

Organogênese do caquizeiro a partir de ápices meristemáticos, segmentos radiculares e foliares

Charles Allan Telles^{1*} e Luiz Antonio Biasi²

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná (UFPR). ²Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. Cx. Postal 19.061. 81531-990. Curitiba, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: charles.allan@bol.com.br

RESUMO. O trabalho propõe um protocolo para micropropagação de caquizeiro, cultivares Fuyu e caqui café. No cultivo inicial, com ápices meristemáticos, o primeiro ensaio avaliou o efeito da zeatina e 2-iP (0, 5, 10 e 20 μM) e o segundo avaliou o efeito dos aminoácidos adenina, glutamina, cisteína e arginina (45 mg L^{-1}). Para indução da organogênese direta utilizaram-se segmentos radiculares, testando as auxinas AIA, ANA e AIB (0,01 e 0,1 μM), combinadas com zeatina (1 μM). Para indução da organogênese foliar, foram testados três concentrações de zeatina (5, 15 e 30 μM) combinadas com AIB (0,05 μM). A zeatina (5 μM) foi superior ao 2-iP no desenvolvimento das brotações oriundas dos ápices meristemáticos. No experimento com os aminoácidos, verificou-se apenas uma tendência de melhores resultados com a cisteína e arginina. Na organogênese radicular, o ANA apresentou-se superior no desenvolvimento dos brotos, porém nas diferentes concentrações testadas não houve diferenças significativas. Os segmentos foliares juvenis apresentaram capacidade de gerar brotações e responderam as aplicações de zeatina.

Palavras-chave: *Diospyrus kaki*, cultura de tecidos, reguladores de crescimento, aminoácidos, fruticultura.

ABSTRACT. Organogenesis of Japanese persimmon from meristem tips, roots and leaf segments. This work proposes an efficient protocol for micropropagation of Japanese persimmon, cultivar Fuyu and persimmon cv. *café*. In the initial culture with meristem tips, the first essay evaluated the effect of zeatina and 2-iP (0, 5, 10 and 20 μM) and the second evaluated the effect of adenine, glutamine, cistein and arginin (45 mg L^{-1}) amino acids. For direct organogenesis induction, roots segments were used, testing the auxins IAA, NAA and IBA (0.01 and 0.1 μM), combined with zeatina (1 μM). For leaf organogenesis induction, three concentrations of zeatina (5, 15 and 30 μM) were evaluated, combined with IBA (0.05 μM). The zeatina (5 μM) was superior to 2-iP in the shoot development of the meristem tips. In the experiment with amino acids, only a tendency of better results with cistein and arginin was verified. In root organogenesis, the NAA was superior in the shoot development, but in the different tested concentrations, there were not significant differences. New foliar segments showed capacity to shoot forth and they responded to the zeatina applications.

Key words: *Diospyrus kaki*, tissue culture, growth regulators, amino acids, fruit production.

Introdução

O caquizeiro é uma frutífera de grande expressão econômica para o Brasil, sendo exportado para diversos países (IBRAF, 2002). A inserção do Estado do Paraná na fruticultura brasileira se faz, entre outras frutíferas, pelo cultivo do caquizeiro, já que 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 em 2002 foi apenas superada pelos estados de São

Paulo (58,39%) e Rio Grande do Sul (16,99%) (IBGE, 2003).

O cultivar preferido para a exportação é a 'Fuyu', alcançando também melhor cotação tanto no mercado interno quanto no externo, devido a sua característica de produzir frutos sem taninos (Penteado, 1986). O cultivar pertence ao grupo Amagaki, com polpa firme, amarela e pode ser consumido sem que tenha que passar pelo processo de destanização (Simão, 1998).

A propagação convencional de caquizeiros pela via sexuada não é desejada, devido ao seu longo período vegetativo, 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 (garfagem ou borbulhia) 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, sendo um processo demorado, oneroso e com baixas taxas de pegamento (Biasi *et al.*, 2002). De outra forma, a estaquia tanto lenhosa quanto herbácea apresenta baixa capacidade de enraizamento (Cooper e Cohen, 1984; Rubbo, 1989; Fukui *et al.*, 1992; Tao e Sugiura, 1992; Biasi *et al.*, 2002).

Uma alternativa para obtenção de mudas uniformes em caquizeiro seria estabelecer uma tecnologia de propagação vegetativa para a formação direta das mudas, tanto de cultivares copas como para porta-enxertos, o que representará um significativo avanço na cultura do caquizeiro (Martins e Pereira, 1989).

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 de várias espécies frutíferas. Outro valor potencial da micropropagação é a produção de mudas a partir de propágulos dos cultivares comercialmente produtivas, o que poderá suprimir a utilização da enxertia, que é um procedimento demorado e caro (Tao e Sugiura, 1992). O emprego dessa técnica na cultura de tecidos tornou possível a regeneração de gemas tanto de raízes gemíferas, quanto de raízes sem essa capacidade, sob condições naturais (Kerbaui, 1998). 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 for utilizados tecidos jovens, que possuem maior competência organogênica, como ápices radiculares. Como também verificado por Salomão *et al.* (2000), que observaram que as gemas laterais juvenis de caquizeiro 'Cereja' apresentam boas taxas de brotação.

Essa técnica de micropropagação em caquizeiro ainda deveser aperfeiçoada, porque existem dificuldades na assepsia dos materiais utilizados, na taxa de brotação e multiplicação dos explantes e ainda dificuldades no enraizamento como verificado em trabalhos realizados por Salomão *et al.* (1999, 2000).

Este trabalho visou contribuir com informações para o estabelecimento de um protocolo de organogênese *in vitro* do caquizeiro que possa refletir na obtenção de mudas de boa qualidade e em larga escala.

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, Curitiba, Estado do Paraná, no período de agosto de 2002 a julho de 2003.

Para a cultura de ápices meristemáticos, foram utilizados como fonte de explantes estacas lenhosas coletadas a campo de plantas adultas da cultivar 'Fuyu', durante o período de dormência (julho), os quais foram envolvidos por jornal úmido, acondicionado em sacos plásticos fechados e mantidas sob refrigeração (3 a 5°C).

A assepsia das estacas foi realizada em câmara de fluxo laminar pela imersão destas, em solução de benomyl (2 g L⁻¹) por 16 horas, etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% com Tween-20 a 0,1% (uma gota a cada 100 mL) por 30 minutos. Em seguida, foram feitas quatro lavagens em água destilada e autoclavada.

Os explantes foram ápices meristemáticos com aproximadamente 2 mm de tamanho, retirados das gemas apicais e laterais dormentes das estacas lenhosas. Os ápices foram cultivados em placas de petri por um período de sete a dez dias, antes de serem transferidos para os experimentos descritos a seguir, sendo colocados em torno de 12 ápices por placa, visando eliminar os contaminados. O meio de cultura foi o MS ½ NO₃, que consiste no meio de cultura MS, com a metade da concentração de nitratos (Sugiura *et al.*, 1986), isento de reguladores de crescimento.

Foram realizados experimentos distintos; no ensaio 1 foi avaliado o efeito da zeatina e 2-isopenteniladenina (2-iP), foi implantado em esquema fatorial com oito tratamentos, resultantes da combinação de duas citocininas (zeatina e 2-iP) em quatro concentrações (0, 5, 10 e 20 µM) em frascos de 250 mL com 30 mL de meio basal MS ½ NO₃. Foi realizada autoclavagem dos meios em temperatura de 120°C a 1,5 atm por um período de 20 minutos. Para a esterilização da zeatina e 2-iP foi feita por filtração em membrana de nylon com poro de 0,22 µm. O delineamento utilizado foi de inteiramente ao acaso, com cinco repetições e 4 explantes por parcela.

Após 50 dias de cultivo em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 25 µmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2°C, foi realizado, a avaliação do número de explantes brotados, e número de folhas expandidas por brotação e comprimento das brotações.

No ensaio 2, foi avaliado o efeito de diferentes aminoácidos (adenina, glutamina, cisteína e arginina) no desenvolvimento dos ápices. Para tanto, foi realizado em frascos de 250 mL com 30 mL de meio

basal MS $\frac{1}{2}$ NO₃, suplementados com zeatina (15 μ M), sendo testados os aminoácidos: adenina, glutamina, cisteína e arginina, todos na concentração de 45 mg L⁻¹, mais a testemunha, sem a presença de nenhum deles. Após inoculação, os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 25 μ mol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 \pm 2°C. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições e 12 explantes por parcela.

Foi realizada avaliação após o primeiro subcultivo (110 dias) mediante as seguintes variáveis: número de explantes brotados, número de explantes mortos, número de folhas expandidas por brotação e comprimento das brotações.

O terceiro ensaio objetivou a organogênese direta a partir de segmentos radiculares nos quais os explantes foram obtidos a partir de frutos maduros de caqui Café, que foram coletados a campo e levados para o laboratório, onde foram extraídas suas sementes. Estas receberam uma assepsia antes da retirada do embrião que consistiu em: lavagem em água corrente, seguida de imersão em solução com fungicida (1 g L⁻¹ de captan e 1g L⁻¹ de benomyl), por 16 horas. Após, foi realizada uma nova lavagem em água corrente, seguida de imersão em álcool 70% por dois minutos, com posterior imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos. Para finalizar, foram feitas mais quatro lavagens com água destilada e esterilizada.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram abertas e os embriões retirados com o auxílio de bisturi, eliminando-se o endosperma. Os embriões foram inoculados individualmente em frascos contendo também meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ NO₃, para sua germinação, desenvolvimento e enraizamento. Após 75 dias, quando as raízes apresentaram comprimento médio de 5 cm, os segmentos radiculares foram incisados em 1,5 cm cada.

Os segmentos radiculares foram inoculados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ NO₃, suplementado com zeatina (1 μ M) com diferentes tipos de auxinas: ácido indol acético (AIA), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indol butírico (AIB), nas concentrações 0,01 μ M e 0,1 μ M, mais a testemunha. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições e oito explantes por parcela, distribuindo-se quatro explantes por frasco.

A avaliação foi realizada após 125 dias de cultivo, e foram observadas as seguintes variáveis: número de explantes brotados, número de brotações por explante, número de folhas expandidas por brotação e comprimento das brotações.

E o quarto ensaio avaliou a organogênese direta a partir de folhas, em que foram utilizados segmentos foliares com média de 1,5 cm x 1,5 cm de tamanho, as quais foram obtidas a partir do isolamento dos

embriões das sementes do ensaio anterior, sendo as mesmas plântulas de onde foram retirados os segmentos radiculares.

Os segmentos foliares foram colocados com a face adaxial em contato com o meio, sendo inoculados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ NO₃, suplementados com AIB (0,05 μ M) e três concentrações de zeatina (5, 15 e 30 μ M), em frascos de 250 mL com 30 mL de meio, os quais foram mantidos no escuro por 45 dias e após esse período, foram transferidos para a condição de luz em intensidade luminosa de 25 μ mol m⁻² s⁻¹, onde permaneceram por mais 100 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições com oito explantes por parcela.

A avaliação foi realizada, portanto, após 145 dias de cultivo, computando-se os seguintes dados: número de explantes brotados, número de brotações por explante, número de folhas expandidas por brotação e comprimento das brotações.

Resultados e discussão

A análise fatorial dos dados do primeiro ensaio apresentou interação significativa para a porcentagem de explantes brotados e número de folhas por broto, em que a citocinina zeatina foi superior ao 2-iP. Foi verificado um aumento na porcentagem de explantes brotados (Figura 1) e maior número de folhas por brotação (Figura 2), com o aumento da concentração das citocininas.

Essas variáveis apresentaram comportamento quadrático, sendo possível estimar, pelas equações de regressão, a máxima porcentagem de brotação (100%), com 12,48 μ M de zeatina e 50% de brotação com 15,22 μ M de 2-iP (Figura 1) e o máximo número de folhas (2,6), com 12,76 μ M de zeatina e 0,85 folhas com 12,48 μ M de 2-iP (Figura 2).

Quanto ao comprimento das brotações, não houve interação significativa entre as concentrações testadas. Entretanto, o efeito das citocininas e das concentrações foi significativo; a zeatina foi superior ao 2-iP, com brotações de 0,42 cm e 0,21 cm, respectivamente. Para ambas as citocininas, houve pouco incremento no crescimento das brotações, sendo a melhor concentração para alongamento de brotos a dose de 12,92 μ M calculada pela equação de regressão (Figura 3).

A zeatina é especialmente efetiva para a micropropagação do caquizeiro porque vários cultivares podem ser melhor estabelecidos e apresentarem maior proliferação nessa citocinina do que em meios suplementados com BAP (benzilaminopurina) (Tao e Sugiura, 1992; Fukui *et al.*, 1989). Em ensaios anteriores, como o cultivar Fuyu, em meio suplementado com BAP, não houve resposta satisfatória quanto à brotação e ao

crescimento. Entretanto, em meio basal MS $\frac{1}{2}$ NO₃, suplementado com zeatina 10 μ M, Tao e Sugiura (1992) conseguiram estabelecer ápices meristemáticos *in vitro* com sucesso.

A zeatina exerce um papel de grande importância no cultivo *in vitro* de ápices de caquizeiro, fato evidenciado por este trabalho e descrito anteriormente por Cooper e Cohen (1984). Todavia, apesar da importância da zeatina na micropropagação de caquizeiro, trata-se de uma citocinina de custo elevado para a cultura de tecidos (Cooper e Cohen, 1984), sendo necessárias investigações com novos compostos de efeito similar para reduzir o custo de produção de mudas *in vitro*.

O cultivo dos ápices meristemáticos em meio de cultura suplementado com diferentes aminoácidos não apresentou diferenças estatísticas significativas para todas as variáveis analisadas (Tabela 1), apesar de estudos mostrarem que em culturas de tecidos o nitrogênio orgânico ser muito importante. Esse elemento tem efeito significativo na divisão celular e na morfologia da planta, e os aminoácidos têm sido utilizados como uma fonte de nitrogênio no meio de cultura (Pedrotti *et al.*, 1994).

Foi observado que alguns aminoácidos mostraram tendências a respostas mais promissoras, mesmo sem diferenças estatisticamente significativas, como é o caso da cisteína, que apresentou em relação à testemunha 65% mais explantes brotados e 47,8% menos explantes mortos, e da arginina, que apresentou brotações com comprimento médio 47,6% maiores e 42,7% mais folhas por broto do que a testemunha.

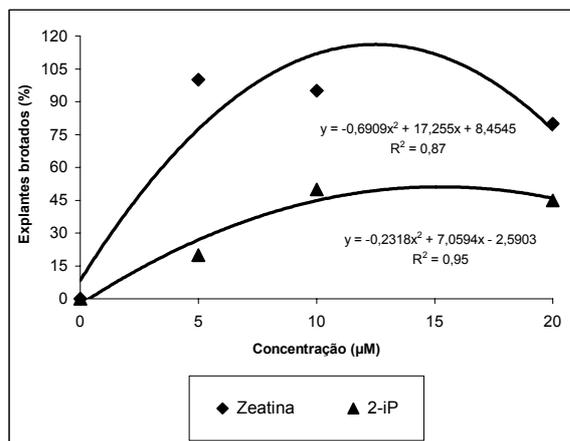


Figura 1. Porcentagem de explantes brotados, a partir de ápices meristemáticos de caquizeiro 'Fuyu' em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ NO₃ com zeatina e 2-iP em diferentes concentrações (CV = 27,5%)

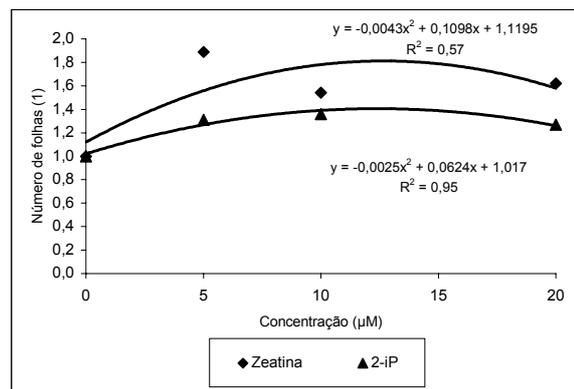


Figura 2. Número de folhas por broto a partir de ápices meristemáticos de caquizeiro 'Fuyu' em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ NO₃ com zeatina e 2-iP em diferentes concentrações. (1) Dados transformados em raiz (x + 1) (CV = 16,3%).

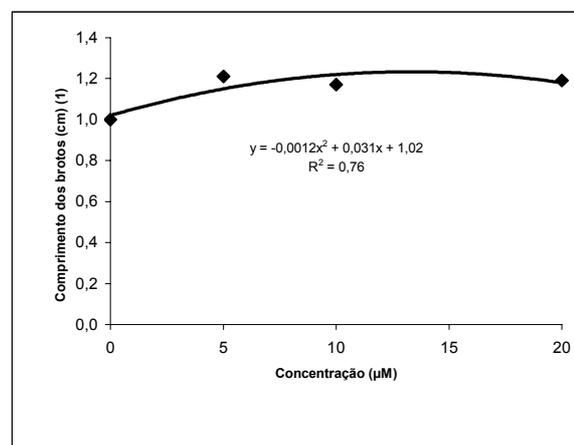


Figura 3. Comprimento médio dos brotos a partir de ápices meristemáticos de caquizeiro 'Fuyu' em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ NO₃ com zeatina e 2-iP em diferentes concentrações. (1) Dados transformados em raiz (x + 1) (CV = 5,7%).

Tabela 1. Porcentagem média de explantes brotados e mortos por parcela, comprimento e número de folhas por broto de caquizeiro 'Fuyu' em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ NO₃ + 15 μ M de zeatina com diferentes aminoácidos na dose de 45 mg L⁻¹

Tratamento	Explantes brotados (%)	Explantes mortos (oxidados) (%)	Comprimento dos brotos (cm)	Número de folhas/broto
Testemunha	28,3 ^{ns}	38,3 ^{ns}	0,53 ^{ns}	2,13 ^{ns}
Adenina	28,3	38,3	0,42	1,68
Glutamina	45,0	21,7	0,47	2,46
Cisteína	46,7	20,0	0,60	2,39
Arginina	35,0	31,7	0,78	3,04
C.V.	47,56	58,13	62,73	47,08

^{ns} Não significativo, pelo teste F da análise de variância.

A adenina, apesar de não diferir dos demais tratamentos, é um aminoácido muito utilizado, sendo seu efeito muitas vezes equiparado ao de uma citocinina fraca, podendo ocorrer uma interação com as citocininas utilizadas no meio de cultura (Caldas *et al.*, 1998). Neste sentido, é importante testar novas concentrações e combinações desses e de outros

aminoácidos para o cultivo *in vitro* do caquizeiro.

Na organogênese direta a partir de segmentos radiculares, constatou-se que houve um bom desenvolvimento de brotos adventícios, porém não ocorreram diferenças significativas quando se compararam os resultados nas diferentes concentrações de auxinas (Tabela 2).

Tabela 2. Resposta da organogênese direta a partir de segmentos radiculares de caquizeiro cultivar Café em meio de cultura MS ½ NO₃ + 1 µM de zeatina, com diferentes auxinas em diferentes concentrações

Auxinas	Explantos brotados (%) ⁽¹⁾	Número de brotos por explante ⁽¹⁾	Número de folhas por brotação ⁽¹⁾	Altura dos brotos (cm) ⁽¹⁾
ANA	17,2 a ⁽²⁾	1,34 a	5,39 a	1,13 a
AIA	15,6 a	1,05 ab	4,58 a	1,14 a
AIB	1,8 b	0,49 b	1,60 b	0,36 b
Concentrações (µM)				
0	4,7 ^{ns}	0,75 ^{ns}	4,57 ^{ns}	0,78 ^{ns}
0,01	11,4	0,98	3,30	0,86
0,1	12,5	1,10	3,29	0,94
C.V. (%)	20,1	23,5	39,0	20,0

⁽¹⁾ Dados transformados em raiz (x + 1). ⁽²⁾ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%, analisados pelo Teste de Duncan. n.s. Não significativo pelo Teste F da análise de variância.

Na maioria dos casos, não se conhece a natureza biofisiológica dos eventos iniciais da organogênese, podendo em alguns tecidos ocorrer maior atividade de divisão celular, nos quais se formam pró-meristemóides constituídos por pequenas células isodiamétricas, com núcleos proeminentes e citoplasma denso. Esses pró-meristemóides são inicialmente plásticos e podem originar primórdios radiciais ou caulinares (Thorpe, 1994).

Pode-se notar que a maior influência no desenvolvimento de brotações está relacionada com o tipo de auxina utilizada, sendo os melhores resultados obtidos com ANA, que não se diferenciou estatisticamente de AIA, mas foi superior estatisticamente ao AIB, o qual mostrou-se pouco eficiente no desenvolvimento e indução de brotação em segmentos radiculares.

A capacidade de originar brotos a partir de raízes pode estar relacionada com a capacidade de cada cultivar. Choi *et al.* (2001) ressaltam que a formação de brotações adventícias é dependente do fator genético de cada cultivar de caquizeiro, porém diferentes cultivares não foram estudadas no presente trabalho.

Na organogênese direta a partir de segmentos foliares em caqui Café verificou-se um melhor desempenho com o aumento da concentração de zeatina, em quase todos os aspectos avaliados (Tabela 3), mas não foi possível realizar uma análise estatística devido ao alto índice de contaminação e oxidação, o que ocasionou uma redução do número de explantes.

Tabela 3. Resposta da organogênese direta a partir de segmentos foliares de caquizeiro, em meio de cultura MS ½ NO₃ + 0,05 µM

de AIB com diferentes concentrações de zeatina

Zeatina (µM)	Explantos brotados (%)	Número médio de brotos por explante	Número médio de folhas por broto	Comprimento dos brotos (cm)
5	9,4	1,33	2,75	1,03
15	12,5	2,5	7,4	0,99
30	9,4	4	8,75	1,83

Todavia, foi possível constatar que os segmentos foliares apresentam a capacidade de formar brotos adventícios, como já observado por Choi *et al.* (2001), que conseguiram obter regeneração de brotos em meio MS ½ NO₃ suplementado com combinações de zeatina e AIB. Os resultados obtidos no presente trabalho são bastante promissores, pois para outras frutíferas caducifólias a taxa de brotação e regeneração a partir de folhas é praticamente nula, como encontrado por Erig e Schuch (2003) em folhas de pereira tratadas com TDZ e ANA, nos quais não houve regeneração, independente do tempo de permanência em meio de indução.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com Tao *et al.* (1988), que obtiveram regeneração via organogênese do caquizeiro a partir de folhas primordiais de árvores adultas. Apesar da zeatina ser efetiva na regeneração de brotações a partir de folhas, podem ser testadas outras citocininas de menor custo, como verificado por Monteiro *et al.* (2000) com BAP, cujas concentrações 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ já foram suficientes para regenerar gemas de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares.

Conclusão

1. A zeatina na concentração de 12 a 13 µM é mais eficiente para estimular o desenvolvimento dos ápices meristemáticos.
2. Os aminoácidos adenina, glutamina, cisteína e arginina não estimulam o crescimento dos ápices meristemáticos na dose de 45 mg L⁻¹.
3. O ANA é mais eficiente na indução da organogênese direta em segmentos radiculares do que o AIA e o AIB.
4. Segmentos foliares juvenis possuem capacidade organogênica e respondem à aplicação de zeatina.

Referências

- BIASI, L.A. *et al.* Potencial organogenético de tecidos caulinares e radiculares de caquizeiro. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 29-34, 2002.
- CALDAS, L.S. *et al.* Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C. *et al.* (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 87-132.
- CHOI, J.Y. *et al.* Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment cultures of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). *In Vitro Cellular and*

- Developmental Biology Plant*, Columbia, v. 37, n. 2, p. 274-279, 2001.
- COOPER, P.C.; COHEN, D. Micropropagation of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki*). *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, v. 34, p. 118-124, 1984.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Regeneração *in vitro* de brotação de pereira (*Pyrus Communis* L.) cultivar Carrick. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 443-448, 2003.
- FUKUI, H. *et al.* Varietal differences in rooting ability on *In vitro* subcultures Japanese persimmon shoots. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, Tokyo, v. 60, n. 4, p. 821-825, 1992.
- FUKUI, H. *et al.* Shoot tip culture of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* L.). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, Tokyo, v. 58, p. 43-47, 1989.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. London: British Library, 1993. 272p. (Part 1).
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 de jan. 2003.
- IBRAF. Bancos de dados sobre fruticultura. Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 10 de dez. 2002.
- KERBAUY, G.B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C. *et al.* (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 161-181
- MARTINS, F.P.; PEREIRA, F.M. *Cultura do caqui*. Jaboticabal: FUNEP, 1989.
- MONTEIRO, A.C.B. *et al.* Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Sci. Agric.*, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 571-573, 2000.
- PEDROTTI, E. L. *et al.* Effect of autoclaving amino acids on *in vitro* rooting response of wild cherry shoots. *Sci. Hortic.* Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 89-98, 1994.
- PENTEADO, S.R. *Fruticultura de clima temperado em São Paulo*. Campinas: Fundação Cargill, 1986.
- PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotechnologia: Ciência & Desenvolvimento*. Ano IV, n. 25, p. 44-48, 2002.
- RUBBO, M.S. *Estudo do enraizamento de estacas de caqui* (*Diospyros kaki* L.). 1989. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.
- SALOMÃO, L.C.C. *et al.* Micropropagação de caqui (*Diospyros kaki* L.) por meio de gemas laterais e apicais de plantas adultas. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 46, n. 265, p. 267-277, 1999.
- SALOMÃO, L.C.C. *et al.* Micropropagação de caqui 'Cereja' por meio de gemas apicais e laterais de plantas juvenis e adultas. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 66-71, 2000.
- SIMÃO, S. *Tratado de fruticultura*. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- SUGIURA, A. *et al.* *In vitro* propagation of Japanese persimmon. *Hortscience*, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1205-1207, 1986.
- TAMURA, M. *et al.* Highly stable regeneration from long-term cultures of Japanese persimmon callus. *Hortscience*, Alexandria, v. 27, n. 9, p. 1048, 1992.
- TAO, R. *et al.* Plant regeneration from callus cultures derived from promordial leaves of adult Japanese persimmon. *Hortscience*, Alexandria, 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.
- THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.). *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht: Kluwer, 1994. p.17-35.

Received on March 11, 2005.

Accepted on November 14, 2005.