

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 06/09/2017.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOLERÂNCIA A *Phytophthora cinnamomi* DE PORTA-  
ENXERTOS DE ABACATEIRO E PROPAGAÇÃO *in vitro***

**Edwin Antonio Gutierrez Rodriguez**

Engenheiro Agrônomo

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOLERÂNCIA A *Phytophthora cinnamomi* DE PORTA-  
ENXERTOS DE ABACATEIRO E PROPAGAÇÃO *in vitro***

**Edwin Antonio Gutiérrez Rodríguez**

**Orientadora: Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade**

**Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

**2016**

R696t Rodriguez, Edwin Antonio Gutierrez  
Tolerância a *Phytophthora cinnamomi* de porta-enxertos de abacateiro e propagação *in vitro* / Edwin Antonio Gutierrez Rodriguez.  
-- Jaboticabal, 2016  
xxii, 141 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Renata Aparecida de Andrade

Co-Orientador: Rita de Cassia Panizzi

Banca examinadora: Priscila Lupino Gratão, Eduardo Custódio Gasparino, Tatiana Eugenia Cantuarias Avilés, Simone Rodrigues da Silva

Bibliografia

1. *Persea americana*-mudas. 2. *Phytophthora cinnamomi*. 3. Fitotecnia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 634:653

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: TOLERÂNCIA A *Phytophthora cinnamomi* DE PORTA-ENXERTOS DE ABACATEIRO E PROPAGAÇÃO *in vitro*


**AUTOR: EDWIN ANTONIO GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ**  
**ORIENTADORA: RENATA APARECIDA DE ANDRADE**  
**COORIENTADORA: RITA DE CÁSSIA PANIZZI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. RENATA APARECIDA DE ANDRADE  
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Profa. Dra. TATIANA EUGENIA CANTUARIAS AVILÉS  
Departamento de Fitotecnia/Frucultura / ESALQ - USP - Piracicaba/SP

  
Profa. Dra. SIMONÉ RODRIGUES DA SILVA  
Departamento de Produção Vegetal / ESALQ - USP - Piracicaba/SP

Jaboticabal, 06 de setembro de 2016.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**EDWIN ANTONIO GUTIERREZ RODRIGUEZ** – nascido em 20 de abril de 1986, na cidade de Villavicencio, Meta (Colômbia), filho de Carlos Alfredo Gutierrez Rojas e Alcira Rodriguez Diaz. Engenheiro agrônomo em 2008 pela *Universidad de los Llanos* (UNILLANOS) na *Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales* em Villavicencio (Colômbia). É bolsista desde 2011 do programa do *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación* (COLCIENCIAS) no programa do governo colombiano para formação de doutores no exterior. Em fevereiro de 2013 recebeu título de Mestre em Fitotecnia: área de concentração Horticultura pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Desde março de 2013 é aluno de doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na FCAV/UNESP. Durante o doutorado realizou estágio acadêmico na área de ecofisiologia de frutíferas no *Tropical Research and Educational Center* da *University of Florida* sob supervisão do Dr. Bruce Schaffer.

*A Deus que através da perfeição que só Ele tem, me deu a família, os amigos, o amor e a vida.*

## AGRADECIMENTOS

Neste caminho de cinco anos que está chegando ao fim, fica o rasto do caminho, mas um rasto inapagável, em que também quis ajudar na caminhada de algumas pessoas que caminharam junto, mas também com certeza recebi o apoio para continuar.

Foi uma época das mais egoístas da minha vida. Conheci pessoas inesquecíveis que não vou ter como pôr na mala, situações de confronto até quebrantar o meu orgulho, verdades certas que com um sopro se perderam, mas também de construção de novos caminhos. Foi um filtro sem dúvida alguma.

Com a limitação que tem a nossa linguagem e que impõem as palavras gostaria de agradecer:

À minha Família, especialmente meus pais, irmãos, e sobrinhos, pelo apoio neste tempo fora do país e quem sempre me apoiou. Ao meu amor, Fleurzinha, você sabe quão importante é na minha vida.

À Dra. Renata Aparecida de Andrade, pelos ensinamentos e oportunidade. Por ter me recebido para fazer parte desta grande família UNESPIANA. Com certeza foi um grande aprendizado pessoal e profissional.

Ao pessoal do departamento de Produção vegetal, especialmente aos professores Antônio, Arthur, Pedro, com o mesmo sentimento, ao pessoal administrativo, Senhora Rosane, Wagner, Sydneia e do ripado de fruticultura, especialmente ao senhor Bedim, que são tão importantes no crescimento e consolidação da nossa formação.

Ao pessoal da Fitopatologia, da Rosangela e aos professores que de forma distinta apoiaram não só o desenvolvimento deste trabalho como também do meu crescimento. Especialmente à professora Dra. Rita, seu apoio foi imensurável.

Ao pessoal do departamento de Tecnologia, particularmente ao Dr. Tiago Santana Balbuena pelo apoio pessoal no processo de formação e às alunas sob sua orientação pelo ser humano que elas são.

Ao pessoal do departamento de Biologia, Roseli, Sonia e o professor Eduardo no apoio para o enriquecimento do trabalho, mas acima de tudo pela confiança e colocar a humanidade acima do interesse científico.



Ao pessoal da APTA, especialmente ao Dr. Eduardo Feichtenberger e a Junia Nais, pelo treinamento, pela concessão dos isolados de *P. cinnamomi* e acima de tudo pelos conselhos e ensinamentos.

Aos grandes amigos e amizades, sem nomes, pois cada um sabe a medida da minha gratidão, que me fizeram entender o quanto temos para aprender um com o outro, e que o mundo não é tão grande como nós imaginamos.

Durante o sanduiche no *Tropical Research and Educational Center* (TREC), gostaria de deixar na memória, essa curta, mas inesquecível passagem pelo instituto que sem dúvidas foi muito além do proposto. No âmbito acadêmico, ao Dr. Bruce Schaffer pela oportunidade de viver a experiência junto ao seu grupo de pesquisa e interagir com as demais pessoas do TREC. Aos professores Dr. Jonathan Crane pela oportunidade de participar do excelente curso em Fruticultura Tropical, e ao professor Dr. Wagner Vendrame por ter sido a ponte e apoio no processo de busca do estágio. Ao staff do TREC, especialmente a Maria, Ana, Pam, Wanda, Tina, Patrícia, aos estudantes, especialmente Raiza, Octavio, Stephanie, Razzak, Gina, e a cada uma das pessoas que fizeram tão enriquecedor esse período do TREC.

Finalmente, se eu tivesse que resumir em uma palavra estes cinco anos da minha vida, esta seria “oportunidade”. Tenho a certeza que no significado desta palavra encontra-se o “segredo” para as mudanças que o nosso mundo demanda. Acredito que foi pela oportunidade que Deus através das pessoas, me deu durante este tempo, que hoje estou finalizando com imensa gratidão esta fase da minha vida.

MUITO OBRIGADO!!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xix
<b>LISTA DE APÊNDICES</b> .....	xxii
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais</b> .....	<b>1</b>
1.1 Introdução .....	1
1.2 Revisão de Literatura .....	3
1.2.1 Propagação de abacateiro no contexto da abacaticultura comercial .....	3
1.2.2 <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands .....	6
1.2.3 Porta-enxertos 'Duke 7' e 'Toro canyon' .....	9
1.2.4 Ferramentas biotecnológicas na superação das limitações para produção de abacate .....	11
1.2.5 Ferramentas biotecnológicas na superação das limitações para produção de abacate .....	10
1.3 Referências .....	12
<b>CAPÍTULO 2 – Índice de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II em plântulas de <i>Persea americana</i> Miller: padronização de parâmetros para medição</b> .....	<b>21</b>
Resumo .....	21
Abstract .....	22
2.1 Introdução .....	23
2.2 Material e Métodos .....	25
2.3 Resultados e Discussão .....	28
2.3.1 Lado e posição da folha no perfil de plântulas de 'Duke 7' e 'Toro canyon' para determinação do Índice de clorofila .....	28
2.3.2 Parâmetro de tempo de aclimação no escuro, intensidade e tempo de exposição de luz na determinação da eficiência quântica do fotossistema II de plântulas de 'Duke 7' e 'Toro canyon' .....	30
2.4 Conclusões .....	37
2.5 Referências .....	38

<b>CAPÍTULO 3 – Resposta de dois porta-enxertos de <i>Persea americana</i>, obtidos por sementes, na presença de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands</b> .....	<b>43</b>
Resumo.....	43
Abstract.....	44
3.1 Introdução .....	45
3.2 Material e Métodos .....	47
3.2.1 Definição prévia do isolado .....	47
3.2.2 Tolerância de mudas de abacateiro obtidas por sementes dos clones ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ a <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	48
3.2.2.1 Obtenção de mudas de abacateiro ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ .....	48
3.2.3 Avaliação fisiológica das mudas durante o desenvolvimento da doença. ....	52
3.2.3.1 Análise estatística .....	53
3.2.4 Avaliação biométrica das mudas durante o desenvolvimento da doença ....	53
3.2.4.1 Análise estatística .....	54
3.2.4.2 Análise de correlação .....	54
3.2.5 Caracterização histológica por microscopia ótica do caule de plantas de abacateiro, na região de inoculação com <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	55
3.2.5.1 Análise estatística .....	56
3.2.6 Caracterização histológica por microscopia de varredura.....	57
3.3 Resultados e Discussão.....	57
3.3.1 Definição prévia do isolado .....	57
3.3.2 Tolerância de mudas de abacateiro obtidas por sementes dos clones ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ a <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	58
3.3.3 Alterações fisiológicas das mudas durante o processo da doença .....	59
3.3.4 Alterações biométricas das mudas de abacateiro durante o desenvolvimento da doença .....	65
3.3.5 Análise de correlação entre as variáveis biométricas e o índice de clorofila .....	69
3.3.6 Alterações histológicas do caule na região de inoculação por microscopia ótica .....	73
3.3.7 Alterações histológicas na região de inoculação por microscopia de varredura .....	77

3.4 Conclusões .....	80
3.5 Referências.....	80
<b>CAPÍTULO 4 – Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Persea americana</i> de materiais usados como porta-enxerto .....</b>	<b>90</b>
Resumo.....	90
Abstract.....	91
4.1 Introdução .....	92
4.2 Material e Métodos .....	94
4.2.1 Preparo do meio de cultivo e condições da sala de crescimento.....	94
4.2.2 Teste 1 – Tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio na desinfestação de miniestacas.....	95
4.2.3 Teste 2 – Comparação de hipoclorito de sódio e ácido tricloro isocianurico na desinfestação de gemas apicais .....	96
4.2.4 Teste 3 – Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes estiolados de material adulto proveniente de mudas por enxertia.....	98
4.3 Resultados e Discussão.....	100
4.3.1 Teste 1 – Tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio na desinfestação de miniestacas.....	100
4.3.2 Teste 2 – Desinfestação de gemas apicais comparando hipoclorito de sódio e ácido tricloro isocianúrico.....	101
4.3.3 Teste 3 – Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes estiolados de material adulto proveniente de mudas por enxertia.....	107
4.4 Conclusões .....	108
4.5 Referências.....	109
<b>CAPÍTULO 5 – Armazenamento de embriões no desenvolvimento <i>in vitro</i> de eixos embrionários de <i>Persea americana</i> Mill .....</b>	<b>116</b>
Resumo.....	116
Abstract.....	117
5.1 Introdução .....	118
5.2 Material e Métodos .....	119
5.2.1 Variabilidade morfológica em embriões de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ .....	119

5.2.2 Testes de armazenamento de embriões e posterior viabilidade para desenvolvimento <i>in vitro</i> dos eixos embrionários.....	120
5.2.3 Armazenamento do embrião e meio de cultivo no desenvolvimento <i>in vitro</i> de eixos embrionários.....	122
5.2.4 Viabilidade de eixos embrionários de embriões de abacateiro ‘Duke 7’ armazenados por seis meses .....	123
5.3 Resultados e Discussão.....	124
5.3.1 Variabilidade morfológica em embriões de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ .....	124
5.3.2 Armazenamento do embrião por dois meses e meio de cultivo no desenvolvimento <i>in vitro</i> de eixos embrionários.....	126
5.3.3 Viabilidade de eixos embrionários de embriões de abacateiro ‘Duke 7’ armazenados por seis meses .....	129
5.3.4 Alterações biométricas das mudas durante o desenvolvimento da doença.....	118
5.3.5 Análise de correlação entre as variáveis biométricas e o índice de clorofila .....	122
5.3.6 Alterações histológicas do caule na região de inoculação por microscopia ótica .....	126
5.4 Conclusões .....	130
5.5 Referências.....	130
<b>APÊNDICES</b> .....	136
Apêndice 1 .....	137
Apêndice 2.....	138
Apêndice 3.....	139
Apêndice 4.....	140
Apêndice 5.....	141

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Categoria de pesquisa realizada envolvendo a cultura do abacateiro entre 1991-2014 (a) e 2014 (b). Fonte: Adaptado de: Searchcrossref.org .....	2
<b>Figura 2.</b> Distribuição atual de <i>Phytophthora cinnamomi</i> no mundo. Fonte: EPPO, 2015 .....	7
<b>Figura 3.</b> Ciclo biológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i> entre o substrato e o tecido radicular, detalhando a participação da raiz, na atração inicial dos zoósporos (A) participação da matriz da mucilagem na defesa da planta (B) e liberação de metabolitos que participam no controle do patógeno (C) e fases subsequentes entre as raízes e rizosfera das plantas. Fonte: Adaptado de Baetz e Martinola & Dieback working group.....	8
<b>Figura 4.</b> Fruto (a) semente (b) e planta adulta (c) dos materiais de abacateiro 'Toro canyon' (superior) e 'Duke 7' (inferior) .....	10
<b>Figura 5.</b> Diagrama para determinação dos parâmetros de avaliação do índice de clorofila em mudas de abacateiro, desde a folha dois até a folha catorze no sentido basípeto.....	26
<b>Figura 6.</b> Diagrama para determinação dos parâmetros tanto da pré-aclimatação no escuro quanto da duração e intensidade da iluminação da área foliar para medição da fluorescência da clorofila em folhas de abacateiro .....	27
<b>Figura 7.</b> Análise de regressão do índice de clorofila a, b e total no perfil das plântulas de abacateiro. 'Duke 7' para determinação dos parâmetros de avaliação .....	28
<b>Figura 8.</b> Espectro de cor das folhas em mudas de abacateiro var. 'Toro canyon' (esquerda) e 'Duke 7'(direita) digitalizadas com Image Scanner III™ e analisadas com Image Master software 2D Platinum ver. 7.0™ (Do menor para o maior, o número indica a posição da folha no sentido basipeto). .....	29

- Figura 9.** Análise de regressão da interação entre intensidade luminosa e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7' ..... 32
- Figura 10.** Análise de regressão da interação entre tempo de iluminação e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7' ..... 33
- Figura 11.** Análise de regressão da interação entre intensidade luminosa e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon' ..... 34
- Figura 12.** Análise de regressão da interação entre tempo de iluminação e a intensidade da fonte de luz na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon' ..... 35
- Figura 13.** Análise de regressão da interação entre exposição luminosa e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon' ..... 36
- Figura 14.** Sistema Digital de Análise de Imagem-Delta T Devices usado para quantificação da área a partir do desenho da lesão no caule causada por *Phytophthora cinnamomi* em mudas de abacateiro ..... 48
- Figura 15.** Temperatura máxima e mínima na casa de vegetação durante o tempo de condução do experimento de resposta de mudas por semente de abacateiro à inoculação com *Phytophthora cinnamomi* ..... 49
- Figura 16.** Metodologia de inoculação e avaliação do desenvolvimento da lesão causada por *P. cinnamomi* no caule de mudas de abacateiro. 1. Muda obtida de semente; 2. Tratamento sem ou com ferimento; 3. Meio Cenoura-Agar com *P. cinnamomi*; 4. Porção de meio colocada na base do caule; 5. Área da lesão após 15 dias ..... 50

**Figura 17.** Sequência geral para inoculação no caule de mudas de abacateiro: a. porção de Meio usado como inoculo; b. Porção de meio na base do caule; c, d. Cobertura com porção de algodão; e, f. Fita para manter a aderência e evitar contaminação..... 50

**Figura 18.** Método de isca com pétalas de rosa usado para detecção de *Phytophthora cinnamomi* em substrato; a: Iscas de pétalas na solução água + substrato; b: Esporângios formados na borda da porção de pétala usada como isca após quatro dias..... 51

**Figura 19.** Quantificação da eficiência quântica do FS II em mudas de abacateiro; na sétima folha completamente expandida, prévia aclimatação no escuro, utilizado fluorômetro. .... 52

**Figura 20.** Metodologia usada para medição do volume de raiz em mudas de abacateiro após inoculação com *Phytophthora cinnamomi*. Volume inicial de água mais sistema radicular (A) e volume final de água (B) ..... 54

**Figura 21.** Diagrama das regiões do caule de abacateiro tratado (esquerdo) e intacto (direito) para medir as alterações causadas pelo *Phytophthora cinnamomi*: espessura da epiderme (1), floema (2), xilema (3), e diâmetro médio dos vasos do xilema secundário (4) ..... 55

**Figura 22.** Regressão da análise de variância do índice de clorofila A (chl A), B (chl B), Total (chl Total) em mudas de abacateiro 'Toro canyon' (a) e 'Duke 7' (b) e a relação a/b (c) durante 97 dias a partir da inoculação com *Phytophthora cinnamomi* ..... 62

**Figura 23.** Regressão da análise de variância em função do tempo da interação entre o material: Toro canyon (direita) e D7 (esquerda) e o tratamento de inoculação com *P. cinnamomi* em mudas de abacateiro, no crescimento em altura (superior) e diâmetro do caule (inferior)..... 66



- Figura 24.** Sistema radicular de mudas de abacateiro após seis meses de inoculação no substrato com *Phytophthora cinnamomi*, a. Raiz de mudas de D7; b. Raiz de mudas de TC; (escala= 15 cm) ..... 69
- Figura 25.** Região de xilema em caule de abacateiro com presença de micélio de *Phytophthora cinnamomi* com aumento de 40x (a), 100x (b) e 400x (c). A seta vermelha indica a região de localização do micélio, assim como tecido intacto (d, f) e tecido inoculado (e, g) ..... 75
- Figura 26.** Região de inoculação com *Phytophthora cinnamomi* em caule de mudas de abacateiro após 45 dias. Secção transversal de Toro canyon (a) e Duke 7 (b); vista externa na epiderme (c) e corte longitudinal (d) da lesão ..... 76
- Figura 27.** Eletromicrografia de varredura da secção transversal do caule de mudas de abacateiro 'Toro canyon' (esquerda) e 'Duke 7' (direita) ..... 78
- Figura 28.** Eletromicrografia de varredura na região da base do caule de mudas de abacateiro 'Toro canyon' (Esquerda) e 'Duke 7' (direita) sob incidência de *P. cinnamomi* 15 dias após a inoculação, observando-se abundante micélio (seta vermelha) (a, b) e presença de grãos de polissacarídeos (seta amarela) nos vasos do xilema (c), vista general da região dos sintomas (d) ..... 79
- Figura 29.** Obtenção de mini estacas de abacateiro 'Duke 7' de plantas adultas para estabelecimento in vitro. a) Seleção de ramos da planta matriz; b) Pré-lavagem; c) Retirada das folhas; d) Explantes em meio de cultivo SHm. .... 95
- Figura 30.** Explantes juvenis de abacateiro 'Duke 7' para o estabelecimento in vitro de gemas apicais obtidas de plantas adultas, a. brotação para obtenção da gema, b. gema para estabelecimento in vitro, c. Gema excisada e disposta no meio de cultivo SHm. .... 97
- Figura 31.** Sequência para obtenção de explantes estiolados de abacateiro para estabelecimento in vitro a partir de plantas enxertadas. A) Enxertia em fenda cheia; b) Desenvolvimento das gemas do enxerto; c) Multibrotação induzida pela quebra da dominância apical; d) Brotações incubadas no escuro; e) Comparação de brotações

normais (esquerda) e estioladas (direita); e f) Miniestaca axênica em meio de cultivo ..... 99

**Figura 32.** Sintomas de necrose em enxertos de abacateiro ‘Toro canyon’ em condições de casa de vegetação associados com estresse por alta temperatura; a. Necrose apical; b. Queima inicial das folhas; c. Sintoma das folhas após abscisão ..... 107

**Figura 33.** Percentual de contaminação por microrganismos formadores de micélio (MFM) e formadores de colônias (MFC) obtidos de brotações estioladas, quando tratados com hipoclorito de sódio (1% m/m) por 10 e 20 minutos, para o estabelecimento in vitro de explantes de abacateiro..... 108

**Figura 34.** Desenho de embrião e eixo embrionário de abacateiro para extração e estabelecimento in vitro. a: Partes do embrião com a região de união cotiledonar, b. Eixo embrionário separado usado para estabelecimento in vitro. 2016. Adaptado de Lady of Hats- avocado seed..... 120

**Figura 35.** Preparo de sementes de abacateiro para armazenamento e estabelecimento in vitro de eixos embrionários. a: Imersão em NaOCl (1,5% i.a); b. Sementes após desinfestação; c. Separação para extração do eixo embrionário; d. Eixo embrionário; e. Desenvolvimento inicial em meio de cultivo ..... 121

**Figura 36.** Procedimento geral do preparo das sementes de abacateiro. ‘Duke 7’ para armazenamento (10°C) por 60 dias em saco plástico..... 122

**Figura 37.** Desenvolvimento in vitro de eixos embrionários de abacateiro ‘Toro canyon’ em meio de cultivo semissólido. a) separação para extração do eixo embrionário; b) desenvolvimento apical; c) fase de roseta; d) enraizamento e desenvolvimento apical ..... 123

**Figura 38.** Sequência geral do preparo para armazenamento de embriões de abacateiro em BOD (10 °C) por seis meses ..... 123

**Figura 39.** Aspecto do embrião e variação morfológica do eixo embrionário de abacateiro ‘Duke 7’ (a, b, c) e ‘Toro canyon’ (d, e, f), (barra = 1cm) ..... 125

**Figura 40.** Sobrevivência e enraizamento de eixos embrionários de abacateiro sem armazenamento sob condições in vitro nos meios de cultivo MS, MS (30%) e SHm. a, b: 'Duke 7'; c: 'Toro canyon'. \*Letras nas barras mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ( $p \leq 0,05$ ) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F ..... 126

**Figura 41.** Comparação dos principais sais (a, b) e elementos químicos constituintes (c) entre o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o SHm (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972)..... 128

**Figura 42.** Regressão da análise de variância do desenvolvimento da parte aérea e radicular de eixos embrionários de abacateiro 'Duke 7' ..... 129

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Análise de variância dos efeitos principais e as interações entre intensidade luminosa, tempo de pré-aclimatação no escuro e tempo de exposição à luz, na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7'.....	31
<b>Tabela 2.</b> Análise de variância dos efeitos principais e as interações entre intensidade luminosa, tempo de pré-aclimatação no escuro e tempo de exposição à luz, na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon' .....	34
<b>Tabela 3.</b> Identidade dos isolados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> da Micoteca "Dra. Victoria Rosseti", Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, usados para teste de patogenicidade .....	47
<b>Tabela 4.</b> Resumo da análise de variância da interação em mudas de abacateiro 'Toro canyon' e 'Duke 7' com e sem ferimento mecânico, sobre a área da lesão no caule após 15 dias causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	58
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância e de regressão do índice de clorofila A, B e Total em mudas por semente de abacateiro 'Toro canyon' (TC) e 'Duke 7' (D7) inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> pelos métodos: Inoculação sem ferimento, Inoculação com ferimento e presença no substrato .....	60
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância do índice de clorofila A, B e Total após 97 dias de inoculação com <i>Phytophthora cinnamomi</i> em mudas de Toro canyon e Duke 7 ....	63
<b>Tabela 7.</b> Resumo da análise de variância da eficiência quântica do FS II - Fv/Fm em mudas de abacateiro quando inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> , no momento da inoculação (0d) e após sete (7 d) e sessenta dias (60 d).....	64

- Tabela 8.** Resumo da análise de variância da altura e diâmetro de mudas de abacateiro ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ durante 97 dias após inoculação (DAI) com *Phytophthora cinnamomi* no caule com fermento (CF), sem fermento (SF) ou no substrato (Subs.) ..... 65
- Tabela 9.** Resumo da análise de variância da taxa de crescimento relativo, em altura e diâmetro, de mudas de abacateiro inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*..... 67
- Tabela 10.** Avaliação de mudas de abacateiro, ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ após seis meses de inoculação com *Phytophthora cinnamomi* ..... 68
- Tabela 11.** Análise de correlação de Pearson entre as variáveis biométricas avaliadas na incidência da doença causada por *Phytophthora cinnamomi* na progênie de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ ..... 71
- Tabela 12.** Análise de variância entre o material de abacateiro e a inoculação no caule com *Phytophthora cinnamomi* sobre as alterações na região da epiderme, floema e xilema ..... 74
- Tabela 13.** Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação quando utilizado ácido tricloro isocianúrico na contaminação com microrganismos formadores de micélio (MFM) ou colônia (MFC) para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro..... 102
- Tabela 14.** Desdobramento da interação entre o tempo de imersão (A) e a concentração do ácido tricloro isoianúrico - ATI (B) sobre o percentual de explantes contaminados por microrganismos formadores de micélio para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro..... 102
- Tabela 15.** Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação, no percentual de explantes contaminados com microrganismos formadores de micélio (MFM) ou colônia (MFC) quando utilizado hipoclorito de sódio na desinfestação para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro..... 103

**Tabela 16.** Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação dos produtos químico (A), tempo de tratamento (B) e concentração do produto (C) na desinfestação de explantes para estabelecimento *in vitro* de Abacateiro ..... 104

**Tabela 17.** Desdobramento da interação entre o produto utilizado no tratamento (A) e o tempo de imersão (B) sobre o percentual de explantes de abacateiro axênicos para estabelecimento *in vitro*..... 105

**Tabela 18.** Desdobramento da interação entre os produtos, ácido tricloro isocianurico (ATI) e Hipoclorito de sódio (NaOCl) (A) e a concentração (C) sobre o percentual de explantes de abacateiro axênicos para estabelecimento *in vitro*..... 105

**Tabela 19.** Biometria de eixos embrionários dos materiais 'Duke 7' e 'Toro canyon' de abacateiro..... 124

**Tabela 20.** Porcentagem média de sobrevivência, enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários sem armazenamento de abacateiro 'Duke 7' e 'Toro canyon' em meio de cultivo após 60 dias de incubação..... 126

## LISTA DE APÊNDICES

	<b>Página</b>
<b>Apêndice 1</b> – Condições de temperatura e umidade da sala de crescimento para o desenvolvimento dos explantes obtidos por enxertia usados para micropropagação.....	137
<b>Apêndice 2</b> – Irradiância na casa de vegetação para o desenvolvimento das mudas de abacateiro sob tratamento com <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A Área para mudas de Toro canyon; b. Área para mudas de Duke 7 (os quadrados vermelhos indicam a localização das plantas).....	138
<b>Apêndice 3</b> – Preparo das lâminas para microscopia ótica do caule de mudas de abacateiro na região de inoculação com <i>Phytophthora cinnamomi</i> : Serie gradual de álcool utilizada na desidratação; Coloração utilizada no preparo para análise das laminas histológicas .....	139
<b>Apêndice 4</b> – Análise química da água usada durante o desenvolvimento do experimento para irrigação das mudas de abacateiro inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	140
<b>Apêndice 5</b> – Composição do meio de cultivo <i>Cenoura-Agar</i> e <i>Lima Bean Agar</i> para crescimento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	141

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1.1 Introdução

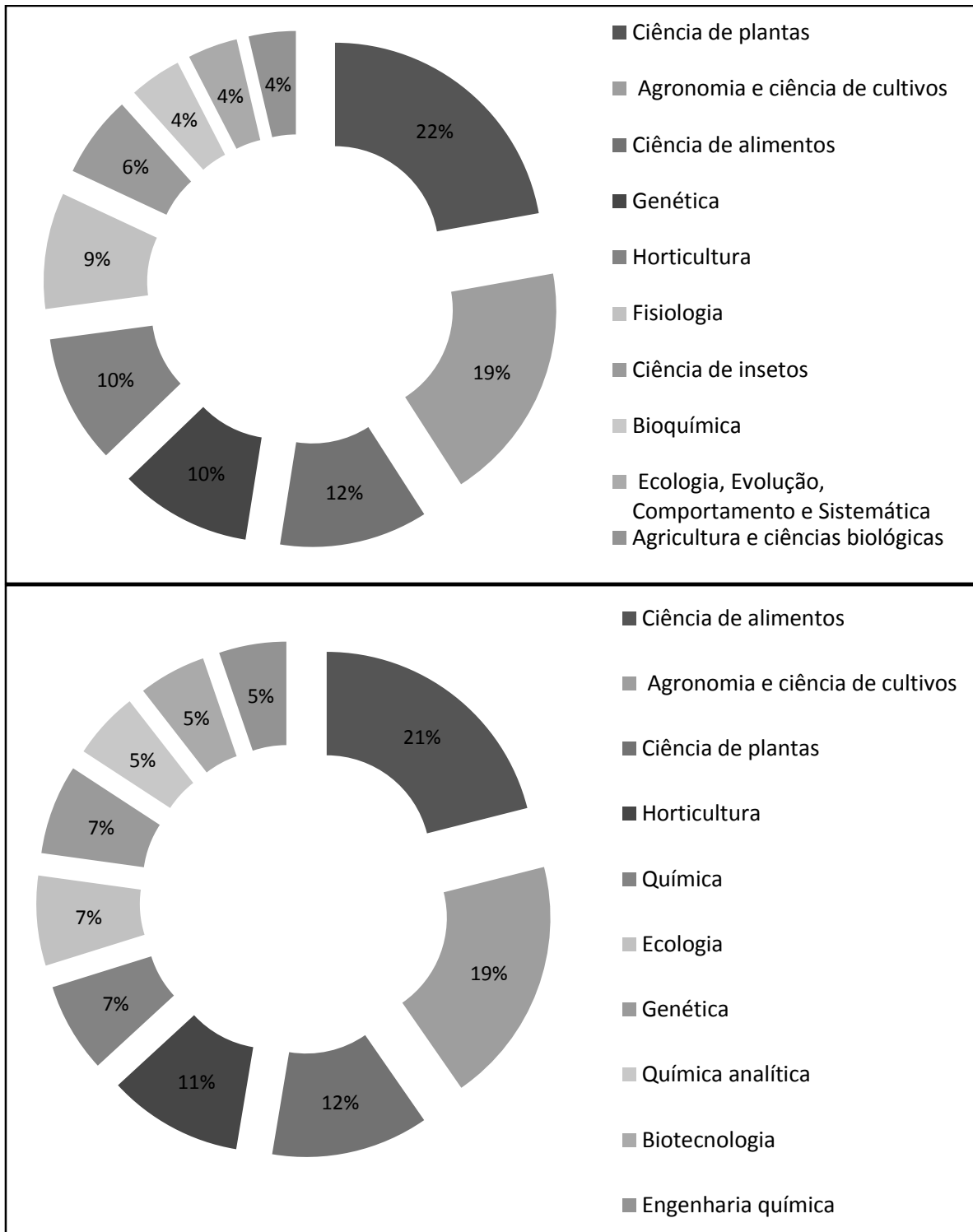
O abacateiro (*Persea americana* Miller) da Lauraceae é originário da América central e encontra-se distribuído em 67 países, principalmente na América Latina, República Dominicana, Indonésia e Estados Unidos (FAO, 2013). O gênero *Persea* sp. se constitui de espécies polimórficas, compostas por variedades selvagens (var. *flocosa*, var. *steyermarkii*, var. *nubigena*) e raças de interesse econômico: var. *americana* Miller (West Indian); var. *guatemalense* (*Guatemalenses*) e var. *mexicana* (*drymifolia*) (SCORA; BERGH, 1990; ASHWORTH; CLEQQ, 2003). A raça mexicana mostra-se mais adaptada ao frio, enquanto que a guatemalense geralmente é mais produtiva e apresenta frutos superiores em qualidade (SCORA; BERGH, 1990).

A área mundial destinada à cultura do abacateiro é aproximadamente 500.000 ha, sendo México o maior produtor (121.000 há), a Colômbia o terceiro (25.000 ha) e o Brasil o oitavo (11.000 ha) (FAO, 2013). No Brasil existem aproximadamente 11.000 ha, sendo São Paulo o principal Estado produtor, com 54% do total nacional (DORIZZOTTO et al., 2011). Dentre a produção comercial, os cultivares tipo Hass são os mais plantados em pomares que objetivam a produção para exportação (CRANE et al., 2013), devido, entre outras características, à sua adaptabilidade e conservação na pós-colheita, assim como a alta produtividade (ERNST, 2007).

O panorama do consumo é também crescente, possivelmente devido aos benefícios na saúde humana. Segundo Hoffmann (2010), há crescente evolução do consumo *per capita* de abacate nos últimos anos, sendo, porém, ainda muito inferior ao consumo de outros tipos de frutos disponíveis no mercado.

As pesquisas desenvolvidas com abacateiro contextualizam novas abordagens que vem sendo feitas nesta espécie. Propriedades fitoterapêuticas de compostos com atividade farmacêutica, como vasodilatador, antiviral, antioxidante (YASIR; DAS; KHARYA, 2010), agente antileucêmico (LEE et al., 2014, 2015), entre outras, têm sido referenciadas. Até 2014, mais de 60% das pesquisas com abacateiro respondem a assuntos relacionados com a produção agrícola; no entanto, a medicina, bioquímica, meio ambiente e similares são também abordadas e estudadas (Figura 1).





**Figura 1.** Categoria de pesquisa realizada envolvendo a cultura do abacateiro entre 1991-2014 (a) e 2014 (b). Fonte: Adaptado de: *Searchcrossref.org*

recalcitrantes (ROBERTS; KING; 1980), no entanto, o desenvolvimento completo na germinação de sementes de 'Fuerte' após armazenamento em sacos plásticos a 8°C permitiu a manutenção da porcentagem de germinação acima de 80% durante três meses (NEVES; MOREIRA, 1991). Por outro lado, o armazenamento em recipiente de vidro fechado sob baixa temperatura (3 °C e 10 °C), possibilitou 65% de germinação após armazenadas por 12 meses (AROEIRA, 1962).

O processo de armazenamento de sementes é dinâmico e variável toda vez que depende de fatores como o tamanho da semente, estado nutricional da planta matriz, tipo de reserva, entre outras (BONNER; KARRFALT, 2008). O tipo de embalagem para armazená-las é considerado fator importante, pois afeta a variação e concentração de gases, tais como nitrogênio e oxigênio, na atmosfera da semente (HONG; ELLIS, 1995; BONNER; KARRFALT, 2008), sendo que a redução deste último favorece a diminuição do metabolismo e incrementa a longevidade das sementes (BONNER; KARRFALT, 2008) o que pode ter favorecido a viabilidade dos eixos embrionários de abacateiro após os seis meses de armazenamento.

## 5.4 Conclusões

A relação da massa: embrião/eixo embrionário foi diferente entre 'Duke 7' e 'Toro canyon'; sendo que a variação foi apenas na massa dos os embriões.

O armazenamento de sementes a 10 °C para desenvolvimento *in vitro* dos eixos, até dois meses, pode ser feito em saco plástico com ou sem perfurações.

A incidência no desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários de abacateiro foi diferente entre os materiais.

Eixos embrionários de 'Duke 7' mantêm-se viáveis para cultivo *in vitro* mesmo após seis meses de armazenamento dos embriões.

## 5.5 Referências

ADJEI, P. Y.; BANFUL, B. K.; IDUN, I. A. Seed size and seed cut-length effects on germination behavior and seedling growth of avocado (*Persea americana* Merr.). **International Journal of Agricultural Research**, New York, v. 6, n. 3, p. 299–305, 2011.

ALMARAZ-SÁNCHEZ, A.; ALVARADO-ROSALES, D.; SAAVEDRA-ROMERO, L. D. L. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 19, n. 1, p. 5–12, 2013.

AROEIRA, J. S. Dormência e conservação de sementes de algumas plantas frutíferas. **Experimentae**, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 541–609, 1962.

AYALA SILVA, T.; LEDESMA, N. Avocado History, Biodiversity and Production. In: NANDWANI, D. (Ed.). **Sustainable horticultural systems: issues, technology and innovation**. Sustainable development and biodiversity. Heidelberg: Springer International Publishing, 2014. v. 2, p. 157–205.

BONNER, F. T.; KARRFALT, R. P. (Eds.). **The woody plant seed manual**. Washington: Government Printing Office, 2008. 1223 p.

DANTAS, A. C. M.; BONETI, J. I.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Embryo rescue from interspecific crosses in apple rootstocks. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 6, p. 969–973, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000600011>>.

DORIZZOTTO, C. D. A.; SAMPAIO, A. C. ICUMA, I. M.; YAMANISHI, O. K. Avocado production chain in the state of São Paulo (Brazil). In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 7., 2011, Cairns, Australia. **Anais...** Cairns: Avocados Australia, 2011. CD-ROM.

ENCINA, C. L.; PARISI, A.; O'BRIEN, C.; MITTER, N. Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, p. 44–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.019>>.

ERNST, A. A.; WHILEY, A. W.; BENDER, G. S. Propagation. In: SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N.; WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. 3<sup>rd</sup> ed. Wallingford: CABI, 2013. p. 234–267.

FUENTES, J. L.; RODRÍGUEZ, N. N.; SANTIAGO, L.; VALDÉS, Y.; RAMÍREZ, I. M.; RODRÍGUEZ, J. A. Zygotic embryo culture in avocado (*Persea americana* Mill.). **Cultivos Tropicales**, San Jose de las Lajas, v. 25, n. 3, p. 73–76, 2013.

HAJARI, E.; SNYMAN, S. J.; WATT, M. P. Nitrogen use efficiency of sugarcane (*Saccharum spp.*) varieties under *in vitro* conditions with varied N supply. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 21–29, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-015-0746-y>>.

HARTY, P. A. Propagation of avocado by tissue culture: development of a culture medium for multiplication of shoots. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Limpopo, v. 8, p. 70–71, 1985.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 62 p. (Boletim, 1).

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Berlin: Springer Netherlands, 2005. 316 p.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, New York, v. 14, n. 2, p. 83–109, 1995.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, Ashville, v. 30, p. 421–426, 1981.

MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; GUZMÁN-GARCÍA, E.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Effects of an *in vitro* maturation treatment on plant recovery from avocado zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 532–539, 2009.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, M. D. J.; LÓPEZ, A. A.; OSORIO-ACOSTA, F.; LÓPEZ, F. G.; MOCTEZUMA, H. L.; ROSAS, M. M. Evaluación de diferentes fuentes de carbohidratos y medios de soporte, para la multiplicación *in vitro* de portainjertos de cítricos tolerantes a la tristeza. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 59, n. 3, p. 343–350, 2009.

MORAIS, I. V.; COSTA, R. S.; MÔRO, F. V.; MARTINS, A. B. G.; SILVA, R. R. S. Caracterização morfológica do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal do abacateiro. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 1, p. 69–73, 2010.

MURASHIGE, T. Nutrition of plant cells and organs *in vitro*. **In Vitro**, Heidelberg, v. 9, n. 2, p. 81–85, 1973.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NEVES, C. S. V. J.; MOREIRA, C. S. Avaliação de Métodos para Conservação de Sementes de Abacateiro (*Persea* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 13, n. 1, p. 117–122, 1991.

PAULSEN, T. R.; COLVILLE, L.; KRANNER, I.; DAWS, M. I.; HÖGSTEDT, G.; VANDVIK, V.; THOMPSON, K. Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek? **New Phytologist**, West Sussex, v. 198, n. 2, p. 496–503, 2013.

PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; SIMÓN-PÉREZ, E.; VIÑA-NIETO, G.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R. La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill): problemas y limitaciones. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 5, p. 239–244, 1999.

PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1321–1324, 1987.

POPENOE, W.; BUTLER, A. F. Propagation de l'Avocatier. **Revue de Botanique Appliquée et D'Agriculture Coloniale**, Paris, v. 8, n. 83, p. 478–482, 1928.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 39, n. 5, p. 437–442, 2003.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. Rescue of genetically transformed avocado by micrografting. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 5., 2003, Granada, Spain. **Anais...** Granada: ACTAS, 2003. p. 119–122.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. Micrografting and ex vitro grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 1–9, 2005.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, Palo, Alto, v. 63, p. 507–533, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>>.

ROBERTS, E. H.; KING, M. W. Storage of recalcitrant seeds. In: WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. (Eds.). **Crop genetic resources**. The conservation of difficult material. Paris: International Union of Biological Sciences, 1980. p. 39–48.

SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R., MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; BARCELÓ-MUÑOZA, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill.) Embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, n. 4, p. 365–370, 2007.

SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 199–204, 1972.

SCORA, R. W.; BERGH, B. The origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) mill. Lauraceae. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 275, p. 387–394, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.275.47>>.

SKENE, K. G. M.; BARLASS, M. *In vitro* culture of abscised immature avocado embryos. **Annals of Botany**, Oxford, v. 52, p. 667–672, 1983.

THORPE, T. A.; YEUNG, E. C. **Plant embryo culture –methods and protocols**. New Delhi: Humana Press, 2011.

TRAUB, H. P.; AUCHTER, E. C. Sprouting and grafting fractional parts of avocado embryos with attached cotyledonous material. **Science**, Washington, v. 78, n. 2026, p. 389–390, 1933.

VIÑA, G. D. L.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S. P.; MITCHELL, V. J.; PARRY, M. A.; David W.; LAWLOR, D. W. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 37, n. 7–8, p. 587–595, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)80111-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(00)80111-4)>.

VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A. E. Structural aspects and trends in the evolution of recalcitrant seeds in dicotyledons. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 225–239, 2008.

WADA, S.; NIEDZ, R. P.; REED, B. M. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 51, n. 1, p. 19–27, 2015.