

ORGANOGENESE DO CAQUIZEIRO 'FUYU' A PARTIR DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS

ORGANOGENESIS OF 'FUYU' JAPANESE PERSIMMON FROM SHOOT TIPS

CARVALHO, Dayse C. de¹; BIASI, Luiz A.^{2*}; TELLES, Charles A.³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi contribuir para o estabelecimento de um protocolo para a micropropagação do caqui 'Fuyu' a partir de ápices meristemáticos. A fonte de explantes foram estacas lenhosas coletadas de plantas adultas, durante o período de dormência do caqui. Ápices meristemáticos foram isolados em meio de cultura MS½NO₃ suplementado com zeatina 20 µM, testando-se dois agentes solidificantes: ágar (6 g.L⁻¹) e Phytigel® (2 g.L⁻¹) e diferentes aminoácidos (40 mg.L⁻¹): adenina, asparagina, glutamina, glicina, cisteína, alanina e arginina. Foram também testadas duas citocininas: 2-iP e zeatina, nas concentrações de 0, 1, 5, 10 e 20 µM. 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 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).

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

INTRODUÇÃO

O atual sistema de produção de mudas de caqui, pela 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 a exploração comercial compatível com o atual nível tecnológico exigido pela fruticultura. Além disso, a propagação vegetativa do caqui por 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).

Os trabalhos com cultura de tecidos de caqui são relativamente recentes, a maioria realizados em universidades do Japão e utilizando 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 caqui. A partir de gemas e segmentos nodais de várias cultivares foram obtidas plântulas em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo 1 mg L⁻¹ de zeatina. Subseqüentemente, SUGIURA

et al. (1986) e MURAYAMA et al. (1989), determinaram as condições ótimas para o estabelecimento, proliferação de brotos e enraizamento de sete cultivares de caqui. Eles cultivaram gemas dormentes, coletadas de plantas adultas, no período do inverno, em meio de cultura MS contendo a metade da concentração dos sais com nitrato (MS½NO₃), suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) ou 2-iP (2-isopentenil adenina) em concentrações variando de 2 a 20 mg.L⁻¹, dependendo da cultivar. O enraizamento foi alcançado pelo tratamento da base das brotações em solução aquosa de AIB (ácido indolbutírico), em concentrações de 0 a 1000 mg.L⁻¹, dependendo da cultivar. FUMURO et al. (1988) aplicaram esta técnica para propagar linhagens normais e anãs da cultivar Nishimurawase, observando 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 MS½NO₃ ou WPM ("Woody Plant Medium" – LLOYD & McCOWN, 1986) suplementado com 10 µM de zeatina.

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).

O objetivo deste trabalho foi contribuir para o estabelecimento de um protocolo para a micropropagação do caqui, 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.

¹ Eng^a Agr^a, MSc. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Agronomia. ESALQ/USP. dayse@esalq.usp.br.

² Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Setor de Ciências Agrárias. UFPR. Caixa Postal 19.061. CEP 81531-990. Curitiba-PR. E-mail: biasi@ufpr.br. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

³ Aluno do Curso de Agronomia/UFPR. Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

(Recebido para Publicação em 01/09/2003, Aprovado em 27/08/2004)

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no período de 2001 a 2002.

Fonte de explantes e assepsia.

Estacas lenhosas da cultivar Fuyu foram coletadas de plantas adultas em pomar comercial localizado no município de Porto Amazonas (PR), durante o período de dormência do caqui, tratadas com uma mistura de benomyl (1 g.L⁻¹) e captan (1 g.L⁻¹) 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.

A assepsia foi realizada pela imersão das estacas segmentadas em solução de benomyl (1 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 foram ápices meristemáticos com aproximadamente 2 mm, retirados de gemas apicais, medianas e basais das estacas lenhosas.

Os explantes foram isolados em potes de 250 ml, contendo 30 ml de meio de cultura MS½NO₃ e mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de 25 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

Experimento com agentes solidificantes.

Foram testados os seguintes agentes solidificantes para o meio de cultura: ágar (6 g.L⁻¹) e Phytigel[®] padrão Sigma (2 g.L⁻¹). O meio de cultura foi acrescido de zeatina (Sigma), na concentração de 20 µM, esterilizada a frio por meio de unidade filtrante estéril e descartável Millipore com membrana Durapore GV de 0,22 µm de poro.

Experimento com aminoácidos.

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

Os aminoácidos foram autoclavados juntamente com o meio de cultura. O meio de cultura foi solidificado com ágar (6

g.L⁻¹) e acrescido de 20 µM de zeatina (Sigma), esterilizada a frio por meio de unidade filtrante estéril e descartável Millipore com membrana Durapore GV de 0,22 µm de poro.

Tipos e concentrações de citocininas.

Foram testadas as citocininas padrão Sigma zeatina e 2-iP nas concentrações 0, 1, 5, 10 e 20 µM para a indução do desenvolvimento dos explantes. O meio de cultura foi solidificado com ágar (6 g.L⁻¹).

Delineamento experimental e avaliação.

O delineamento experimental em todos os experimentos foi em blocos ao acaso, cujo bloco correspondeu ao dia de isolamento dos ápices meristemáticos, pois devido ao processo de isolamento ser demorado, não foi possível instalar os experimentos no mesmo dia. O experimento com agentes solidificantes possuía cinco repetições e 20 explantes por parcela, o experimento com aminoácidos possuía cinco repetições e dez explantes por parcela e os experimentos com citocininas possuíam quatro repetições e dez explantes por parcela. A avaliação foi realizada após 60 dias da instalação do experimento.

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa estatístico MSTAT, realizando-se a análise de variância e, quando necessário, o teste adicional de Tukey a 5% de probabilidade.

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 por ter sido grande não permitiu a análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento com agentes solidificantes.

Os resultados obtidos no meio solidificado com ágar, quanto ao número de explantes brotados, número de brotos por explante e comprimento do broto foram significativamente superiores aos encontrados para explantes cultivados em meio com Phytigel[®], embora tenha-se observado nesse meio uma taxa mais elevada (40%) de explantes oxidados (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito dos agentes solidificantes do meio de cultura no desenvolvimento de ápices meristemáticos do caqui 'Fuyu'. UFPR, Curitiba, 2002.

Agente solidificante	Explantes oxidados (%) ¹	Explantes 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.

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

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 solidificante Phytigel[®] do que no ágar em culturas de várias espécies lenhosas, como o Eucalipto, por exemplo. Os ápices meristemáticos de caqui cultivados em meio solidificado com Phytigel[®] demonstraram resposta similar ao descrito pela literatura, ocorrendo menor percentagem de oxidação quando comparada com explantes isolados em meio

solidificado com ágar, apesar da diferença não ser significativa.

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⁻¹) e Phytigel[®] (2,5 g.L⁻¹)

para o meio de cultivo do caqui, relataram que a regeneração de brotos a partir de segmentos foliares foi pouco 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⁻¹ de ágar (4,0 brotos por explante) do que no tratamento com Phytigel® (2,8 brotos por explante), similarmente a este trabalho. 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.

Experimento com aminoácidos.

O cultivo inicial dos ápices meristemáticos em meio suplementado com diferentes aminoácidos não apresentou diferença significativa para a variável porcentagem de

explantes com brotação e número de brotos por explante (Tabela 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 adenina, cisteína e arginina, percebe-se tendência de que a adenina seja mais eficiente no alongamento destes.

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).

Tabela 2 – Efeito de diferentes aminoácidos no desenvolvimento de ápices meristemáticos do caqui 'Fuyu'. UFPR, Curitiba, 2002.

Aminoácido	Explantes com brotação (%) ¹	Número de brotos / explante	Número de folhas / broto	Comprimento médio do broto (cm) ²
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%.

¹ Dados transformados em raiz de x.

² Dados transformados em log (x+1)

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 nitrogênio 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 caqui, os resultados ficaram muito aquém do esperado, havendo necessidade de novos experimentos com diferentes concentrações dos aminoácidos mais eficientes.

Tipos e concentrações de citocininas.

2 - Isopenteniladenina

A suplementação do meio de cultura com 2-iP não promoveu o desenvolvimento dos ápices meristemáticos e nem evitou a oxidação, 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 µM de 2-iP, no entanto, nesta concentração do fitoregulador 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. Resultado semelhante foi relatado por MURAYAMA et al. (1989) no cultivo da variedade Kurogaki em meio suplementado com 2-iP (5 e 10 µM), 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 µM), respectivamente. Em meio de cultura suplementado com 25 µM 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 µM reduziram a oxidação porém, houve a indução da formação de calos nesta concentração.

Zeatina

A suplementação do meio de cultivo com 20 µM de zeatina reduziu significativamente os níveis de oxidação para 15% (Tabela 3). 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.

A zeatina é eficiente para a micropropagação do caqui porque várias cultivares foram melhor estabelecidas e proliferadas com esse fitoregulador 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* (FUKUI et al., 1989).

Tabela 3 – Efeito de diferentes concentrações de zeatina na indução do crescimento de ápices meristemáticos do caqui 'Fuyu'. UFPR, Curitiba, 2002.

Zeatina (μM)	Explantos oxidados (%)	Explantos com folhas expandidas (%)	Explantos com calo (%)	Calos com gemas (%)	Número médio de gemas maiores que 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 formação de calos foi também pronunciada em concentrações elevadas de zeatina como 10 e 20 μM (Tabela 3). FUKUI et al. (1989) citaram em seu trabalho com cultivo de ápices meristemáticos de caqui a formação de 60% 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 μM de zeatina.

A formação de gemas adventícias a partir dos explantes iniciais ocorreu mais acentuadamente na concentração de 20 μM de zeatina (Tabela 3). COOPER & COHEN (1984) relataram que em concentrações de 0,01 a 10 mg.L^{-1} os explantes morreram e quando o meio foi suplementado com 1mg.L^{-1} de zeatina, todos os explantes alongaram, mas não desenvolveram gemas axilares, similarmente a este trabalho.

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 3).

Zeatina mostrou exercer um papel importante no cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos de caqui, 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 encontrar novos compostos com efeito similar na regeneração de brotos de caqui.

CONCLUSÕES

O estabelecimento *in vitro* do caqui 'Fuyu' pode ser obtido pelo cultivo de ápices meristemáticos em meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ suplementado com 20 μM 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.

ABSTRACT

The aim of this work was to establish a protocol for "Fuyu" persimmon micropropagation from shoot tips. Explants sources were persimmon woody shoots obtained from adult plants during the dormancy period. Shoot tips were isolated in culture media $\text{MS}\frac{1}{2}\text{NO}_3$ supplemented with zeatin (20 μM). Two gelling agents were used: agar (6 g.L^{-1}) and Phytigel® (2 g.L^{-1}) and several amino acids all at 40 mg.L^{-1} : adenine, asparagine, glutamine, glycine, cysteine, alanine and arginine. Two cytokinins were also tested: 2-iP and zeatin, with

concentrations of 0, 1, 5, 10 and 20 μM . Adenine, cysteine and arginine were the most efficient amino acids for shoot tip development, leaves number and buds elongation. Agar was the best gelling agent, resulting in more number of buds regenerated (4.97 buds per explant) which was also longer (1.47cm). Zeatin at 20 μM induced the highest rates of callus with buds (55%) and the highest number of buds greater than 5 mm (40 buds per callus).

Key words: *Diospyros kaki*, tissue culture, growth regulators, fruit production.

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. et al. Estabelecimento *in vitro* do caqui 'Fuyu' por meio de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n. 3. p. 279-283, 1999.
- 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. 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**, 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.
- FUKUI, H.; KANO, T.; TAKEUCHI, S. et al. *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. Et al. 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. et al. Studies on rearing of dwarfing rootstocks for Japanese Persimmon. **Bulletin of Shiga Agricultural Experimental Station**, v. 29, p. 20-30, 1988.
- 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.
- LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. (Eds). **Plant biochemistry and molecular biology**. New York: Wiley & Sons, 1993. p. 155-180.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator Society**, v. 30, p. 421-427, 1986.
- MILLER, R.M.; KAUL, V.; HUTCHINSON, J.F. et al. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* 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. et al. *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. et al. The role of adenine in bud differentiation. **Phytomorfology**, v. 17, p. 446-453, 1967.
- RUBBO, M. S. **Estudo do enraizamento de estacas de caquizeiro (*Diospyros kaki* L.)**. Piracicaba, 1989. 90p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP.
- 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.
- SUGIURA, A.; TAO, R.; MURAYAMA, H. et al. In vitro propagation of Japanese persimmon. **HortScience**, v. 21, n. 5, p. 1205-1207, 1986.
- 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.