até 22 semanas foram isolados em meio MS½NO<sub>3</sub>, suplementado com 20 µM de 2,4-D e 2 µM de cinetina. Os calos escuros obtidos foram repicados para outro meio de indução, com 10 ou 20 µM de 2,4-D e 2 µM de cinetina. Os calos com massas pró-embriogênicas obtidos foram transferidos para meio de manutenção e multiplicação com cinetina 2 µM e 2,4-D nas concentrações 2,5; 5,0 e 10 µM. As massas embriogênicas formadas foram colocadas em meio suplementado com 0,5 µM de AIB e as concentrações 5, 10 e 20 µM de 2-iP para a maturação dos embriões somáticos. Os embriões formados foram isolados em dois meios de conversão, sendo o primeiro com 5 µM de 2-iP, 5 µM de AG<sub>3</sub> e 0,5 µM de AIB e o segundo com 0,5 µM de AG<sub>3</sub> e BAP nas concentrações 0; 0,25, 0,5 e 1,0 µM. Obteve-se o padrão indireto de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos com mais de 22 semanas de formação, quando cultivados em meio de cultura com 10 µM de 2,4-D e 2 µM de cinetina. A manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas foi mais eficiente com 5 µM de 2,4-D, na qual os pró-embriões avançaram à fase de embrião globular. Na fase de maturação as concentrações de 2-iP testadas atuaram promovendo os embriões globulares a estádios mais avançados da ontogenia como cordiforme, torpedo e cotiledonar. A suplementação do meio de cultura com 1 µM de BAP, gerou a formação de plantas mais desenvolvidas, com maior número e tamanho de folhas.

Palavras-chave: *Diospyros kaki*, cultura de tecidos, reguladores de crescimento, fruticultura, micropropagação.

## ABSTRACT

The aim of this work was to study the *in vitro* morphogenesis of persimmon using shoot tips, root segments and somatic embryogenesis in order to contribute to the establishment of efficient protocols for *in vitro* propagation of persimmon. Shoot tips were isolated in  $MS\frac{1}{2}NO_3$  culture medium, solidified with agar ( $6g.L^{-1}$ ) or Phytigel® ( $2g.L^{-1}$ ) and also in medium with different aminoacids ( $40mg.L^{-1}$ ): adenine, asparagine, glutamine, glycine, cistein, alanin and arginin. Cytokinins 2-iP and zeatin were also tested concentrations of 1, 5, 10 e 20  $\mu M$ . The best results for explant development were the amino acids adenine, cistein and arginine using agar as solidifying agent. Zeatin at 20  $\mu M$  induced the highest rates of calli formation with buds larger than 5mm. *In vitro* embryos germinated had the roots sectioned and isolated in  $MS\frac{1}{2}NO_3$  culture medium with 0.01  $\mu M$  IAA and 1 or 10  $\mu M$  of zeatin, BAP, 2-iP e TDZ. To test bud rooting, four remaining periods (0, 5, 10 and 15 days) were evaluated, using  $MS\frac{1}{2}NO_3$  medium with 10  $\mu M$  IBA. For plant acclimatization, four different substrates were tested (soil, vermiculite, Plantmax® and carbonized rice hull). The best bud regeneration rates (1.2 buds/explant) was observed when a combination of 1  $\mu M$  zeatin with 0.01  $\mu M$  IAA was used. The obtained young buds presented natural potential for rooting, with no need of IBA treatment. The average percentage of survival of acclimatized plants was 7.18%. Zygotic embryos in several development phases where excised from fruits collected from adult plants on field (in a period ranging from 4 weeks after full bloom until 22 weeks), and isolated in  $MS\frac{1}{2}NO_3$  medium, supplemented with 20  $\mu M$  2,4-D + 2  $\mu M$  kinetin. The obtained dark calli were transferred to another induction medium, containing 10 and 20  $\mu M$  2,4-D + 2  $\mu M$  kinetin. The obtained calli with pro-embryogenic masses therefore were transferred to a medium for maintenance and multiplication containing 2  $\mu M$  kinetin and 2,4-D in the concentrations 2.5; 5.0 and 10  $\mu M$ . The formed embryogenic masses were transferred to a medium supplemented with 0.5  $\mu M$  IBA and 5, 10 and 20  $\mu M$  2-iP for maturation of somatic embryos. The formed embryos were then isolated in two conversion media, one containing 5  $\mu M$  2-iP + 5  $\mu M$   $GA_3$  + 0.5  $\mu M$  IBA, and another containing 0.5  $\mu M$   $GA_3$  and 0; 0.25, 0.5 and 1.0  $\mu M$  BAP. An indirect standard of somatic embryogenesis from zygotic embryos with more than 22 weeks of formation was obtained when cultivated in culture media containing 10  $\mu M$  2,4-D with 2  $\mu M$  kinetin. The maintenance and multiplication of the embryos was more efficient when 5  $\mu M$  2,4-D was used, in which the pro-embryos advanced to the phase of globular embryos. In the maturation phase, the evaluated of 2-iP resulted an more advanced phases of embryos ontogeny, such as cordiform, torpedo and cotyledonary. The culture medium supplementation of 1  $\mu M$  BAP generated the best developed plants, with greater number and size of the leaves.

keywords: *Diospyros kaki*, tissue culture, growth regulators, fructiculture, micropropagation.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas frescas do mundo, com cerca de 35 milhões de toneladas anuais, responsáveis por 4 milhões de empregos diretos e um PIB agrícola em torno de US\$ 11 bilhões, segundo o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF, 2002).

A inserção do Estado do Paraná na fruticultura brasileira se faz pela produção de várias espécies de frutas, como laranja, tangerina, banana, uva, melancia, maçã e abacate, sendo que a produção de caquis ocupa o oitavo lugar no ranking estadual, dentre as 22 frutas mais produzidas (EMATER/PR, 2000). O Paraná é 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 47,8 milhões de reais. 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 caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) é uma espécie de clima subtropical a temperado, pertencente à família *Ebenaceae* e originário do continente asiático. Vem sendo cultivado há séculos na Coréia, China e Japão, sendo este último o maior produtor mundial de caquis. Atualmente o cultivo tem crescido muito em outros países como os Estados Unidos, Israel, Brasil e Nova Zelândia (TAO & SUGIURA, 1992).

No Brasil, chegou provavelmente no final do século XIX, aclimatou-se muito bem e começou a ser explorado comercialmente (SATO, 2002). Seus frutos são muito apreciados devido ao seu elevado teor de açúcares (14 a 18%), que supera o da maioria das frutas de consumo popular. Sua polpa concentra também boas quantidades de caroteno (vitamina A) e vitaminas do complexo B e C (BENASSI, 2003).

O caqui brasileiro é exportado para diversos países como: Alemanha, Países Baixos, Inglaterra, Suíça, Canadá, Portugal, Áustria e Bélgica, se constituindo numa importante fonte de renda para a fruticultura nacional. A cultivar preferida tanto no mercado externo quanto interno é a 'Fuyu', devido a sua característica de produzir frutos não taninosos, podendo ser consumido sem que haja necessidade da aplicação do processo de destaninização (PENTEADO, 1986; SIMÃO, 1998).

A propagação convencional de caquizeiros, pela via sexuada é difícil, devido ao seu longo período juvenil, elevado porte das plantas e heterozigose genética. Além disso, o cruzamento é prejudicado pelo limitado número de cultivares, que carregam flores

masculinas e/ou hermafroditas (CHOI *et al.*, 2001). A propagação vegetativa via enxertia é também dificultada pelo fato dos porta-enxertos serem provenientes de sementes, o que causa uma grande desuniformidade quanto ao porte e vigor das plantas, além de ser um processo demorado, oneroso e com baixas taxas de pegamento (BIASI *et al.*, 2002). Além disso, o caquizeiro apresenta grande dificuldade de enraizamento por meio de estacas caulinares (TAO & SUGIURA, 1992). RUBBO (1989) realizou uma série de experimentos com a estaquia lenhosa e herbácea da cultivar Giombo, testando diversas concentrações de AIB em imersão rápida e lenta, em diferentes épocas do ano e não obteve nenhuma estaca enraizada.

BIASI *et al.* (2002) investigaram o potencial rizogênico em tecidos caulinares nos sistemas de estaquia, mergulhia e alporquia, aplicando diferentes concentrações de AIB e não obtiveram nenhuma estaca enraizada. A solução para esse problema requer avanços na pesquisa de forma a estabelecer uma tecnologia de propagação vegetativa para formação direta das mudas ou de porta-enxertos, o que representará um significativo avanço na cultura do caquizeiro (MARTINS & PEREIRA, 1989).

A obtenção de mudas de caquizeiro pela utilização de métodos disponíveis pela biotecnologia vegetal vem sendo investigada desde a década de 70 (YOKOYAMA & TAKEUCHI, 1976). Outros trabalhos foram desenvolvidos com a cultura de tecidos de caquizeiro, a maior parte deles em universidades japonesas (BIASI *et al.*, 1999).

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).

No Brasil, os trabalhos pioneiros com cultivo *in vitro* de caquizeiro foram realizados por BIASI *et al.* (1999), SALOMÃO *et al.* (1999), SALOMÃO *et al.* (2000) e BIASI *et al.* (2002), revelando resultados promissores para a clonagem da espécie.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da regeneração do caquizeiro através da organogênese a partir de ápices meristemáticos, segmentos radiculares e embriogênese somática, de forma a contribuir para o estabelecimento de protocolos eficientes para a produção de mudas de boa qualidade e em larga escala, assim como oferecer subsídios para pesquisas futuras de melhoramento do caquizeiro pela transferência de genes, as quais certamente requererão um sistema eficiente de regeneração.

## 1.1 REFERÊNCIAS

- BENASSI. **Caqui**. Disponível: <http://www.irmaosbenassi.com.br/cat/caqui.htm>. Capturado em: 25/01/2003.
- BIASI, L. A.; CARVALHO, D. C.; ANDRADE, A.; ZANETTE, F. Estabelecimento *in vitro* do caquizeiro 'Fuyu' por meio de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.3. p. 279-283, 1999.
- BIASI, L.A.; CARVALHO, D.C.; WOLF, G.D.; ZANETTE, F. Potencial organogenético de tecidos caulinares e radiculares de caquizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 29-34, 2002.
- CHOI, J.Y; KIM, H.J.; LEE, C.H; BAE, J.M.; CHUNG, Y.S.; SHIN, J.S.; HYUNG, N.Y. Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment cultures of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). **In vitro celular and developmental biology plant**, v.37, n.2, p.274-179. 2001.
- EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO PARANÁ - EMATER. Departamento de Horticultura. **Perfil periódico da Emater - 2000**. Curitiba, 2000.
- IBGE. Instituto brasileiro de geografia e estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Capturado: 04/11/2002.
- IBRAF. Banco de dados sobre fruticultura. Instituto brasileiro de frutas. Disponível: [www.ibraf.org.br](http://www.ibraf.org.br). Capturado: 04/11/2002.
- MARTINS, F.P.; PEREIRA, F.M. **Cultura do caquizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 71p.
- PENTEADO, S. R. **Fruticultura de clima temperado em São Paulo**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. 173p.
- RUBBO, M. S. **Estudo do enraizamento de estacas de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.)**. Piracicaba, ESALQ, 1989. 90p. (Dissertação de mestrado).
- SALOMÃO, L.C.C.; VIECCELLI, J.C; SIQUEIRA, D.L; OTONI, W.C.; SISTE, C.E. Micropropagação de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) por meio de gemas laterais e apicais de plantas adultas. **Revista Ceres**, v.46, n.265, p.267-277. 1999.
- SALOMÃO, L.C.C.; VIECCELLI, J.C; SIQUEIRA, D.L; OTONI, W.C. Micropropagação de caquizeiro 'Cereja'por meio de gemas apicais e laterais de plantas juvenis e adultas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.66-71. 2000.
- SATO, G.S. Mapeamento e análise da produção do caqui no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.32, n.6, p. 47-53, 2002.
- SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura**. FEALQ: Piracicaba, 1998. 760 p.

TAO, R.; SUGIURA, A. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. vol. 18. **High-Tech and Micropropagation II**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. cap. 11, p. 423-440.

YOKOYAMA, T.; TAKEUCHI, M. Organ and plantlet formation from callus in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). **Phytomorphology**, v. 26, p. 273-275. 1976.



## 2 ORGANOGÊNESE A PARTIR DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS DO CAQUIZEIRO 'FUJU'

RESUMO - O atual sistema de produção de mudas de caquizeiro pela enxertia sobre porta-enxertos provenientes de sementes gera a formação de mudas desuniformes quanto ao porte e vigor das plantas, sendo incompatível com o atual nível tecnológico requerido pela fruticultura. A micropropagação tem-se mostrado como um meio prático para a multiplicação rápida e em larga escala de clones de porta-enxertos e para a produção de mudas a partir de propágulos das cultivares comerciais. Isto poderá suprimir a utilização da enxertia, que é um processo demorado, oneroso e com baixas taxas de pagamento. O objetivo deste trabalho foi contribuir para o estabelecimento de um protocolo para a micropropagação do caquizeiro 'Fuyu' a partir de ápices meristemáticos. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas da UFPR no período de 2001 a 2002. A fonte de explantes foram estacas lenhosas coletadas de plantas adultas, durante o período de dormência do caquizeiro. A assepsia foi realizada pela imersão das estacas segmentadas em solução de benomyl ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) por 16 horas, etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% mais Tween-20 a 0,1% por 30 minutos, seguido de quatro lavagens em água deionizada e autoclavada. Os ápices meristemáticos foram isolados em meio de cultura  $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ . Para o desenvolvimento dos ápices meristemáticos foram testados dois agentes solidificantes para o meio de cultura: ágar ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ) e Phytigel® ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e diferentes aminoácidos ( $40 \text{ mg.L}^{-1}$ ): adenina, asparagina, glutamina, glicina, cisteína, alanina e arginina. Para os experimentos de agentes solidificantes e aminoácidos, o meio de cultivo foi suplementado com zeatina  $20 \mu\text{M}$ . Foram também testadas duas diferentes citocininas no cultivo dos explantes: 2-iP e zeatina, ambas nas concentrações de 0, 1, 5, 10 e  $20 \mu\text{M}$ . Os aminoácidos adenina, cisteína e arginina foram os mais eficientes no desenvolvimento dos ápices meristemáticos quanto ao número de folhas e alongamento dos brotos formados. O ágar foi o melhor agente solidificante para o meio de cultivo, resultando em maior número de brotos regenerados (4,97 brotos por explante), com maior comprimento (1,47cm). Zeatina na concentração de  $20 \mu\text{M}$  induziu as maiores taxas de formação de calos com gemas (55%) e maior número de gemas maiores do que 5mm (40 gemas por calo).

Palavras-chave: *Diospyros kaki*, cultura de tecidos, reguladores de crescimento, fruticultura, ápices meristemáticos.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O caqui brasileiro é exportado para diversos países europeus, constituindo-se numa importante fonte de renda para a fruticultura nacional (IBRAF, 2002). A cultivar preferida para exportação é a 'Fuyu', alcançando também melhor cotação tanto no mercado interno quanto externo, devido à sua característica de produzir frutos não taninosos (PENTEADO, 1986). Pertence ao grupo Amagaki, com polpa firme, amarela e que pode ser consumido sem que tenha que passar pelo processo de destaninização (SIMÃO, 1998).

O atual sistema de produção de mudas de caquizeiro, através da enxertia sobre porta-enxertos provenientes de sementes gera a formação de mudas desuniformes quanto ao porte e vigor (FUKUI *et al.*, 1989), ocasionando diversos inconvenientes para o estabelecimento de uma exploração comercial compatível com o atual nível tecnológico exigido pela fruticultura. Além disso, para a propagação vegetativa do caquizeiro, a estaquia tanto lenhosa quanto herbácea não pode ser aplicada devido à dificuldade de enraizamento das estacas (COOPER & COHEN, 1984; RUBBO, 1989; FUKUI *et al.*, 1992; TAO & SUGIURA, 1992).

A micropropagação tem-se mostrado como um meio prático para a multiplicação rápida e em larga escala de mudas. A utilização da técnica torna possível a propagação com rapidez de clones desejáveis de porta-enxertos. Outro valor potencial para a micropropagação é a produção de mudas a partir de propágulos das cultivares comerciais. Isto poderá suprimir a utilização da enxertia, que é um procedimento demorado e caro (TAO & SUGIURA, 1992).

Os trabalhos com cultura de tecidos de caquizeiro são relativamente recentes. A maioria dos trabalhos foram realizados em universidades do Japão e envolveram processos *in vitro*, como a micropropagação a partir de ápices meristemáticos (SUGIURA *et al.*, 1986) e gemas inteiras sem escamas (SARATHCHANDRA & BURCH, 1991).

O trabalho de COOPER & COHEN (1984) foi o primeiro a indicar o uso potencial do cultivo *in vitro* para a micropropagação do caquizeiro. Eles cultivaram com êxito gemas e segmentos nodais de várias cultivares em meio MS contendo  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de zeatina e obtiveram plântulas. Subseqüentemente, SUGIURA *et al.* (1986) e MURAYAMA *et al.* (1989), determinaram as condições ótimas para o estabelecimento, proliferação de brotos e enraizamento para sete cultivares de caquizeiro. Eles cultivaram gemas dormentes coletadas de plantas adultas no período do inverno em meio MS modificado pela metade da concentração de sais contendo nitrato ( $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ ) suplementado com BAP ou 2-iP em concentrações variando de 2 a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , dependendo da cultivar. O enraizamento foi

alcançado pelo tratamento da base das brotações em solução aquosa de AIB, em concentrações de 0 a 1000 mg.L<sup>-1</sup>, dependendo da cultivar. FUMURO *et al.* (1988) aplicaram esta técnica para propagar linhagens normais e anãs da cultivar Nishimurawase. É interessante notar que as brotações da linhagem normal e anã responderam diferentemente às citocininas e auxinas. FUKUI *et al.* (1987) também investigaram as condições ótimas para a micropropagação pela utilização de plântulas jovens provenientes de embriões maduros isolados de sementes. Ápices meristemáticos foram estabelecidos com sucesso e subcultivados em meio MS½NO<sub>3</sub> ou WPM suplementado com 10<sup>-5</sup> M de zeatina.

O objetivo deste trabalho foi contribuir para o estabelecimento de um protocolo para a micropropagação do caquizeiro a partir de ápices meristemáticos isolados de gemas de estacas lenhosas, estudando as fases iniciais de estabelecimento *in vitro*, testando diferentes reguladores de crescimento, aminoácidos e agentes solidificantes do meio de cultura.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná no período de 2001 a 2002. Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa estatístico MSTAT, realizando-se a análise de variância e, quando necessário, o teste adicional de Tukey a 5% de probabilidade.

### 2.2.1 Fonte de explantes e assepsia

Estacas lenhosas da cultivar Fuyu foram coletadas de plantas adultas de um pomar comercial localizado no município de Porto Amazonas (PR), durante o período de dormência do caquizeiro, tratadas com uma mistura de benomyl (1 g.L<sup>-1</sup>) e captan (1 g.L<sup>-1</sup>) e mantidas sob refrigeração (3 a 5°C) por um período de oito semanas para a quebra de dormência das gemas. As estacas foram envolvidas por jornal úmido e acondicionadas em sacos plásticos fechados até o momento da utilização.

Os explantes foram ápices meristemáticos com aproximadamente 2 mm, retirados de gemas apicais, medianas e basais das estacas lenhosas. A assepsia foi realizada pela

imersão das estacas segmentadas em solução de benomyl ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) por 16 horas, etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% mais Tween-20 a 0,1% por 30 minutos, seguido de quatro lavagens em água deionizada e autoclavada.

Os explantes isolados em meio de cultura foram levados para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

### **2.2.2 Experimento com agentes solidificantes**

Foram testados os seguintes agentes solidificantes para o meio de cultura: ágar ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ) e Phytigel<sup>®</sup> padrão Sigma ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ). O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com os sais contendo nitrato reduzidos à metade da concentração, acrescido da citocinina zeatina (Sigma), na concentração de  $20 \mu\text{M}$ , esterilizada à frio por meio de unidade filtrante estéril e descartável Millipore com membrana Durapore GV de  $0,22 \mu\text{m}$  de poro.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com cinco repetições e 20 explantes por parcela. Os explantes foram isolados em potes de 250 ml, contendo 30 ml de meio de cultura, sendo colocados quatro explantes por frasco. A avaliação foi realizada após 60 dias de instalação do experimento, pela porcentagem de explantes oxidados e brotados, número de brotos por explante, número de folhas por broto e comprimento do broto.

### **2.2.3 Experimento com aminoácidos**

Foram testados os aminoácidos padrão Vetec: adenina, asparagina, glutamina, glicina, cisteína, alanina e arginina, todos na concentração de  $40 \text{ mg.L}^{-1}$ , conforme utilizado por COOPER & COHEN (1984).

Os aminoácidos foram autoclavados juntamente com o meio de cultura. O meio de cultura foi o  $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$  acrescido da citocinina zeatina (Sigma), na concentração de  $20 \mu\text{M}$ , esterilizada à frio por meio de unidade filtrante estéril e descartável Millipore com membrana Durapore GV de  $0,22 \mu\text{m}$  de poro.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco repetições e dez explantes por parcela. Os explantes foram isolados em potes de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura, sendo colocados cinco explantes por frasco. A avaliação foi realizada aos

60 dias de condução do experimento, pelo número de explantes com brotação, número de brotos por explante, número de folhas por broto e comprimento dos brotos.

#### **2.2.4 Tipos e concentrações de citocininas**

Foram testadas as citocininas padrão Sigma zeatina e 2-iP nas concentrações 0, 1, 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  para a indução do desenvolvimento dos explantes. O meio de cultura foi o  $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ . O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições e dez explantes por parcela. Os explantes foram isolados em potes de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura, sendo colocados cinco explantes por frasco. A avaliação foi realizada aos 60 dias de condução do experimento, pela porcentagem de explantes oxidados, porcentagem de explantes com calos, porcentagem de explantes com folhas expandidas, porcentagem de calos com gemas e número de gemas maiores de 5 mm.

### **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os experimentos foram repetidos três vezes, de forma que mesmo com a perda de explantes por contaminação bacteriana foi possível a realização da análise estatística, excetuando-se o experimento de cultivo inicial com 2-iP, cuja perda de material implicou na geração de tabela contendo apenas médias das variáveis analisadas.

No entanto, a metodologia foi eficiente para experimentos anteriores não descritos neste trabalho e também em trabalhos semelhantes realizados por outros pesquisadores (SUGIURA *et al.*, 1986; TAO *et al.*, 1992).

#### **2.3.1 Experimento com agentes solidificantes**

Os resultados quanto ao número de explantes brotados, número de brotos por explante e tamanho do broto foram significativamente superiores aos encontrados para explantes cultivados em meio com Phytigel<sup>®</sup>, embora tenha-se observado uma taxa mais elevada (40%) de explantes oxidados em meios solidificados com ágar, (TABELA 2.1).

**TABELA 2.1** – Efeito dos agentes solidificantes do meio de cultura no desenvolvimento de ápices meristemáticos do caqui 'Fuyu'.

Agente solidificante	Explantos oxidados (%) <sup>1</sup>	Explantos Brotados (%)	Número de brotos/ explante	Número de folhas/ broto	Comprimento do broto (cm)
Ágar	40,00 a	96,67 a	4,97 a	5,85 a	1,47 a
Phytigel®	24,67 a	79,33 b	3,97 b	5,68 a	0,90 b
CV(%)	28,58	12,90	14,06	8,90	14,48

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em arco seno da raiz de x/100

Órgãos e tecidos vegetais são mais apropriadamente mantidos na superfície do meio de cultura quando há o aumento da sua viscosidade com algum tipo de agente geleificante (GEORGE, 1993). A preferência por um ou outro agente de solidificação depende da espécie e das condições de cultivo. WILLIAMS & TAJI (1987) encontraram maior percentagem de sobrevivência no Phytigel® do que no ágar em culturas de várias espécies lenhosas, como o Eucalipto, por exemplo. Os ápices meristemáticos de caqui cultivados em meio suplementado com Phytigel® demonstraram resposta similar ao descrito pela literatura, ocorrendo porcentagem menor de oxidação quando comparada ao explantes isolados em meio solidificado com ágar.

Geralmente o ágar é o mais comum agente solidificante utilizado para a regeneração de plantas. De qualquer forma foi relatado que o Phytigel® (Gelrite) foi superior ao ágar na promoção do desenvolvimento de brotações adventícias em culturas de macieira (WELANDER & MAHESWARAN, 1992) e cravo (MILLER *et al.*, 1991).

CHOI *et al.* (2001) em estudo comparativo das concentrações de ágar (4, 6 e 8 g.L<sup>-1</sup>) e Phytigel® (2,5 g.L<sup>-1</sup>) para o meio de cultivo do caqui, relataram que a regeneração de brotos não foi grandemente diferenciada para os quatro tratamentos, pois todos mostraram acima de 40% de regeneração. De qualquer forma, o número de brotos por explante foi mais elevado no meio contendo 4 g.L<sup>-1</sup> de ágar (4,0 brotos por explante) do que no tratamento com Phytigel® (2,8 brotos por explante), similarmente a este trabalho.

Segundo o relatado por CHOI *et al.* (2001), a regeneração de brotos aumentou em concentrações mais reduzidas de ágar (< 4 g.L<sup>-1</sup>). WELANDER & MAHESWARAN (1992) sugeriram que os agentes solidificantes podem afetar os potenciais osmóticos e taxas de difusão de nutrientes e em concentrações menos elevadas destes compostos a nutrição da planta ocorre de forma mais eficiente, resultando em melhor desenvolvimento.

Meios de cultura suplementados com Phytigel® retornaram ao estado líquido após duas semanas de cultivo dos explantes, formando também calos na base destes. Embora CALDAS *et al.* (1998) tenham citado que gomas produzidas por bactérias, formadoras do

produto solidificante do meio sejam resistentes à degradação enzimática, é possível que os compostos fenólicos liberados pelos explantes de caquizeiro tenham atuado na desestruturação da cadeia de polissacarídeos que produzem a geleificação do meio de cultivo.

### 2.3.2 Experimento com aminoácidos

O cultivo inicial dos ápices meristemáticos em meio suplementado com diferentes aminoácidos não apresentou diferenças significativas para as variáveis número de explantes com brotação e número de brotos por explante (TABELA 2.2). O efeito dos aminoácidos como promotores do crescimento dos ápices meristemáticos foi observado mais pronunciadamente nos tratamentos com adenina, cisteína e arginina, os quais originaram maior número de folhas por broto e maior comprimento do broto. Embora não tenha havido diferença significativa para a variável comprimento dos brotos entre os três melhores aminoácidos empregados, percebe-se uma tendência pela média de que a adenina seja mais eficiente no alongamento destes.

**TABELA 2.2** – Efeito de diferentes aminoácidos no desenvolvimento de ápices meristemáticos do caquizeiro 'Fuyu'.

Aminoácido	Nº explantes com brotação <sup>1</sup>	Nº brotos por explante	Nº de folhas por broto	Comprimento do broto (cm) <sup>2</sup>
Adenina	96 a	1,16 a	9,55 ab	5,91 a
Asparagina	90 a	1,02 a	6,85 b	0,95 b
Glutamina	92 a	1,10 a	9,93 ab	1,33 b
Glicina	88 a	1,12 a	7,14 b	0,83 b
Cisteína	98 a	1,42 a	13,36 a	1,92 ab
Alanina	76 a	1,02 a	6,94 b	0,69 b
Arginina	96 a	1,43 a	10,55 ab	1,54 ab
Testemunha	90 a	1,09 a	9,45 ab	1,19 b
CV(%)	3,17	22,78	22,17	20,93

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

<sup>1</sup> Dados transformados em raiz de x.

<sup>2</sup> Dados transformados em log (x+1)

O nitrogênio, constituinte básico dos aminoácidos e proteínas, é um fator essencial para o desenvolvimento da planta. Em cultura de tecidos, este elemento tem efeitos significativos na divisão celular e morfologia (KYRBY *et al.*, 1987). O nitrogênio orgânico é muito importante para o crescimento celular, e aminoácidos tem sido utilizados como fonte de nitrogênio no meio de cultivo (BEHREND & MATELES, 1975).

A influência do nitrogênio no crescimento e morfogênese de tecidos no cultivo *in vitro* tem sido bem estabelecida. O nitrato tem sido considerado a forma mais essencial de nitrogênio na cultura de tecidos, excetuando-se a embriogênese somática. De qualquer forma, em muitos casos quando se cultiva tecidos em meios nos quais a única fonte de nitrogênio é o nitrato, os resultados não tem sido satisfatórios (SATHYANARAYANA & BLAKE, 1994).

Segundo LEA (1993), o nitrogênio originado a partir de aminoácidos é assimilado mais rapidamente pelos esqueletos carbônicos durante o metabolismo e síntese de proteínas, quando comparados a outras fontes de N inorgânico. Embora vários trabalhos cite as vantagens da suplementação do meio basal com uma fonte de nitrogênio orgânico, para o cultivo dos ápices meristemáticos de caquizeiro os resultados ficaram muito aquém do esperado, havendo necessidade de novas testagens com diferentes concentrações dos melhores tratamentos já identificados.

A adenina é muito utilizada, sendo seu efeito equiparado ao de uma citocinina fraca, podendo mesmo haver uma interação com as próprias citocininas do meio (CALDAS *et al.*, 1998). Efeitos positivos da adenina foram observados na formação de gemas a partir de explantes de câmbio de *Ulmus campestris* (JACQUIOT, 1951) e a partir de segmentos de caule de *Plumbago indica* (NITCH *et al.*, 1967).

### 2.3.3 Tipos e concentrações de citocininas

#### 2 - Isopenteniladenina

A suplementação do meio de cultivo com 2-iP em todas as concentrações testadas gerou a formação de calos com crescimento inicial pronunciado, seguido da oxidação destes, processo esse evidenciado pela coloração escura e pela ausência de proliferação de gemas. As taxas de oxidação dos explantes se reduziram de 82,5% na testemunha para 65% em meio com 20  $\mu\text{M}$  de 2-iP no entanto, nesta concentração do fitorregulador houve 18,06% de explantes com calos.

Embora as taxas de oxidação tenham se reduzido com a suplementação do meio de cultura com a citocinina 2-iP, a formação de calos foi estimulada (TABELA 2.3). Resultado semelhante foi relatado por MURAYAMA *et al.* (1989) no cultivo da variedade Kurogaki em meio suplementado com 2-iP (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), encontrando taxas de 35 e 65% respectivamente de explantes com calo e baixo número de brotos por calo (0,4 e 0,7 brotos). Para a cultivar



Jiro, foram obtidas porcentagens de 100 a 90% de oxidação em meios suplementados com 2-iP (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. Em meio de cultura suplementado com 25  $\mu\text{M}$  de 2-iP a taxa de oxidação se reduziu para 6%.

SUGIURA *et al.* (1986) também relataram resultados semelhantes com a cultivar Hiratanenashi, no qual 2-iP em concentrações acima de 25  $\mu\text{M}$  reduziram a oxidação porém, houve a indução da formação de calos nesta concentração.

**TABELA 2.3** – Efeito de diferentes concentrações de 2-iP na indução do crescimento de ápices meristemáticos do caquizeiro 'Fuyu'.

2-iP ( $\mu\text{M}$ )	Explantos oxidados (%)	Explantos com calos (%)
0	82,5	0,00
1	80,0	0,00
5	87,5	0,00
10	72,5	15,28
20	65,0	18,06

### Zeatina

A suplementação do meio de cultivo com 20  $\mu\text{M}$  de zeatina reduziu significativamente os níveis de oxidação para 15% (TABELA 2.4). FUKUI *et al.* (1990), pesquisando a resposta de crescimento de ápices coletados em diferentes épocas do ano em meio de cultura contendo citocinina, também relataram que não houve desenvolvimento de explantes em meio sem zeatina.

**TABELA 2.4** – Efeito de diferentes concentrações da citocinina zeatina na indução do crescimento de ápices meristemáticos do caquizeiro 'Fuyu'.

Zeatina ( $\mu\text{M}$ )	Explantos oxidados (%)	Explantos com folhas expandidas (%)	Explantos com calo (%)	Calos com gemas (%)	Gemas > 5mm
0	95,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 b	0,0 b
1	70,0a	20,0 bc	0,0 c	0,0 b	0,0 b
5	35,0 b	37,5 ab	12,5 bc	10,0 b	7,5 b
10	27,5 b	50,0 a	37,5 ab	25,0 ab	22,5 ab
20	15,0 b	55,0 a	55,0 a	52,5 a	40,0 a
CV (%)	28,6	33,2	32,65	31,76	37,93

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

A citocinina zeatina é eficiente para a micropropagação do caquizeiro porque várias cultivares foram melhor estabelecidas e proliferadas com esse fitorregulador do que nos meios de cultura suplementados com BAP. Além disso, a cultivar Fuyu, uma das poucas

cultivares que não responde satisfatoriamente a utilização de BAP, em meio de cultivo com zeatina pode ser estabelecida com sucesso *in vitro* (TAO & SUGIURA, 1992; FUKUI *et al.*, 1989).

A formação de calos foi também pronunciada em concentrações elevadas de zeatina como 10 e 20  $\mu\text{M}$  (TABELA 2.4). FUKUI *et al.* (1989) citaram em seu trabalho de cultivo de ápices meristemáticos de caquizeiro a taxa de 60% de ocorrência de calos em meio Gamborg suplementado com  $10^{-5}$  M de zeatina. SUGIURA *et al.* (1986) observaram que a excessiva calosidade evidenciada nos explantes inibiu a proliferação de brotações. Segundo FUKUI *et al.* (1990) este fato pode ter ocorrido pela aplicação de 10  $\mu\text{M}$  da citocinina zeatina.

A formação de gemas adventícias a partir dos explantes iniciais ocorreu mais acentuadamente na concentração de 20  $\mu\text{M}$  de zeatina (TABELA 2.4). COOPER & COHEN (1984) relataram que em concentrações de 0,01 a 10  $\text{mg.L}^{-1}$  os explantes morreram e quando o meio foi suplementado com 1 $\text{mg.L}^{-1}$  de zeatina, todos os explantes alongaram, mas não desenvolveram gemas axilares, similarmente a este trabalho. A citocinina zeatina é eficiente para a micropropagação do caquizeiro porque várias cultivares foram melhor estabelecidas e proliferadas com esse fitorregulador do que nos meios de cultura suplementados com BAP. Além disso, a cultivar Fuyu, uma das poucas cultivares que não responde satisfatoriamente a utilização de BAP, em meio de cultivo com zeatina pode ser estabelecida com sucesso *in vitro* (TAO & SUGIURA, 1992; FUKUI *et al.*, 1989).

A dependência de citocinina no cultivo inicial dos ápices meristemáticos, já relatada por BIASI *et al.* (1999) foi novamente evidenciada neste experimento, no qual a ausência de zeatina resultou em nenhum ápice desenvolvido e 95% de explantes oxidados (TABELA 2.4).

Zeatina mostrou exercer um papel importante no cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos de caquizeiro, fato este evidenciado não somente por este trabalho, mas já descrito anteriormente por vários pesquisadores. Todavia, a zeatina é uma citocinina muito cara (COOPER & COHEN, 1984) e novas investigações devem ser realizadas para conhecer novos compostos com efeito similar na regeneração de brotos de caquizeiro.

## 2.4 CONCLUSÕES

O estabelecimento *in vitro* do caquizeiro 'Fuyu' foi obtido pelo cultivo de ápices meristemáticos com 2 mm de comprimento retirados de gemas dormentes apicais,

medianas e basais de estacas lenhosas, em meio de cultura  $MS\frac{1}{2}NO_3$  suplementado com 20  $\mu M$  de zeatina, utilizando ágar como agente solidificante. Os aminoácidos adenina, cisteína e arginina promoveram a formação de brotações mais desenvolvidas, com maior número e tamanho de folhas.

## 2.5 REFERÊNCIAS

- BEHREND, J.; MATELES, R.I. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of inorganic acids during growth on ammonia. **Plant Physiology**, v.58, p.510-512, 1975.
- BIASI, L. A.; CARVALHO, D. C.; ANDRADE, A.; ZANETTE, F. Estabelecimento *in vitro* do caquizeiro 'Fuyu' por meio de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.21, n.3. p. 279-283, 1999.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. *In*: TORRES, A.C; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 87-132.
- CHOI, J.Y; KIM, H.J.; LEE, C.H; BAE, J.M.; CHUNG, Y.S.; SHIN, J.S.; HYUNG, N.Y. Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment cultures of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.37, n.2, p.274-179, 2001.
- COOPER, P. C.; COHEN, D. Micropropagation of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki*). **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**. v.34, p.118-124, 1984.
- FUKUI, H.; KANO, T.; TAKEUCHI, S.; NAKAMURA, M. *In vitro* growth of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* L.) seedlings plants. **Research Bulletin of the Faculty of Agriculture Gifu University**. v.52, p.25-30, 1987.
- FUKUI, H.; NISHIMOTO, K.; MURASE, I.; NAKAMURA, M. Annual changes in responsiveness of shoot tip cultures to cytokinin in Japanese Persimmon. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v. 59, n.2, p.271-274, 1990.
- FUKUI, H.; NISHIMOTO, K.; NAKAMURA, M. Varietal differences in rooting ability of *In vitro* subcultures Japanese Persimmon shoots. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v.60, n.4, p.821-825, 1992.
- FUKUI, H.; SUGIYAMA, M.; NAKAMURA, M. Shoot tip culture of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* L.). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v.58, n.43-47, 1989.

- FUMURO, M.; MURAYAMA, H.; TAO, R.; MURATA, R.; SUGIURA, A. Studies on rearing of dwarfing rootstocks for Japanese Persimmon. **Bulletin of Shiga Agricultural Experimental Station**. v.29, p.20-30, 1988.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. England: British Library, 1993. 272p. (Part 1)
- IBRAF. Banco de dados sobre fruticultura. Instituto brasileiro de frutas. Disponível em: [www.ibraf.org.br](http://www.ibraf.org.br). Capturado em: 04/11/02.
- JACQUIOT, C. Action du méso-inositol et de l'adénine sur la formation de bourgeons par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. **Comptes Rendus de l'academie des Sciences de Paris**, v.233, p.815-817, 1951.
- KIRBY, E.G.; LEUSTEK, T.; LEE, M.S. Nitrogen nutrition. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds). **Cell and Tissue Culture in Forestry I. General Principles and Biotechnology**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 67-88.
- MILLER, R.M.; KAUL, V.; HUTCHINSON, J.F.; RICHARDS, D. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus cariophyllus* L.) from axillary bud explants. **Annal of Botany**, v.68, p.563-568, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v.15, p. 473-497, 1962.
- MURAYAMA, H.; TAO, R.; TANAKA, T.; SUGIURA, A. *In vitro* shoot proliferation and rooting of several Japanese Persimmon cultivars. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v.58, p.55-61, 1989.
- NITCH, J. P.; NITCH, C.; ROSSINI, L. M. E.; HA, B. D. The role of adenine in bud differentiation. **Phytomorfology**. v.17, p.446-453, 1967.
- PENTEADO, S. R. **Fruticultura de clima temperado em São Paulo**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. 173p.
- RUBBO, M. S. **Estudo do enraizamento de estacas de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.)**. Piracicaba, ESALQ, 1989. 90p. (Dissertação de mestrado).
- SARATHCHANDRA, S.U.; BURCH, G. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thun.) cv. 'Hiratanenashi'. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 19, p. 113-120, 1991.
- SATHYANARAYANA, B.N.; BLAKE, J. Effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on *in vitro* rooting of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). In: LUMSDEN, P.J.; NICHOLAS, J.R.; DAVIES, W.J. **Physiology, Growth and Development of Plants in Culture**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p.77-82.
- SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura**. FEALQ: Piracicaba, 1998, 760 p.

SUGIURA, A.; TAO, R.; MURAYAMA, H.; TOMANA, T. In vitro propagation of Japanese persimmon. **HortScience**. v.21, n.5, p.1205-1207, 1986.

TAO, R.; SUGIURA, A. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. vol. 18. **High-Tech and Micropropagation II**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. cap. 11, p. 423-440.

WELANDER, M.; MAHESWARAN, G. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. **Journal of Plant Physiology**, v.140, p.223-228, 1992.

WILLIAMS, R. R.; TAJI, A. M. Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of Australian woody plant species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.11, p.151-156, 1987.

### 3 ORGANOGÊNESE DE SEGMENTOS RADICULARES DE CAQUIZEIRO

**RESUMO** - O caqui brasileiro representa uma importante fonte de renda para a fruticultura nacional, sendo consumido tanto no mercado interno quanto externo. No entanto, a obtenção de mudas de boa qualidade para a implantação de pomares constitui-se num sério problema para os fruticultores, pois as mudas são formadas pela enxertia sobre porta-enxertos provenientes de sementes, gerando a formação de mudas desuniformes quanto ao porte e vigor, sendo incompatível com o atual nível tecnológico requerido pela fruticultura. Métodos tradicionais como a enxertia são processos morosos e dispendiosos, logo, novas tecnologias de propagação vegetativa devem ser desenvolvidas. A micropropagação do caqui tem sido desenvolvida, todavia, sua aplicação para a produção comercial de mudas tem sido limitada porque as microestacas de caqui geralmente são difíceis de enraizar. Brotações juvenis provenientes da organogênese apresentam facilidade de enraizamento, sendo o objetivo do trabalho a contribuição para o desenvolvimento de um protocolo para a regeneração de brotações a partir de raízes por organogênese indireta. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas da UFPR entre 2001 e 2002. Os explantes foram segmentos radiculares obtidos de embriões germinados *in vitro*, isolados de sementes de frutos maduros em meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$ . As sementes receberam assepsia pela imersão em etanol 70% por um minuto, imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos e quatro lavagens em água esterilizada. Os segmentos radiculares de 2 cm foram isolados em meio de cultura  $MS\frac{1}{2}NO_3$  acrescido de 0,01  $\mu M$  de AIA e quatro tipos de citocininas nas concentrações 1 e 10  $\mu M$ : zeatina, BAP, 2-iP e TDZ. Para o enraizamento das brotações foram testados quatro períodos de permanência em meio com 10  $\mu M$  de AIB: 0, 5 10 e 15 dias. A maior regeneração de brotos (1,2 brotos/explante) ocorreu na combinação 1  $\mu M$  de zeatina com 0,01  $\mu M$  de AIA. As brotações juvenis obtidas possuem potencial natural para o enraizamento, não necessitando de tratamento com AIB.

Palavras-chave: *Diospyros kaki*, cultura de tecidos, reguladores de crescimento, fruticultura, micropropagação.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O caquizeiro (*Diospyros kaki*) é a espécie mais importante dentro das 400 espécies que compõem o gênero *Diospyros*, pertencente à família *Ebenaceae*. Originário da Ásia, vem sendo cultivado há séculos na Coréia, China e Japão. No final do século XIX foi introduzido em vários países, incluindo os EUA, Israel, Itália, Brasil e Nova Zelândia (TAO & SUGIURA, 1992).

No Brasil, onde aclimatou-se muito bem, principalmente nas regiões sul e sudeste, constitui-se numa importante fonte de renda para a fruticultura nacional, sendo comercializado tanto no mercado interno quanto exportado para vários países europeus (IBRAF, 2002).

A obtenção de mudas de boa qualidade para a implantação de pomares constitui-se num sério problema para os fruticultores que pretendem cultivar o caquizeiro (BIASI *et al.*, 1999). Este fato ocorre porque as mudas são formadas pela enxertia sobre porta-enxertos provenientes de sementes. A heterozigose genética gera uma grande desuniformidade quanto ao porte e vigor das plantas, ocasionando a formação de pomares heterogêneos (MARTINS & PEREIRA, 1989; FUKUI *et al.*, 1989; CHOI *et al.*, 2001). Além disso, o caquizeiro apresenta grande dificuldade de enraizamento por meio de estacas caulinares (RUBBO, 1989; TAO & SUGIURA, 1992), restringindo ainda mais as formas de obtenção de mudas em larga escala.

A solução para este problema requer avanços na pesquisa de forma a gerar novas tecnologias para a propagação vegetativa que permitam a formação direta de mudas a partir dos cultivares produtores, representando um avanço significativo para a cultura do caquizeiro (MARTINS & PEREIRA, 1989).

Métodos para a micropropagação do caquizeiro tem 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).

A regeneração de plantas via organogênese indireta já foi alcançada utilizando hipocótilos de plantas germinadas *in vitro* (YOKOYAMA & TAKEUCHI, 1976; YAMADA *et al.*, 1987), anteras (TAO *et al.*, 1992), segmentos internodais e folhas jovens (TAO & SUGIURA, 1992) e também a partir de primórdios foliares de gemas dormentes (TAO *et al.*, 1988). Os calos foram induzidos em meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$  suplementado com zeatina e AIA. O crescimento das brotações ocorreu em meio apenas com zeatina e o enraizamento das brotações foi induzido pela imersão em solução de AIB e cultivo em meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$ .

TETSUMURA & YUKINAGA (1996) realizaram o trabalho pioneiro de organogênese a partir de raízes de caquizeiro, obtendo a regeneração de brotos em alta frequência (85% dos explantes). TAMURA *et al.* (1992) relacionaram este fato a juvenilidade dos tecidos radiculares. Segundo BONGA (1982), se a juvenilidade for conservada nas brotações regeneradas, estas podem ser facilmente enraizadas e micropropagadas.

Os trabalhos com a cultura de tecidos do caquizeiro são relativamente recentes e a maioria deles foram realizados em universidades japonesas. No Brasil, as pesquisas com cultura de tecidos de caquizeiro apresentam resultados bastante promissores para a clonagem da espécie (BIASI *et al.*, 1999; SALOMÃO *et al.*, 1999; SALOMÃO *et al.*, 2000; BIASI *et al.*, 2002).

As raízes de algumas plantas superiores tem a capacidade de formar gemas vegetativas sob condições naturais, ou apenas esporadicamente, como consequência de danos mecânicos ou de podas drásticas da parte aérea. Outras espécies, de ocorrência rara, possuem raízes com funções reprodutivas. A capacidade inerente das raízes de algumas espécies de importância econômica para formar gemas tem sido utilizada rotineiramente para fins de multiplicação vegetativa. Por meio do emprego da técnica da cultura de tecidos, tornou-se possível a regeneração de gemas tanto de raízes gemíferas quanto de raízes sem essa capacidade sob condições naturais (KERBAUY, 1998).

Os estudos de cultura de tecidos radiculares são escassos quando comparados com os de parte aérea e este fato pode ser explicado pela necessidade de utilização de metodologias complexas e trabalhosas que limitam a amplitude desses estudos. Além disso, estes órgãos são heterotróficos, de forma que muitos processos são alterados, por exemplo, quando um ápice radicular é isolado e transferido para um meio de cultura (PERES, 2002).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer um protocolo para a propagação *in vitro* do caquizeiro via organogênese a partir de segmentos radiculares.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná no período entre 2001 e 2002. Todos os experimentos foram realizados com compostos auxínicos e citocinínicos padrão Sigma. Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa estatístico MSTAT, realizando-se



a análise de variância e, quando necessário, o teste adicional de Tukey a 5% de probabilidade.

Como fonte de explantes foram coletados frutos maduros de caquizeiros, que foram levados para o laboratório onde tiveram suas sementes extraídas. As sementes receberam assepsia pela imersão em etanol 70% por um minuto, imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos e quatro lavagens em água esterilizada.

Na câmara de fluxo laminar as sementes foram abertas e os embriões extraídos com auxílio de bisturi, sendo separados do endosperma. Estes embriões foram colocados em frascos individuais de 50 ml contendo 10 ml de meio de cultura  $MS\frac{1}{2}NO_3$  para sua germinação.

Quando as plântulas apresentavam pelo menos cinco centímetros de desenvolvimento radicular, as raízes foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de organogênese.

### **3.2.1 Efeito de reguladores de crescimento na indução de brotações adventícias**

Os segmentos radiculares com aproximadamente dois centímetros de comprimento foram isolados em meio de cultura  $MS\frac{1}{2}NO_3$  acrescido de 0,01  $\mu M$  de AIA e quatro tipos de citocininas nas concentrações 1 e 10  $\mu M$ : zeatina, BAP, 2-iP e TDZ.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições e 15 explantes por parcela. Os explantes foram isolados em potes de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura, sendo colocados cinco explantes por frasco. A avaliação foi realizada após 90 dias da instalação do experimento, pela porcentagem de explantes com calo, porcentagem de explantes com brotação, número de brotos maiores e menores que um centímetro (por explante) e porcentagem de explantes com folhas.

### **3.2.2 Enraizamento das brotações**

Para o enraizamento foram utilizadas brotações com tamanho superior a um centímetro e pelo menos uma folha expandida, sendo testado o tempo de permanência em meio de cultura com 10  $\mu M$  de AIB e posterior transferência para meio sem reguladores de

crescimento e com  $1\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado, conforme descrito por BIASI *et al.* (1994) para o abacateiro.

Os tratamentos foram os seguintes períodos em meio de cultura com  $10\ \mu\text{M}$  de AIB: 0, 5, 10 e 15 dias. O delineamento foi em blocos ao acaso com quatro repetições e dez explantes por parcela. Os explantes foram isolados em potes de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura, sendo colocados cinco explantes por frasco. A avaliação dos experimentos foi realizada após 30 dias da instalação pela porcentagem de brotações enraizadas, comprimento das raízes (cm) e número de raízes por brotação.

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1 Efeito de reguladores de crescimento na indução de brotações adventícias**

Todas as citocininas testadas induziram a formação de brotações a partir dos segmentos radiculares (TABELA 3.1). Quando não havia citocinina no meio de cultura, a formação de brotações adventícias não ocorreu. Este resultado indicou a dependência de citocininas para o cultivo inicial de segmentos radiculares de caqui, semelhante ao cultivo de ápices meristemáticos, relatado por BIASI *et al.* (1999).

Comparando os vários tipos de citocininas em todas as concentrações combinadas com  $0,01\ \mu\text{M}$  de AIA, o melhor resultado em termos de porcentagem de explantes que formaram brotações foi encontrado em  $1\ \mu\text{M}$  de zeatina (TABELA 3.1), embora este tratamento não tenha sido superior isoladamente. TETSUMURA & YUKINAGA (2000) obtiveram brotações regeneradas a partir de raízes de quatro diferentes cultivares de caqui em meio suplementado com  $0,01\ \mu\text{M}$  de AIA e  $10\ \mu\text{M}$  de zeatina.

**TABELA 3.1** – Efeito das citocininas BAP, TDZ, 2-iP e Zeatina nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$ , associadas à auxina AIA 0,01  $\mu\text{M}$  sobre o desenvolvimento organogênico de segmentos radiculares de caquiizeiro.

Citocinina ( $\mu\text{M}$ )	Explantos com calo (%) <sup>1</sup>	Explantos com brotação (%) <sup>1</sup>	Brotos < 1cm/explante <sup>1</sup>	Brotos > 1cm/explante <sup>1</sup>	Explantos com folhas (%) <sup>1</sup>
<b>Zeatina 1</b>	5,2 bc	44,3 a	0,8 a	0,4 a	25,8 a
<b>Zeatina 10</b>	48,1 ab	33,0 ab	0,7 ab	0,1 ab	5,2 ab
<b>BAP 1</b>	0,0 c	1,4 bc	0,0 b	0,0 b	1,4 ab
<b>BAP 10</b>	7,6 abc	17,5 abc	0,2 ab	0,1 ab	5,2 ab
<b>2-iP 1</b>	2,9 c	0,8 c	0,0 b	0,0 b	0,0 b
<b>2-iP 10</b>	2,9 c	12,9 abc	0,1 ab	0,0 b	0,0 b
<b>TDZ 1</b>	14,9 abc	31,8 ab	0,7 ab	0,1 b	15,0 ab
<b>TDZ 10</b>	52,3 a	2,9 bc	0,1 ab	0,0 b	0,0 b
<b>TESTEMUNHA</b>	0,0 c	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 b
<b>CV%</b>	34,96	23,92	35,53	41,58	23,35

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

<sup>1</sup> Dados transformados em arco seno da raiz de  $X/100$

CHOI *et al.* (2001) obtiveram a regeneração de gemas a partir de segmentos foliares cultivados em meio  $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$  suplementado com 0,1mg.L<sup>-1</sup> de AIB e 10mg.L<sup>-1</sup> de zeatina. TAO & SUGIURA (1992) e BIASI *et al.* (1999) definiram a concentração 10  $\mu\text{M}$  de zeatina para o cultivo de ápices meristemáticos de caquiizeiro. No entanto, neste trabalho a concentração mais efetiva para a organogênese de segmentos radiculares foi mais baixa (1  $\mu\text{M}$  de zeatina). Isto pode ter ocorrido devido à juvenilidade dos tecidos radiculares, pois segundo TAMURA *et al.* (1992), GEORGE (1993) e PERES (2002), há maior sucesso nos protocolos de organogênese *in vitro* se forem utilizados tecidos juvenis, que possuem maior competência organogênica, como ápices radiculares.

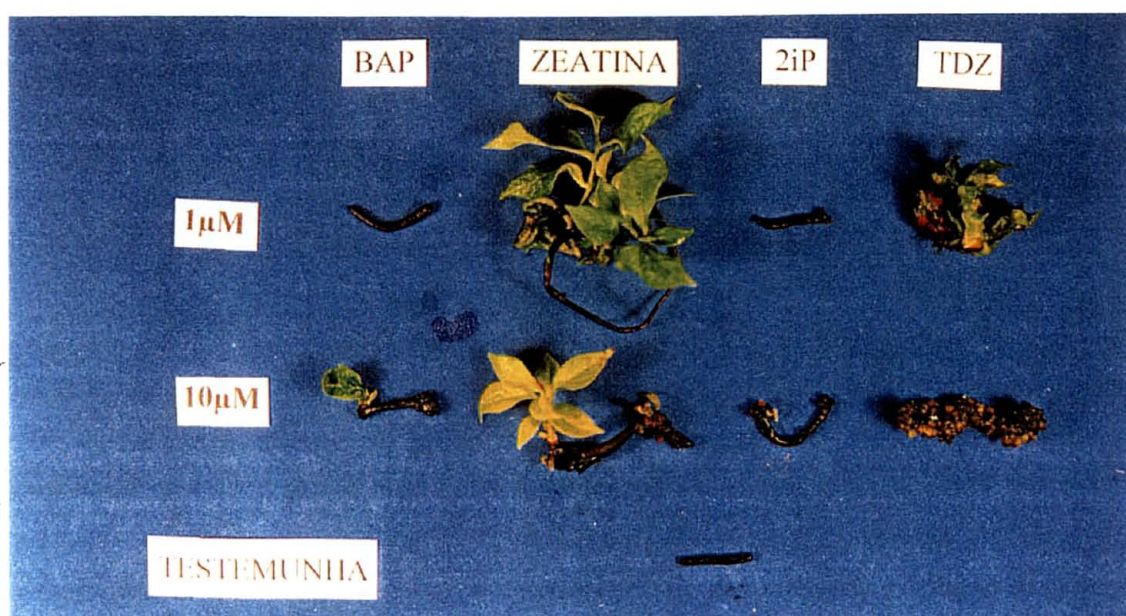
No presente trabalho, a dose de 10  $\mu\text{M}$  de zeatina diferiu significativamente da dosagem 1  $\mu\text{M}$  apenas para a variável porcentagem de explantes com calos. As mais elevadas porcentagens de formação de calos ocorreram em zeatina e TDZ, ambos na concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

FUKUI *et al.* (1989), em seu trabalho com cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos de caquiizeiro, relataram a ocorrência de 60% de calos em meio Gamborg suplementado com 10 a 20  $\mu\text{M}$  de zeatina. SUGIURA *et al.* (1986) observaram que a excessiva calosidade observada nos explantes inibiu a proliferação de brotações. FUKUI *et al.* (1990) citam que este fato pode ter ocorrido pela aplicação da citocinina zeatina 10  $\mu\text{M}$ .

Zeatina 1  $\mu\text{M}$  induziu a formação de maior número de brotações tanto menores quanto maiores de 1 cm, como pode ser observado na FIGURA 3.1. PREECE &

HUETTEMAN (1991) obtiveram um grande número de brotações maiores que 0,5 cm em meio suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de zeatina para o cultivo de *Acer saccharinum*.

O tidiazuron (TDZ), analogamente a 10  $\mu\text{M}$  de zeatina, atuou na formação de calos (FIGURA 3.1). HUETTEMAN & PREECE (1993), afirmam que o TDZ tem sido amplamente utilizado na micropropagação por ser um excelente estimulante para a formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1  $\mu\text{M}$ .



**FIGURA 3.1** - Efeito das citocininas BAP, TDZ, 2-iP e Zeatina nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$ , associadas à auxina AIA 0,01  $\mu\text{M}$  sobre o desenvolvimento organogênico de segmentos radiculares de caqui.

SANKHLA *et al.* (1994) relataram a formação de calos nos segmentos radiculares provenientes de plântulas germinadas *in vitro* de *Albizzia julibrissin* (paineira). A massa fresca dos explantes elevou-se acentuadamente em concentrações de 2,5 a 10  $\mu\text{M}$  de TDZ. SEELYE & BUTCHER (1991) citam a formação de calos em explantes de kiwizeiro cultivados em meio suplementado com TDZ.

CHOI *et al.* (2001) ressaltam que a formação de brotações adventícias é dependente do fator genético de cada cultivar de caquizeiro. A cultivar comercialmente mais importante, a 'Fuyu', mostrou resistência a respostas regenerativas e provou ser recalitrante. Todavia, TAO & SUGIURA (1992) e FUKUI *et al.* (1990), relataram que a citocinina zeatina é especialmente efetiva para o cultivo *in vitro* do caquizeiro todavia, sua utilização na produção de mudas pode gerar custos muito elevados. Então, se a micropropagação puder ser realizada com uma citocinina de menor custo, a zeatina não deve ser utilizada.

Níveis reduzidos de TDZ e muitos outros compostos de fenilureia piridil têm demonstrado estimular a formação de meristemas e gemas *in vitro*. Esses compostos têm apresentado os mesmo efeitos das citocininas para muitas espécies (FELLMAN *et al.*, 1987). O TDZ tem tornado a micropropagação de muitas espécies recalitrantes viável. Baixas concentrações de TDZ ( $< 1 \mu\text{M}$ ) podem induzir uma maior proliferação de gemas axilares, quando comparado com outras substâncias com atividade citocinínica; no entanto, pode inibir o alongamento das brotações (HUETTEMAN & PREECE, 1993). Sugere-se, então, maiores investigações quanto ao efeito do TDZ na formação de brotações adventícias, empregando concentrações mais reduzidas deste fitorregulador ou diferentes formas de tratamento dos explantes, como imersão em solução pulso de TDZ por alguns minutos e posterior isolamento do tecido em meio livre de reguladores de crescimento.

### 3.3.2 Enraizamento das brotações

A capacidade para enraizamento *in vitro* é muito variável dentre as cultivares de caquizeiro (TAO & SUGIURA, 1992). FUKUI *et al.* (1992) investigaram 95 cultivares e obtiveram apenas 16 delas com elevado potencial de enraizamento (acima de 70%) quando tratadas com ANA, aplicado na forma de talco a 40%.

MURAYAMA *et al.* (1989) obtiveram taxas de 96% de enraizamento para brotações regeneradas de ápices meristemáticos da cultivar Hiratanenashi e apenas 8% para Kurogashi em meio suplementado com  $250\text{mg.L}^{-1}$  de AIB. BIASI *et al.* (1999) e SALOMÃO *et al.* (1999) não obtiveram nenhuma microestaca enraizada em meio com AIB (0 a  $1\mu\text{M}$ ,

observando ainda efeitos negativos sobre os explantes como a oxidação e formação de calos.

TETSUMURA & YUKINAGA (2000) afirmaram que as porcentagens de enraizamento de brotações regeneradas a partir de raízes de três cultivares de caqui foram maiores do que aquelas obtidas em brotações provenientes do cultivo de ápices meristemáticos. As brotações obtidas pela organogênese em raízes da cultivar Jiro enraizaram dez dias mais cedo e com maior número de raízes do que as brotações regeneradas de ápices meristemáticos.

No presente trabalho não houve diferença significativa entre os períodos de permanência das brotações em meios suplementado com 10  $\mu$ M de AIB (TABELA 3.2). Observou-se porém, uma tendência à maior emissão de raízes e maior vigor da parte aérea e radicular quando os explantes foram tratados com AIB por um período mais prolongado em meio auxínico (FIGURA 3.2).

Por outro lado, a análise dos resultados indicou um potencial natural das brotações regeneradas de raízes para o enraizamento, sem que haja requerimento de reguladores de crescimento. TETSUMURA & YUKINAGA (1996) sugeriram que esta facilidade para o enraizamento pode estar associada à retenção da juvenilidade dos explantes, observado em plantas regeneradas *in vitro*.

Brotações adventícias produzidas a partir de raízes tendem a ser juvenis, logo, podem ser facilmente enraizadas e micropropagadas (HARTMANN *et al.*, 1997; BONGA, 1982).

Auxinas geralmente podem estimular a formação de raízes em estacas, sugerindo que o alto grau de enraizamento em estacas juvenis é devido à elevada concentração de níveis endógenos de auxina que as estacas juvenis tipicamente contêm ou devido à grande sensibilidade nestes tecidos (ARTECA, 1995).

**TABELA 3.2** - Efeito do período de permanência em meio de cultura com 10  $\mu\text{M}$  de AIB, no enraizamento das brotações de caquizeiro.

Dias	Brotações enraizadas (%) <sup>1</sup>	Comprimento das raízes (cm) <sup>2</sup>	Número de raízes por brotação <sup>2</sup>
0	34,37	2,90	2,00
5	62,50	4,23	2,87
10	53,12	3,44	2,62
15	71,87	4,24	3,22
CV (%)	55,88	24,89	24,03

As médias não diferiram significativamente pelo teste F da análise de variância.

<sup>1</sup> Dados originais transformados em arco seno da raiz de  $x/100$

<sup>2</sup> Dados originais transformados em raiz ( $x+1$ )



**FIGURA 3.2** - Efeito do período de permanência em meio de cultura com 10  $\mu\text{M}$  de AIB no enraizamento das brotações de caquizeiro.

### 3.4 CONCLUSÕES

A micropropagação do caquizeiro pela organogênese indireta em segmentos radiculares pode ser obtida pelo cultivo destes em meio MS $\frac{1}{2}$ NO $_3$  suplementado com 1  $\mu$ M de zeatina e 0,01  $\mu$ M de AIA. As brotações juvenis obtidas possuem potencial natural para o enraizamento, não necessitando de tratamento com AIB.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. Pennsylvania: Chapman & Hall, 1995. 332p.
- BIASI, L. A.; CARVALHO, D. C.; ANDRADE, A.; ZANETTE, F. Estabelecimento *in vitro* do caquizeiro 'Fuyu' por meio de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.3, p. 279-283, 1999.
- BIASI, L.A.; CARVALHO, D.C.; WOLF, G.D.; ZANETTE, F. Potencial organogenético de tecidos caulinares e radiculares de caquizeiro. **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.
- BONGA, J.M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. **Tissue Culture in forestry**. Netherlands: Martinus Nijhoff, The Hague, 1982. p.387-412.
- CHOI, J.Y.; KIM, H.J.; LEE, C.H.; BAE, J.M.; CHUNG, Y.S.; SHIN, J.S.; HYUNG, N.Y. Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment cultures of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.37, n.2, p.274-179, 2001.
- COOPER, P. C.; COHEN, D. Micropropagation of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki*). **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**. v.34, p.118-124, 1984.
- FELLMAN, C.D.; READ, P.E.; HOSIER, M.A. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **Hortscience** v.22, n.6, p.1197-1200, 1987.
- FUKUI, H.; NISHIMOTO, K.; MURASE, I.; NAKAMURA, M. Annual changes in responsiveness of shoot tip cultures to cytokinin in Japanese Persimmon. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.59. n.2, p.271-274, 1990.



- FUKUI, H.; NISHIMOTO, K.; NAKAMURA, M. Varietal differences in rooting ability of *In vitro* subcultures Japanese Persimmon shoots. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.60, n.4, p.821-825, 1992.
- FUKUI, H.; SUGIYAMA, M.; NAKAMURA, M. Shoot tip culture of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* L.). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.58, p.43-47, 1989.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. England: British Library, 1993. 272p. (Part 1)
- HARTMANN, H. T.; KESTER D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**, Prentice Hall, 6<sup>a</sup> ed., New Jersey, 1997. 770p.
- HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **Botanical Review**, v.46, n.1, p.1-23, 1980.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.2, p.105-119, 1993.
- IBRAF. Banco de dados sobre fruticultura. Instituto brasileiro de frutas. Disponível em: [www.ibraf.org.br](http://www.ibraf.org.br). Capturado em: 04/11/02.
- KERBAUY, G.B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 161-181.
- LEA, P. J. Nitrogen Metabolism. In: LEA, P. J. & LEEGOOD, R. C. (eds) **Plant Biochemistry and Molecular Biology**, Wiley & Sons, New York, 1993, p. 155-180.
- MARTINS, F.P.; PEREIRA, F.M. **Cultura do caqui**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 71p.
- MURAYAMA, H.; TAO, R.; TANAKA, T.; SUGIURA, A. *In vitro* shoot proliferation and rooting of several Japanese Persimmon cultivars. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v.58, n.1, p.55-61, 1989.
- PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**. Ano V, n.25, 2002.
- PREECE, J. E.; HUETTEMAN, C.A. Micro-and cutting propagation of silver maple I. Results with adult and juvenile propagules. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.116, n.1, p.142-148. 1991.
- RUBBO, M. S. **Estudo do enraizamento de estacas de caqui (Diospyros kaki L.)**. Piracicaba, ESALQ, 1989. 90p. (Dissertação de mestrado).
- SALOMÃO, L.C.C.; VIECELLI, J.C; SIQUEIRA, D.L; OTONI, W.C.; SISTE, C.E. Micropropagação de caqui (*Diospyros kaki* L.) por meio de gemas laterais e apicais de plantas adultas. **Revista Ceres**, v.46, n.265, p.267-277. 1999.

- SALOMÃO, L.C.C.; VIECCELLI, J.C; SIQUEIRA, D.L; OTONI, W.C. 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.
- SANKHLA, D.; DAVIS, T.D.; SANKHLA, N. Thidiazuron-induced *in vitro* shoot formation from roots of intact seedlings of *Albizzia julibrissin*. **Plant Growth Regulation**, v.14, p.267-272. 1994.
- SEELYE, J.F.; BUTCHER, S.M. *In vitro* response of *Actinidia* leaf and callus tissue to thidiazuron. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.19, p.447-450. 1991.
- SUGIURA, A.; TAO, R.; MURAYAMA, H.; TOMANA, T. *In vitro* propagation of Japanese persimmon. **HortScience**, v. 21, n. 5, p. 1205-1207, 1986.
- TAMURA, M.; TAO, R.; SUGIURA, A. Highly stable regeneration from long-term cultures of Japanese persimmon callus. **HortScience**, v. 27, n. 9, p. 1048. 1992.
- TAO, R.; ITO, J.; SUGIURA, A. Adventitious bud formation on callus derived from anthers of persimmon 'Meotogaki' and isozyme variations observed in the regenerated plantlets. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 61, n. 3, p. 527-533. 1992.
- TAO, R.; MURAYAMA, H.; MORIGUCHI, K.; SUGIURA, A. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. **HortScience**, v. 23, n. 6, p. 1055-1056. 1988.
- TAO, R.; SUGIURA, A. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry. vol. 18. High-Tech and Micropropagation II**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. cap. 11, p. 423-440.
- TETSUMURA, T.; YUKINAGA, H. Comparative rooting of shoot tips of four Japanese persimmon cultivars vs. Shoots regenerated from roots cultured *in vitro*. **HortScience**, v. 35, n. 5, p. 940-944. 2000.
- TETSUMURA, T.; YUKINAGA, H. High-frequency shoot regeneration from roots of Japanese persimmon. **HortScience**, v. 31, n. 3, p. 463-464. 1996.
- YAMADA, K.; MATSUMOTO, T; HARUKI, K. Adventitious bud formation from hypocotyl segments in seed of Japanese persimmon. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v.64, n.2, p.154-155. 1987.
- YOKOYAMA, T.; TAKEUCHI, M. Organ and plantlet formation from callus in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). **Phytomorphology**, v. 26, p. 273-275. 1976.

#### 4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAQUIZEIRO

RESUMO - *Diospyros kaki* é uma espécie que apresenta reduzido potencial de enraizamento através de estacas caulinares, resultando na dificuldade de obtenção de mudas de boa qualidade para a implantação de pomares. Métodos tradicionais como a enxertia sobre porta-enxertos provenientes de sementes geram a formação de mudas desuniformes quanto ao porte e vigor, sendo incompatível com o atual nível tecnológico requerido pela fruticultura. A solução para este problema pode ser encontrada pela tecnologia de cultivo *in vitro*, sendo que dentre os processos de regeneração de tecidos a embriogênese somática parece ser a melhor opção para propagação de fruteiras por apresentar vantagens como alta taxa de multiplicação, escalonamento da produção, plantio direto dos clones sem necessidade de enxertia. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um protocolo para a embriogênese somática do caqui. Como explantes foram utilizados embriões zigóticos em diversos estádios de desenvolvimento, retirados de frutos coletados de plantas adultas a campo a partir de quatro semanas após o pleno florescimento até 22 semanas. O meio básico para os experimentos foi o MS $\frac{1}{2}$ NO $_3$ . O meio inicial de indução foi suplementado com 20 $\mu$ M de 2,4-D e 2 $\mu$ M de cinetina. Os calos escuros obtidos foram repicados para outro meio de indução, com concentrações 10 ou 20  $\mu$ M de 2,4-D e 2  $\mu$ M de cinetina. Os calos com massas pró-embriogênicas obtidos foram transferidos para meio de manutenção e multiplicação com 2  $\mu$ M de cinetina e 2,4-D nas concentrações 2,5; 5,0 e 10  $\mu$ M. As massas embriogênicas formadas foram transferidas para meio de maturação suplementado com 0,5  $\mu$ M de AIB e as concentrações 5, 10 e 20  $\mu$ M de 2-iP. Os embriões formados foram isolados em dois meios de conversão, sendo o primeiro com 5  $\mu$ M de 2-iP, 5  $\mu$ M de AG $_3$  e 0,5  $\mu$ M de AIB e o segundo com 0,5  $\mu$ M de AG $_3$  e BAP nas concentrações 0; 0,25, 0,5 e 1,0  $\mu$ M. Como resultados obteve-se o padrão indireto de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros, com mais de 22 semanas de formação, quando cultivados em meio de cultura com 10  $\mu$ M de 2,4-D combinado com 2  $\mu$ M de cinetina. A manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas foi mais eficiente com 5  $\mu$ M de 2,4-D, na qual os pró-embriões avançaram para o estágio globular. Na fase de maturação as concentrações de 2-iP testadas atuaram promovendo os embriões globulares a estádios mais avançados da ontogenia como cordiforme, torpedo e cotiledonar. A suplementação do meio de cultura com 1  $\mu$ M de BAP e 0,5  $\mu$ M de AG $_3$ , gerou a formação de plantas mais desenvolvidas, com maior número e tamanho de folhas.

Palavras-chave: *Diospyros kaki*, cultura de tecidos, reguladores de crescimento, fruticultura, micropropagação.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A cultura do caquizeiro é muito importante para países asiáticos como a Coréia, Japão e China (CHOI *et al.*, 2001). No Brasil, o caquizeiro é cultivado principalmente nas regiões sudeste e sul, onde se destacam os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, em ordem decrescente de produção. O caqui brasileiro é exportado para diversos países como a Alemanha, França, Bélgica, Países Baixos, Canadá, Portugal e Áustria (IBRAF, 2002) constituindo-se numa importante fonte de renda para a fruticultura nacional.

A propagação convencional de caquizeiros pela via sexuada é difícil, devido ao seu longo período juvenil, elevado porte das plantas e heterozigose genética. Além disso, o cruzamento é prejudicado pelo limitado número de cultivares, que carregam flores masculinas e/ou hermafroditas (CHOI *et al.*, 2001). A propagação vegetativa via enxertia é também dificultada pelo fato de os porta-enxertos serem provenientes de sementes, o que causa uma grande desuniformidade quanto ao porte e vigor das plantas, além de ser um processo demorado, oneroso e com baixas taxas de pegamento (BIASI *et al.*, 2002).

A solução para este problema, passa pelo desenvolvimento de 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).

BARROS (1999) ressalta que dentre os processos de regeneração, a embriogênese somática, é, *teoricamente*, a melhor opção para a propagação *in vitro* de fruteiras por apresentar algumas vantagens, tais como a alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação, o escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido, o plantio direto da muda obtida via embriogênese somática sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além da planta ser geneticamente igual à planta mãe, sem as influências do porta-enxerto, como acontece com as plantas obtidas por métodos de propagação vegetativa convencionais.

A importância do estabelecimento de protocolos para a regeneração de plantas a partir de embriogênese somática é enfatizada pelo interesse em incrementar a participação do Brasil como exportador no mercado internacional de frutas tropicais, atividade geradora de emprego e de renda, e alternativa de peso na recomposição da economia de diversas regiões do país (BARROS, 1999).

O trabalho pioneiro com a indução da embriogênese somática a partir de tecidos de caquizeiro foi realizado por HIROKAZU *et al.* (1998) no Japão, trabalhando com segmentos foliares provenientes de plantas obtidas de ápices meristemáticos cultivados *in vitro* em

meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$  suplementado com BAP e ANA em diferentes concentrações. Posteriormente, não se encontraram trabalhos semelhantes publicados, ainda que se saiba que a técnica de indução da embriogênese somática seja uma ferramenta com grande potencial para a propagação massal do caquizeiro.

O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um protocolo para a embriogênese somática do caquizeiro.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no período de 2000 a 2002. Todos os experimentos foram realizados com compostos auxínicos e citocinínicos padrão Sigma. Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa estatístico MSTAT, realizando-se o teste F e, quando necessário, o teste adicional de Tukey a 5% de probabilidade.

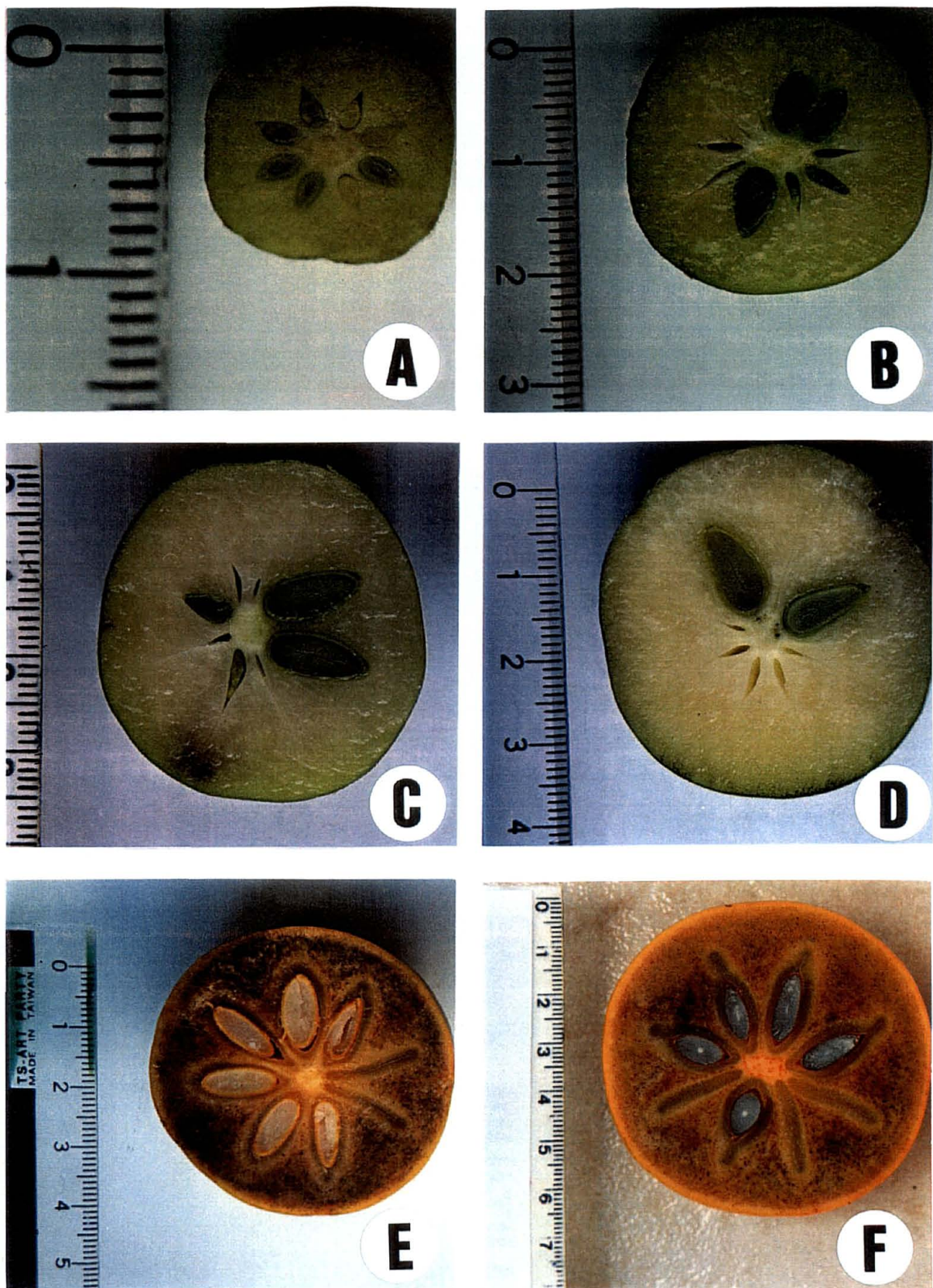
Como fonte de explantes foram utilizados embriões em diversos estádios de desenvolvimento, retirados de frutos coletados de plantas adultas a campo. Nos estádios iniciais de desenvolvimento dos frutos (frutos com 0,8 a 3,5 cm de diâmetro), a assepsia foi realizada externamente nos frutos inteiros e as sementes foram retiradas dos frutos dentro da câmara de fluxo laminar. Neste caso a assepsia foi realizada pela lavagem em água corrente dos frutos, imersão em etanol 70% por três minutos, imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos e quatro lavagens em água esterilizada. Nos estádios de desenvolvimento em que as sementes já apresentavam tegumento formado, estas foram retiradas dos frutos e receberam o seguinte tratamento: imersão em etanol 70% por um minuto, imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por dez minutos e quatro lavagens em água esterilizada. Na câmara de fluxo laminar as sementes foram abertas e os embriões extraídos com auxílio de bisturi, sendo separados do endosperma.

#### 4.2.1 Efeito do estágio de desenvolvimento do embrião zigótico na indução de culturas embriogênicas.

Foi avaliado o melhor estágio de desenvolvimento do embrião zigótico para induzir a formação de massas embriogênicas, sendo testados seis estádios de desenvolvimento, a partir de quatro semanas após o florescimento, até a maturação, após 22 semanas (FIGURA 4.1).

Em cada coleta foram isolados 40 embriões em dois meios de cultura, um livre de reguladores e outro contendo 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 2  $\mu\text{M}$  de cinetina, associação esta descrita por GUERRA *et al.* (1999). O meio de cultura utilizado foi o  $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$  solidificado com 5,5g.L<sup>-1</sup> de ágar. Os frascos de 250 ml com 30 ml de meio de cultura foram mantidos no escuro e avaliados após 90 dias pela porcentagem de explantes com calo.

Os 40 calos obtidos no primeiro isolamento foram repicados para meio de cultura  $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$  solidificado com 5,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 2  $\mu\text{M}$  de cinetina e duas concentrações de 2,4-D: 10 e 20  $\mu\text{M}$ . As placas de Petri com 90 mm de diâmetro de vidro Pyrex contendo 20 ml de meio de cultura foram mantidas no escuro e avaliadas após 60 dias do isolamento, pela porcentagem de calos com massas pró-embriogênicas.



**FIGURA 4.1** - Frutos de caqui utilizado como fonte de explantes para os experimentos de embriogênese somática. A: Fruto com 4 semanas de desenvolvimento; B: Fruto com 7 semanas; C: Fruto com 10 semanas; D: Fruto com 13 semanas; E: Fruto com 16 semanas; F: Fruto com 22 semanas de desenvolvimento.

#### **4.2.2 Efeito de reguladores de crescimento na manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas**

As massas pró-embriogênicas obtidas no experimento anterior foram identificadas e utilizadas neste experimento. O meio de cultura utilizado foi o  $MS\frac{1}{2}NO_3$  solidificado com 5,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 2 µM de cinetina e as concentrações de 2,5, 5 e 10 µM de 2,4-D.

O delineamento foi em blocos ao acaso, com cinco repetições e dez calos por parcela. As placas de Petri com 90 mm de diâmetro de vidro Pyrex contendo 20 ml de meio cultura foram mantidas no escuro e avaliadas após 90 dias do isolamento pela porcentagem de calos com massas embriogênicas e número de embriões globulares por calo.

#### **4.2.3 Efeito de reguladores de crescimento na maturação dos embriões somáticos**

As culturas embriogênicas desenvolvidas no experimento anterior foram identificadas e utilizadas neste experimento. O meio de cultura utilizado foi  $MS\frac{1}{2}NO_3$  solidificado com 5,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 0,5 µM de AIB e as concentrações de 5, 10 e 20 µM de 2-iP.

O delineamento foi em blocos ao acaso, com cinco repetições e dez calos por parcela. As placas de Petri com 90 mm de diâmetro de vidro Pyrex contendo 20 ml de meio cultura foram mantidas no escuro e avaliadas após 60 dias do isolamento pela porcentagem de calos com massas embriogênicas, número de embriões globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares por calo.

#### **4.2.4 Efeito de reguladores de crescimento na conversão de embriões somáticos em plantas**

Os primeiros cinquenta embriões formados foram individualizados e cultivados em meio de cultura contendo 5 µM de 2-iP, 5 µM de AG<sub>3</sub> e 0,5 µM de AIB (citado por RIBAS, 2000) para a sua conversão em plantas. O meio de cultura utilizado foi o  $MS\frac{1}{2}NO_3$  solidificado com 5,5g.L<sup>-1</sup> de ágar. Os tubos de ensaio com dimensões de 15 X 2,5 cm contendo 15 ml de meio de cultura foram mantidos na luz e a avaliação foi realizada após 30



dias da instalação do experimento pela porcentagem de embriões convertidos em plantas, comprimento médio da raiz e da parte aérea e número de folhas por planta.

Posteriormente, outro experimento de conversão foi realizado, testando diferentes concentrações de BAP. O meio de cultura utilizado foi o  $MS\frac{1}{2}NO_3$  solidificado com  $5,5g.L^{-1}$  de ágar e suplementado com  $0,5 \mu M$  de  $AG_3$ . Os tratamentos foram as seguintes concentrações de BAP: 0, 0,25, 0,5 e  $1,0\mu M$ .

O delineamento foi em blocos ao acaso, com 3 repetições e 10 embriões por parcela. Os tubos de ensaio com dimensões de  $15 \times 2,5$  cm contendo 15 ml de meio de cultura foram mantidos na luz e a avaliação foi realizada aos 30 dias da instalação do experimento pela porcentagem de embriões convertidos em plantas, porcentagem de embriões oxidados, comprimento da parte aérea e da raiz e número de folhas por planta.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

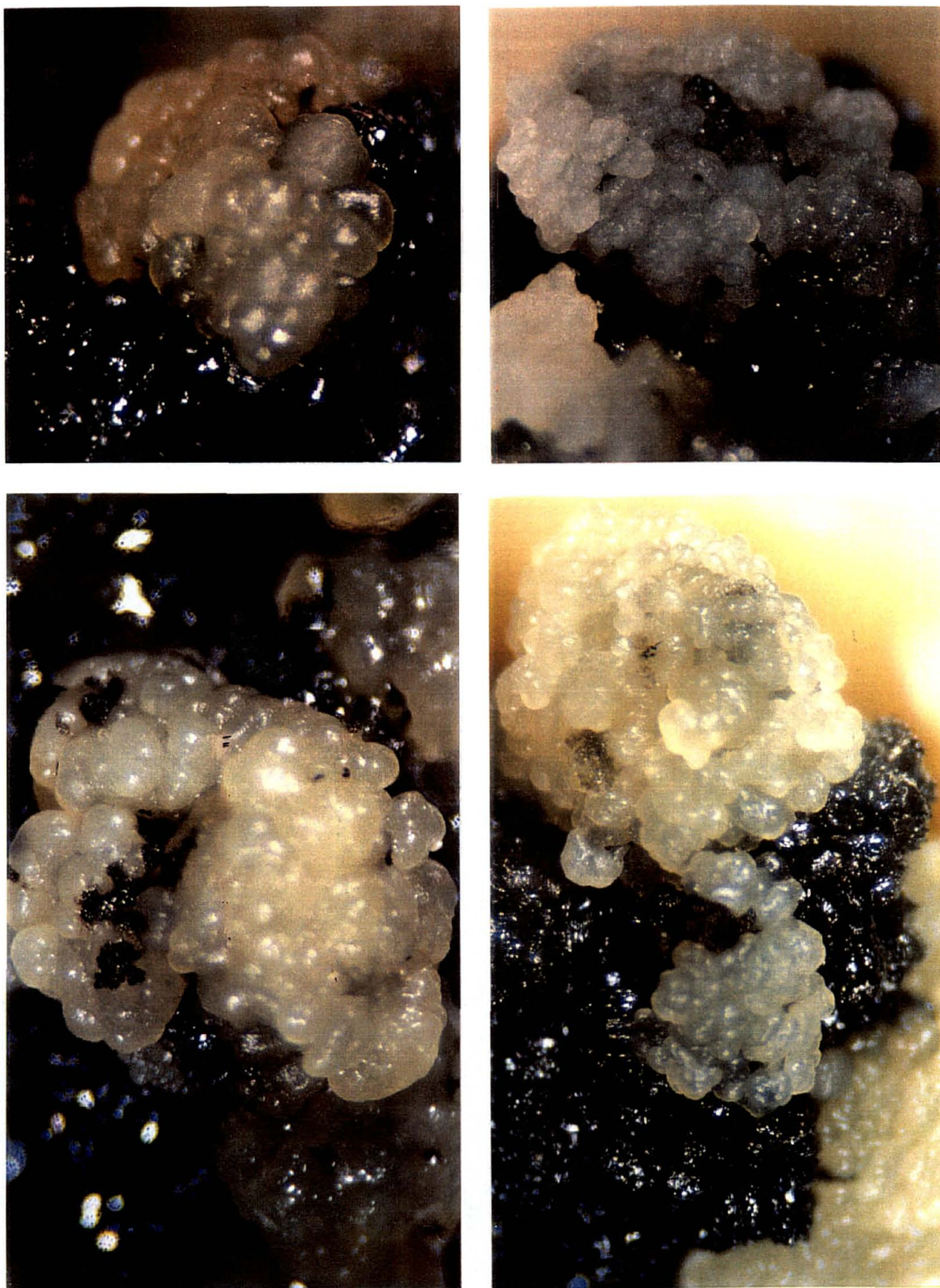
#### 4.3.1 Efeito do estágio de desenvolvimento do embrião zigótico na indução de culturas embriogênicas

Quanto às fontes de explantes testadas no presente trabalho, apenas os embriões zigóticos maduros (frutos com 22 semanas de formação) permitiram a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos em meio suplementado com 2,4-D. Os explantes isolados em meio de cultura sem reguladores de crescimento não formaram calos. A formação de calos escuros ocorreu em 86,7% dos quarenta explantes isolados de frutos a partir de 18 semanas de desenvolvimento, em meio suplementado com  $20 \mu M$  de 2,4-D, indicando que embriões com idade inferior apresentam fatores intrínsecos à sua maturidade fisiológica que bloquearam uma resposta aos reguladores de crescimento e ao desencadeamento do processo de embriogênese somática. Para que ocorram respostas morfogênicas é necessário que as células sejam competentes para responder às substâncias químicas reguladoras de crescimento. Os prováveis fatores internos que controlam a competência são os níveis endógenos de fitorreguladores do explante no início do cultivo e a capacidade das células de sintetizar essas substâncias de crescimento ou metabólitos essenciais (GEORGE, 1993).

A metade dos calos escuros obtidos nesta fase foram repicados para o mesmo meio de cultura e a outra metade para a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Aos 150 dias de cultivo dos explantes, foi possível verificar a formação de complexos ou massas celulares pró-embriogênicas em 52% dos calos cultivados em meio suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (TABELA 4.1). Estes complexos se caracterizam por serem regiões friáveis, normalmente branco-translúcidas e mucilaginosos quando comparados com calos não-embriogênicos que são esverdeados e duros (DURZAN, 1988; GUPTA *et al.*, 1993). Os embriões maduros apresentaram o padrão indireto de embriogênese, induzindo inicialmente uma massa celular embriogênica, com embriões somáticos se desenvolvendo em sua superfície (FIGURA 4.2).

**TABELA 4.1** - Efeito de duas diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos com massas pró-embriogênicas a partir de calos obtidos em meio de cultura com 20  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 2  $\mu\text{M}$  de cinetina (150 dias de cultivo).

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Calos com massas pró-embriogênicas (%)
10	52,00
20	15,15



**FIGURA 4.2** - Complexos celulares pró-embriogênicos formados a partir de embriões zigóticos em meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$  suplementado com  $10\ \mu M$  de 2,4-D e  $2\ \mu M$  de cinetina aos 150 dias de cultivo.

De acordo com VICIENT & MARTINEZ (1998), a indução da competência embriogênica é um processo que requer a exposição dos explantes a altas concentrações de auxinas durante um período de tempo variável e a transferência das células para um meio livre de reguladores ou com reduzidas concentrações.

Em muitas espécies, o processo de iniciação de embriões somáticos ocorre após a transferência do calo para meio com baixa concentração de auxina (GUERRA *et al.*, 1999; HARTMANN *et al.*, 1997; GEORGE, 1993; BAJAJ, 1995). Isto porque, após a iniciação, a auxina, em particular o 2,4-D inibe o desenvolvimento subsequente dos embriões. A presença contínua de auxina, quando uma célula embriogênica é obtida, pode ser prejudicial para o desenvolvimento normal dos embriões somáticos. Se a concentração de auxina for suficientemente alta, o embrião poderá originar novos embriões somáticos, em vez de prosseguir para o próximo estágio de sua ontogenia (PARROT *et al.*, 1991).

Outras auxinas como picloram e ácido naftalenoacético (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) foram testadas previamente na etapa de indução da embriogênese somática do caqui e não apresentaram resultados favoráveis para a expressão desta rota morfogênica, optando-se pela utilização do 2,4-D para os experimentos subsequentes. Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies como *Euterpe edulis* (GUERRA e HANDRO, 1998) e *Aspidosperma polyneuron* (RIBAS, 1999), nas quais o único fitorregulador eficiente para a indução da embriogênese somática foi o 2,4-D.

Na fase de indução da formação de calos pró-embriogênicos e na manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas foi também adicionado ao meio basal 2  $\mu\text{M}$  de cinetina. Como foi relatado por GEORGE (1993), a adição de uma concentração reduzida de citocinina (0,1 a 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP ou cinetina) em meios de cultura suplementados com auxinas, aumentou a taxa de crescimento dos calos embriogênicos de muitas espécies de dicotiledôneas.

#### **4.3.2 Efeito de reguladores de crescimento na manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas**

Massas celulares proliferando em meios de cultura contendo concentrações relativamente elevadas de 2,4-D só produziram embriões somáticos depois da transferência para meio basal sem a presença de 2,4-D ou com a concentração substancialmente reduzida deste regulador de crescimento (SHARP *et al.*, 1980). Na TABELA 4.2 pode-se

observar a evolução dos pró-embriões para o estágio globular mais pronunciadamente no tratamento com 5  $\mu$ M de 2,4-D.

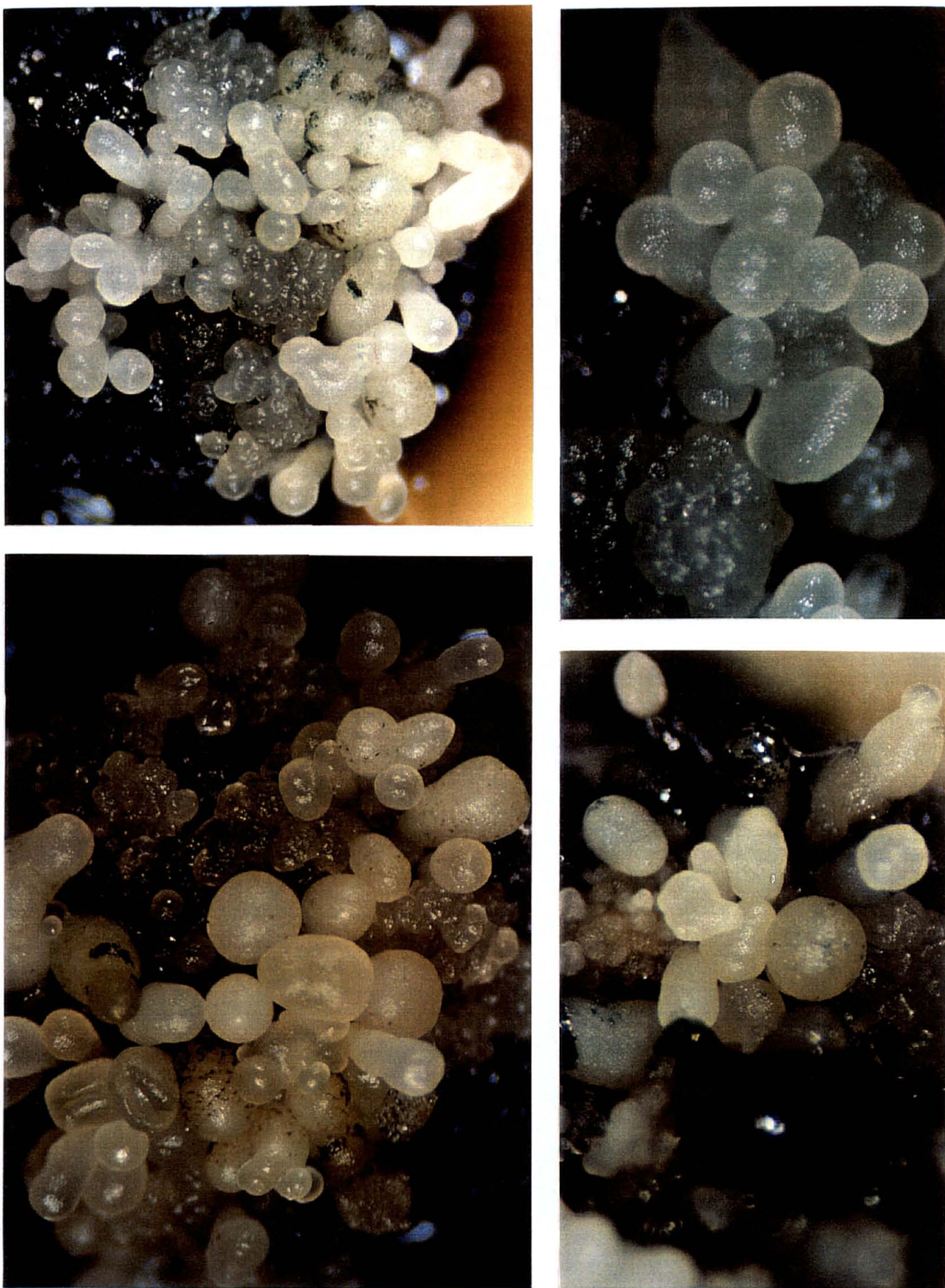
**TABELA 4.2** – Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas (90 dias de cultivo).

2,4-D ( $\mu$ M)	Calos com massas embriogênicas (%) <sup>1</sup>	Nº de embriões globulares/calor <sup>1</sup>
2,5	26,00	10,96
5,0	17,33	38,88
10,0	11,33	1,60
CV%	18,70	9,99

As médias não diferiram significativamente pelo teste F da análise de variância.

<sup>1</sup> Dados transformados por log (x+10)

Nesta etapa, a estratégia consiste em determinar as condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle restrito dos processos de diferenciação, de tal maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embriônicas ou embriões somáticos em estágios globulares iniciais de desenvolvimento (GUERRA *et al.*, 1999). Observou-se na superfície das massas celulares de caqui, a formação de embriões somáticos globulares (FIGURA 4.3) e a manutenção destas culturas em meio basal, acrescido de 2,4-D induziu a formação de pró-embriões e embriões somáticos globulares num processo contínuo.



**FIGURA 4.3** - Embriões somáticos globulares formados em meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$  suplementado com  $5\ \mu M$  de 2,4-D e  $2\ \mu M$  de cinetina aos 90 dias de cultivo.

O principal ponto de controle da manutenção de linhagens em ciclos repetitivos diz respeito a uma considerável redução dos níveis de reguladores de crescimento. Segundo CARMAN (1990), níveis reduzidos de 2,4-D melhoram o desenvolvimento morfológico e fisiológico dos embriões somáticos.

Nos vários sistemas em funcionamento de coníferas, observou-se que as concentrações médias destes reguladores nesta fase estão na faixa de 2 a 5  $\mu\text{M}$  para auxinas e citocininas (GUPTA *et al.*, 1993) Estas culturas devem ser mantidas no escuro, pois o ambiente de cultivo também influencia o processo de embriogênese somática, de modo que pode ocorrer numa variedade de regimes de luz/escuro, apesar de que o escuro, geralmente, é melhor para a indução e iniciação de embriões somáticos (THORPE, 1980). GUPTA *et al.* (1993) relataram que a maioria das culturas embriogênicas são mantidas no escuro, em temperaturas que variam de 22 e 25° C.

Segundo VASIL (1982), os embriões somáticos são formados somente se os níveis de 2,4-D estiverem abaixo de determinada concentração. Isto pode ser obtido por meio de repicagens para meio de cultura com baixos valores do referido fitoregulador, ou por manutenção durante longos períodos em cultura.

#### 4.3.3 Efeito de reguladores de crescimento na maturação dos embriões somáticos

As culturas constituídas de embriões somáticos globulares, que foram transferidas para meios de cultura suplementados com fitoreguladores com atividade citocinínica apresentaram avanço para outros estádios ontogenéticos como cordiforme, torpedo e cotiledonar, se desenvolvendo de forma assíncrona, não havendo diferença estatística entre as concentrações de 2-iP (TABELA 4.3).

**TABELA 4.3** - Efeito de reguladores de crescimento na maturação dos embriões somáticos (60 dias de cultivo).

2-iP ( $\mu\text{M}$ )	Calos com massas embriogênicas (%)	Número de embriões globulares/ calo <sup>1</sup>	Número de embriões cordiformes/ calo <sup>1</sup>	Número de embriões torpedo /calo <sup>1</sup>	Número de embriões cotiledo- nares/calos <sup>1</sup>
5	86,67	70,33	1,89	13,33	1,89
10	86,67	46,49	1,44	5,87	4,55
20	84,44	31,00	2,00	8,11	2,00
CV%	15,41	38,80	38,47	41,26	25,35

As médias não diferiram significativamente pelo teste F da análise de variância.

<sup>1</sup> Dados transformados por arco seno da raiz de (x+0,5)

Nesta fase da embriogênese somática compreende o estimular à progressão das fases iniciais para as fases tardias. A estratégia a ser empregada consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem um grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e aptos a se converterem em plantas (GUERRA *et al.*, 1999).

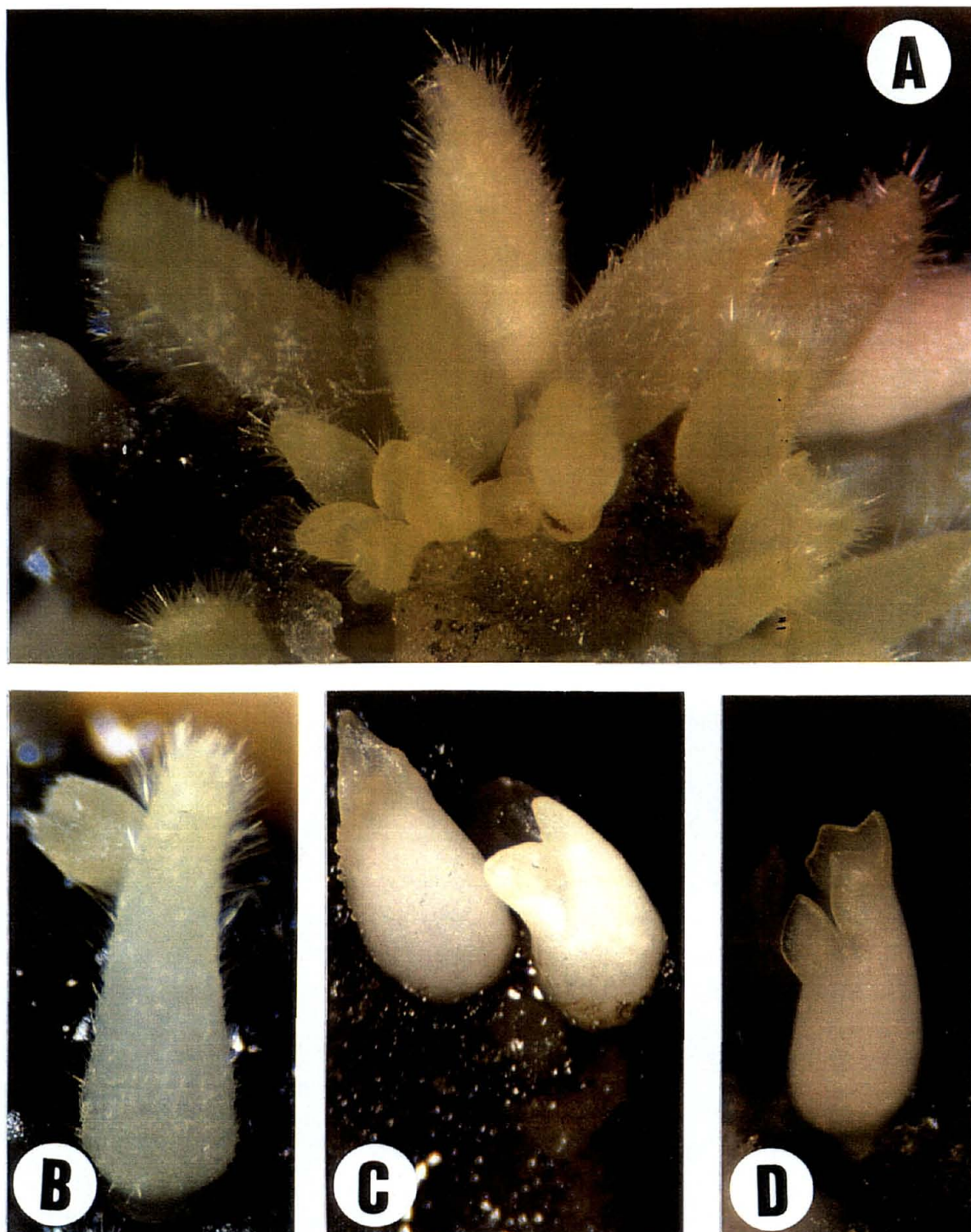
Segundo BAJAJ (1995), a fase de maturação é identificada pelo rápido crescimento e ganho de massa fresca e é a fase na qual ocorre a maior parte da deposição das substâncias de reserva como carboidratos e proteínas.

A formação de embriões com estruturas bipolares, tendo distinção entre os primórdios foliares e radiculares e a transição dos estádios cordiforme e torpedo fazem parte dos critérios para a maturação dos embriões (DINESHKUMAR *et al.*, 1995).

Segundo GRAY (1992), os embriões somáticos que se formam a partir de complexos pró-embriônicos tendem a se desenvolver de forma assíncrona, sendo que em determinado tempo vários estádios ontogenéticos são observados nas culturas (FIGURA 4.4). Da mesma forma que GUERRA e HANDRO (1998), trabalhando com culturas embriogênicas de *Euterpe edulis* repicados para meio de cultura contendo 2-iP e ANA, resultou-se na progressão dos embriões somáticos ao mesmo tempo que a cultura matriz mantinha a sua competência embriogênica.

Segundo MERKLE *et al.* (1995), a inclusão de citocininas durante a fase de histodiferenciação pode compensar os efeitos deletérios induzidos pelas auxinas no desenvolvimento de meristemas. GEORGE (1993) citou que quando as concentrações de BAP e cinetina são aumentadas para 5 e 10  $\mu\text{M}$ , elas anulam o efeito da auxina reduzindo a taxa de crescimento dos calos e iniciam a formação de embriões somáticos.





**FIGURA 4.4** - Embriões somáticos em estágio torpedo e cotiledonar aos 60 dias de cultivo em meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$  suplementado com 2-iP em diferentes concentrações. A e B: Embriões em estágio torpedo em meio com  $5\ \mu M$  de 2-iP; C: Embrião em estágio cotiledonar cultivado em meio com  $10\ \mu M$  de 2-iP; D: Embrião em estágio cotiledonar em meio com  $5\ \mu M$  de 2-iP.

#### 4.3.4 Efeito de reguladores de crescimento na conversão de embriões somáticos em plantas

No teste preliminar de conversão obteve-se a partir de cinquenta embriões no estágio torpedo, a conversão em plantas de 75,55% destes, com uma média de 0,85cm de comprimento de raiz, 1,25cm de parte aérea e 1,31 folhas por plântula quando cultivados em meio suplementado com 5  $\mu\text{M}$  de 2-iP, 5  $\mu\text{M}$  de AG<sub>3</sub> e 0,5  $\mu\text{M}$  de AIB.

Num segundo experimento, investigou-se a conversão dos embriões em plantas pela utilização da citocinina BAP em diferentes concentrações e os melhores resultados quanto ao comprimento das raízes e número de folhas por planta foi obtido no tratamento de 1 $\mu\text{M}$ , como pode ser observado na TABELA 4.4. O fenótipo das plantas em meio suplementado com BAP se deu de forma normal, sem alterações morfológicas visualmente perceptivas.

**TABELA 4.4** - Efeito de reguladores de crescimento na conversão dos embriões somáticos em plantas (30 dias de cultivo)

BAP ( $\mu\text{M}$ )	Embriões convertidos (%) <sup>*</sup>	Embriões oxidados (%) <sup>*</sup>	Comprimento da parte aérea (cm) <sup>*</sup>	Comprimento da raiz (cm) <sup>1</sup>	N <sup>o</sup> folhas/planta <sup>1</sup>
0	41,11	27,00	0,65	0,37 d	0,07 c
0,25	56,67	27,00	0,96	0,68 b	0,25 b
0,5	56,67	17,00	0,84	0,58 c	0,20 b
1,0	56,67	17,00	0,90	0,92 a	0,66 a
CV%	23,18	18,16	30,52	23,93	47,30

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

\* As médias não diferiram significativamente pelo teste F da análise de variância.

<sup>1</sup> Dados transformados para log (x+10)

A exigência mais importante para que ocorra a conversão é a obtenção de embriões maduros e totalmente desenvolvidos. Os embriões somáticos devem apresentar a morfologia externa normal e características internas semelhantes às dos embriões zigóticos. Essas características incluem os compostos de armazenamento, tais como proteínas, lipídios e carboidratos (GUPTA *et al.*, 1991). DINESHKUMAR *et al.* (1995) citaram ainda que a germinação de embriões somáticos se refere à produção simultânea de raízes e parte aérea a partir de embriões maduros.

CHALUPA (1990), citou que a conversão dos embriões somáticos de *Quercus suber* obtidos, em plantas pode ser alcançado pela transferência destes para meio MS com baixa concentração de AIB (0,1 a 0,2 mg.L<sup>-1</sup>). Os embriões somáticos germinaram e dentro de

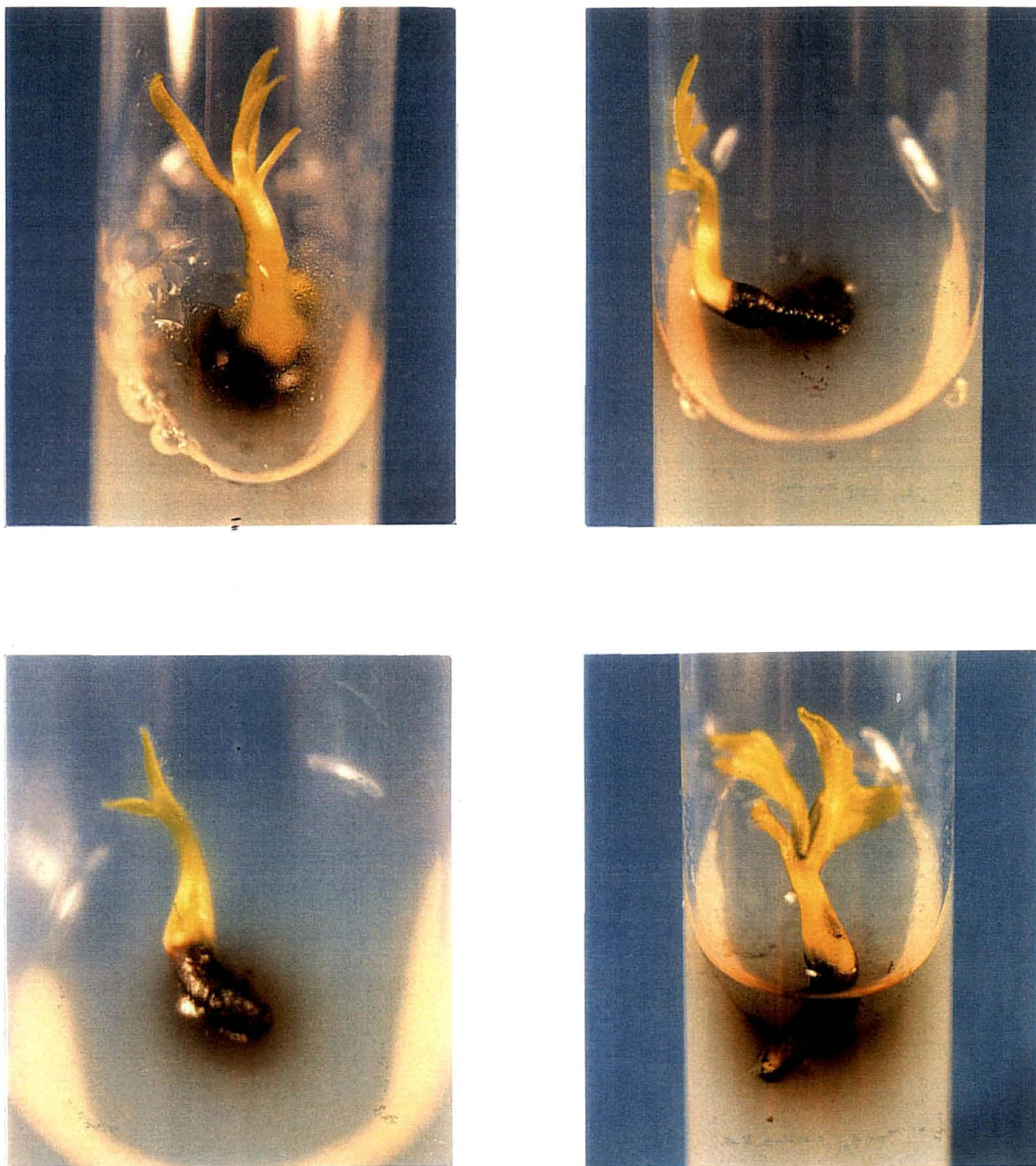
duas a quatro semanas produziram raízes e parte aérea, resultando numa taxa de conversão elevada (63 a 78%).

Muitos trabalhos citaram a não utilização de reguladores de crescimento na fase de conversão, no entanto, RIBAS (1999) citou a utilização da conjugação de reguladores AIB, ANA ou BAP e  $AG_3$ , resultando, no entanto, em nenhum embrião convertido de *Aspidosperma polyneuron*. BAJAJ (1995), trabalhando com *Citrus*, obteve a conversão dos embriões somáticos maduros em meio suplementado com  $AG_3$  e DINESHKUMAR *et al.* (1995), trabalhando com *Cicer arietinum* obtiveram a conversão dos embriões em meio suplementado com BAP ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e GRAY (1992), também utilizando BAP ( $1 \text{ } \mu\text{M}$ ), obteve a conversão de embriões somáticos de *Vitis rotundifolia* numa frequência de 80 a 100%.

Contudo, a conformação morfológica das plântulas mostrou-se alterada, sendo o fato representado por folhas encarquilhadas, fusionadas, coriáceas (FIGURA 4.5). Segundo REDENBAUGH *et al.* (1988), para que ocorra conversão, os embriões somáticos tem que realizar uma série de eventos: germinação (emissão da radícula), crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, produção de no mínimo duas folhas verdadeiras, conexão direta da raiz com a parte aérea e produção de uma planta verde com fenótipo normal.

GUERRA *et al.* (1999), citam que o efeito das auxinas como indutoras da embriogênese somática pode também acarretar a formação de embriões anômalos quando estes passam por prolongados períodos em meios suplementados com estas substâncias.

Para RAEMAKERS *et al.* (1995), o desenvolvimento de embriões somáticos mal formados e/ou a formação de folhas carnosas com caules fasciados é consequência de maturação insuficiente. Esse fenômeno tem sido observado para muitas espécies e é denominado de germinação precoce, que se refere ao embrião em desenvolvimento que tende a desviar dos estádios normais de embriogênese somática e adquirem características de uma plântula mal formada.



**FIGURA 4.5** - Plântulas formadas a partir de embriões somáticos cultivados durante 30 dias em meio  $MS\frac{1}{2}NO_3$  suplementado com  $5\ \mu M$  de 2-iP,  $5\ \mu M$  de  $AG_3$  e  $0,5\ \mu M$  de AIB.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram o estabelecimento de um protocolo para a embriogênese somática do caquizeiro a partir de embriões zigóticos.

Foi observado o padrão indireto de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros, retirados de frutos com 22 semanas de formação, quando cultivados em meio de cultura suplementado com 2,4-D, sendo a taxa mais expressiva de pró-embriões encontrada na concentração de 10 $\mu$ M de 2,4-D combinado com cinetina 2  $\mu$ M. A fase de manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas foi mais eficiente com 5  $\mu$ M de 2,4-D, na qual os pró-embriões avançaram para o estágio globular. Na fase de maturação as concentrações de 2-iP testadas atuaram promovendo os embriões globulares a estádios mais avançados da ontogenia como cordiforme, torpedo e cotiledonar.

A conversão dos embriões em plantas ocorreu de forma mais eficiente quando o meio foi suplementado com a citocinina BAP na concentração de 1  $\mu$ M e 0,5  $\mu$ M de AG<sub>3</sub>.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

- BAJAJ, Y.P.S. Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement. In:BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 105-119.
- BARROS, L.M. Embriogênese somática. **Biociencia: Ciência e Desenvolvimento**. Ano II, n.7, p.36-39, 1999.
- BIASI, L.A.; CARVALHO, D.C.; WOLF, G.D.; ZANETTE, F. Potencial organogenético de tecidos caulinares e radiculares de caquizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 29-34, 2002.
- CARMAN, J.G. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. **In vitro Cell & Development Biology Plant**, Rockwile, v.26, p.746-753, 1990.
- CHALUPA, V. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). **Plant Cell Reports**, n.9, p. 398-401, 1990.
- CHOI, J.Y.; KIM, H.J.; LEE, C.H.; BAE, J.M.; CHUNG, Y.S.; SHIN, J.S.; HYUNG, N.Y. Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment cultures of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.37, n.2, p.274-179, 2001.

- DINESHKUMAR, V.; KIRTI, P.B.; SACHAN, J. K. S.; CHOPRA V. L. Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum*). **Plant Science**, v.109, p.207-213, 1995.
- DURZAN, D.J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, England, v.6, p.341-378, 1988.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. England: British Library, 1993. 272p. (Part 1)
- GRAY, D.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. **American Journal of Botany**, v.79, n.5, p.542-546, 1992.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.111, p.65-71, 1998.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A C.; FERREIRA, A T. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – CNPH, 1999. p. 533-568.
- GUPTA, P.K.; TIMMIS, R.; CARLSON, W.C. Somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of forestry species. In: SOH, W.Y.; LIU, J.R.; KOMAMINE, A. **Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants**. Korean Society of Plant Tissue Culture, 1993, p.18-37.
- GUPTA, P.K.; TIMMIS, R.; PULLMAN, G.; YANCEY, M.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.; CARPENTER, C. Development of an embryogenic system for automated propagation of forest trees. In: VASIL, I.K. **Scale-up and automation in plant propagation**. California: Academic Press, 1991. p.75-93.
- HARTMANN, H. T.; KESTER D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. Prentice Hall, 6ª ed., New Jersey, 1997. 770p.
- HIROKAZU, F.; NISHIMOTO K.; MURASE, I.; NAKAMURA, M. Somatic embryogenesis from the leaf tissues of continuously subcultured shoots in Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). **Japanese Journal of Breeding**, n. 38, p. 465-469, 1998.
- IBRAF. Banco de dados sobre fruticultura. Instituto brasileiro de frutas. Disponível em: [www.ibraf.org.br](http://www.ibraf.org.br). Capturado em: 04/11/02.
- MARTINS, F.P.; PEREIRA, F.M. **Cultura do caqui**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 71p.
- MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.155-203.

- PARROT, W.A.; MERKLE, S.A.; WILLIAMS, E.G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D.R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood., 1991. p.158-200.
- RAEMAKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica*, Dordrecht, v.81, p.93-107, 1995.
- REDENBAUGH, K.; FUJII, J.A.; SLADE, D. Encapsulated plant embryos, In: MIZRAHI, A. (Ed.) **Biotechnology in agriculture**. New York: Alan R. Liss, 1988. p.225-248.
- RIBAS, L. L. F. **Morfogênese *in vitro* e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. (Peroba-Rosa)**. Curitiba, UFPR. 1999 (Tese de doutorado).
- SHARP, W.P; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Review*, New York: v.2, p.268-310, 1980.
- THORPE, T.A. *In vitro* somatic embryogenesis. In: VASIL, I.K. **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p. 71-111.
- VASIL, I.K.; Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p.101-103.
- VICIENT, C.M.; MARTÍNEZ, F.X. The potencial uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to syntetic seed technology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.10, n.1, p.1-12, 1998.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização do trabalho experimental e da análise, discussão e redação dos resultados, é possível fazer uma comparação entre os três processos apresentados, pontuando as vantagens e desvantagens de cada um, assim como indicar os pontos em que novas pesquisas podem concentrar-se a fim de atingir um protocolo eficiente para a propagação *in vitro* do caquizeiro.

Embora a maioria dos trabalhos de cultura de tecidos de caquizeiro se refiram ao cultivo de ápices meristemáticos e que estes sejam os explantes mais indicados para a propagação clonal *in vitro* desta espécie, neste trabalho esses tecidos vegetais não se desenvolveram além da fase de estabelecimento. Sugere-se que em trabalhos futuros sejam investigadas diferentes composições do meio de cultura e outros compostos como vitaminas para favorecer o desenvolvimento dos ápices meristemáticos. Os aminoácidos adenina, cisteína e arginina devem ser melhor testados para obtenção de níveis precisos de diferenciação entre os três tratamentos, de modo a obter resultados conclusivos quanto a necessidade de suplementação do meio de cultura com estes compostos, uma vez que os resultados obtidos quanto ao desenvolvimento dos ápices meristemáticos diferiram pouco entre os tratamentos e a testemunha.

A indução da organogênese indireta, conduziu o trabalho a resultados promissores quanto ao crescimento de gemas adventícias e ao potencial de enraizamento das brotações juvenis obtidas a partir de segmentos radiculares, no entanto, o protocolo gerado pela pesquisa deve ser também testado para a 'Fuyu', pois a variabilidade na resposta morfo genética *in vitro* ocorre não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie, levando à necessidade de se definirem protocolos diferenciados.

A aplicação da técnica de embriogênese somática em embriões zigóticos de caquizeiro demonstrou resultados muito promissores neste trabalho. No entanto, para que um protocolo para a produção massal de plantas possa ser estabelecido, há necessidade de adequação do processo em si e também a novos tipos de explantes, como os provenientes da cultivar Fuyu, assim que possam ser estabelecidos *in vitro*.

A embriogênese somática tem potencial para multiplicar milhões de plantas de espécies frutíferas, sendo que as taxas de multiplicação de culturas embriogênicas ultrapassam às atingidas em outros sistemas de regeneração *in vitro* e em sistemas de



propagação convencionais. Os embriões somáticos podem se desenvolver em meios líquidos, onde ocorre a produção em grande escala de embriões em bioreatores. Os embriões somáticos podem ser encapsulados para produzir sementes sintéticas ou artificiais, que podem ser armazenadas ou plantadas como sementes.

No entanto, a embriogênese somática apresenta algumas limitações que tem dificultado sua utilização como sistema de micropropagação. Entre elas a necessidade de obtenção de um sistema reproduzível em larga escala e a variabilidade genética indesejável, que às vezes é introduzida pelo processo. Além disso, a perda da capacidade embriogênica das células dificulta o processo de multiplicação contínua.

Em comparação com a embriogênese somática, a cultura de partes aéreas apresenta a desvantagem de requerer maior manipulação, pois partes aéreas e raízes são formadas em fases distintas. Por outro lado, a proliferação de gemas axilares tem a vantagem de ser um processo natural que ocorre *in vitro*, sendo um sistema mais facilmente controlado e apresenta uma fidelidade genética muito alta, além dessas culturas ganharem maior capacidade de proliferação com o suceder das subculturas, principalmente para espécies lenhosas.

Finalmente, o sucesso de um sistema de cultivo *in vitro* depende do controle de grande número de variáveis, não só as referentes a composição do meio de cultivo, do ambiente onde se desenvolvem as culturas e das características do explante, mas também da fase de aclimatização, momento no qual podem ocorrer perdas substanciais no número de plantas propagadas. Métodos eficientes para a aclimatização de plantas de caquizeiro regeneradas *in vitro* ainda não foram estabelecidos.

Para o sucesso da micropropagação em larga escala, o desenvolvimento de métodos para a aclimatização de mudas de caquizeiro devem ser desenvolvidos. O enraizamento *ex vitro* pode também ser um caminho promissor para o estabelecimento das estacas nas condições ambientais.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os trabalhos pioneiros no Brasil com cultura de tecidos de caquizeiro são muito recentes, datando dos últimos cinco anos e há ainda um longo caminho a ser percorrido na pesquisa até que se estabeleça um protocolo eficiente para a micropropagação desta espécie. Neste trabalho foram obtidos resultados promissores, que certamente servirão como ponto de partida para novas pesquisas, devendo-se aprofundar as investigações quanto à resposta dos explantes a novos tipos e associações de reguladores de crescimento. Algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser pontuadas:

- a zeatina, embora tenha sido citada como a citocinina mais eficiente para a organogênese do caquizeiro, é um regulador de crescimento de elevado custo, então sugere-se a aplicação de TDZ no meio de cultivo em doses mais reduzidas do que as citadas neste trabalho ou a imersão rápida em solução pulso;

- na fase de multiplicação é necessário que se estabeleça o número máximo de subcultivos e também as taxas de multiplicação;

- testar novos métodos para a essepsia para que os ápices meristemáticos possam ser mais eficientemente estabelecidos *in vitro*;

- para a organogênese do caquizeiro da cultivar Fuyu, testar outros explantes, como segmentos nodais obtidos pela brotação de estacas cultivadas em água e também segmentos foliares excisados de folhas de plantas adultas;

- aplicar técnicas diferenciadas para a aclimatização das plântulas obtidas, como por exemplo a exposição gradativa das plantas ao ambiente, evitando a desidratação precoce destas e maximizando as taxas de sobrevivência.