

EDMAR RAMOS DE SIQUEIRA

Perspectivas de Propagação Vegetativa do Coqueiro Por
Meio da Cultura de Tecidos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de "Doutor em Ciências Florestais".

CURITIBA

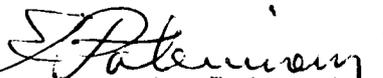
1 9 8 8

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

P A R E C E R

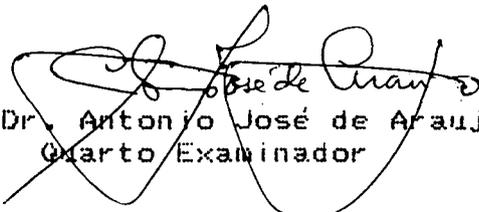
Os membros da Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal para realizar a arguição da Tese de Doutorado apresentada pelo candidato EDMAR RAMOS DE SIQUEIRA, sob o título "PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DO COQUEIRO POR MEIO DA CULTURA DE TECIDO." para obtenção do grau de Doutor em Ciências Florestais - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. Área de concentração: SILVICULTURA, após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Tese completando assim os requisitos necessários para receber o grau e o Diploma de Doutor em Ciências Florestais.

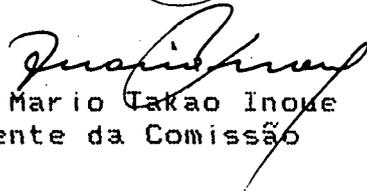
Curitiba, 15 de dezembro de 198


Prof. Dr. Ernesto Paterniani
Primeiro Examinador


Prof. Dr. Mário Soter França-Dantas
Segundo Examinador


Prof. Dr. Flávio Zanette
Terceiro Examinador


Prof. Dr. Antonio José de Araujo
Quarto Examinador


Prof. Dr. Mario Takao Inoue
Presidente da Comissão

Para minha esposa Maria Helena
e meus filhos Pedro e Camila,
dedico o trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

EDMAR RAMOS DE SIQUEIRA, filho de José Ramos de Siqueira e Anísia Faria de Siqueira, nasceu em Sapucaí-Mirim, MG, no dia 25 de Janeiro de 1952.

Em 1972, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, em 1975, obteve o diploma de Engenheiro Florestal.

Foi contratado, em 1976, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), iniciando, nessa época, na UFV, o Curso de Mestrado em Ciência Florestal, concluído em 1978.

Desde 1978, tem trabalhado com melhoramento genético do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), no atual Centro Nacional de Pesquisa de Coco, em Aracaju-SE.

Em 1985, iniciou o Curso de Doutorado em Ciências Florestais no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, no período de 1986-1987, e à CAPES, de 1987-1989.

Ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade oferecida.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPFF), por ter patrocinado a realização da pesquisa.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Coco, pelo material vegetal utilizado.

Ao Professor Dr. Mario Takao Inoue, pela orientação, apoio e confiança.

Aos Professores Drs. Antonio José de Araújo e José Branco de Miranda Filho, pela co-orientação.

Aos Drs. João Erivaldo S. Serpa e João Quíntino de Moura Filho, do CNPCo, pelo apoio.

Ao Dr. João Batista Teixeira, pelas valiosas informações.

À Dra. Maria Elisa C. Graça, pela co-orientação inicial.

Ao Sr. Edilson Batista de Oliveira e Professor Joaquim C. Sena Maia, pela orientação nas análises estatísticas.

À Vera Lucia Beirrutti Eifler, pela idealização e confecção das fotos (FIGURAS 2, 9, 10, 11 e 13) e ao Dr. Jarbas Yukio Shimizu (FIGURA 12).

Ao Osmir José Lavoranti, pelas informações, ajuda e apoio.

Ao Sr. José Nogueira Junior, pela revisão do texto.

Aos Drs. Ernesto Paterniani, Jarbas Yukio Shimizu e Luciano Lisboa Junior, pelas sugestões.

Ao Silvino Mendes e Luiz Coelho Neto, pelas informações e ajuda.

À Kati Mary Milla Pinto, Marta de Fatima Lima e Alfeu Sidnei da Silva, pelo auxílio na impressão do texto.

Ao colega Elias, pelo envio do material vegetal.

Ao Sr. Antonio Aparecido Carpanezi, então Chefe do CNPF, por ter permitido a realização da pesquisa neste Centro.

A Carmem, Lidia, Rachel e Rute, da biblioteca do CNPF, pela ajuda e agradável convívio.

Ao colega e amigo David Nicolas Herrera Pinedo, pelo apoio e ajuda.

À família Zucon, pela ajuda, amizade e apoio.

À minha esposa Maria Helena, pelo incentivo, apoio, compreensão e ajuda.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
	LISTA DE TABELAS	ix
	RESUMO	xi
	ABSTRACT	xii
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	ASPECTOS GERAIS	5
2.2	PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	9
2.3	CULTURA DE TECIDOS	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1	MATERIAIS.....	14
3.2	MÉTODOS	14
3.2.1	Origem dos Explantes	16
3.2.2	Assepsia	17
3.2.3	Meio Básico	17
3.2.4	Antioxidantes	19
3.2.5	Crescimento dos Explantes.....	19
3.2.6	Indução de Calo	20
3.2.7	Indução da Parte Aérea	21

4	RESULTADOS	22
4.1	ASSEPSIA	22
4.2	ANTIOXIDANTES	25
4.2.1	Folha de Planta Jovem	25
4.2.2	Folha de Planta Adulta	25
4.2.3	Inflorescência	27
4.3	CRESCIMENTO DOS EXPLANTES.....	28
4.3.1	Folha de Planta Jovem	28
4.3.2	Folha de Planta Adulta	32
4.3.3	Inflorescência	34
4.4	INDUÇÃO DE CALO - EXPERIMENTOS COM 2,4-D	39
4.4.1	Folha de Planta Jovem	39
4.4.2	Folha de Planta Adulta	39
4.4.3	Inflorescência	42
4.5	INDUÇÃO DE CALO - EXPERIMENTOS COM CITOCININAS	42
4.6	INDUÇÃO DA PARTE AÉREA	48
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA

1	ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	15
2	PROCESSO DE OXIDAÇÃO EM EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA	23
3	GRÁFICO REPRESENTATIVO DO CRESCIMENTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEM	30
4	GRÁFICO REPRESENTATIVO DO ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEM.....	31
5	GRÁFICO REPRESENTATIVO DO CRESCIMENTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA	34
6	GRÁFICO REPRESENTATIVO DO ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA	35

7	GRÁFICO REPRESENTATIVO DO CRESCIMENTO DE EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA	37
8	GRÁFICO REPRESENTATIVO DO ASPECTO DE EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA	38
9	INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA	41
10	CALO EM EXPLANTE DE INFLORESCÊNCIA	44
11	CALO EMBRIOGÊNICO EM EXPLANTE DE INFLORESCÊNCIA...	45
12	DIFERENCIAÇÃO DA PARTE AÉREA EM EXPLANTE DE INFLORESCÊNCIA.....	50
13	OUTRO ASPECTO DA DIFERENCIAÇÃO DA PARTE AÉREA EM EXPLANTE DE INFLORESCÊNCIAS.....	51

LISTA DE TABELAS

1	EFEITO DE ANTIOXIDANTES EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEM, APÓS TRÊS SEMANAS DE ISOLAMENTO	24
2	EFEITO DE ANTIOXIDANTES EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA	26
3	EFEITO DE ANTIOXIDANTES EM EXPLANTES DE INFLORES- CÊNCIA	27
4	CRESCIMENTO E ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEM	29
5	CRESCIMENTO E ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA	33
6	CRESCIMENTO E ASPECTO DE EXPLANTES DE INFLORES- CÊNCIA	36
7	INDUÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA	40

8	INDUÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA ...	43
9	INDUÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA, UTILIZANDO CITOCININAS	46
10	INDUÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA, UTILIZANDO CITOCININAS	47

RESUMO

A pesquisa teve por objetivo desenvolver tecnologia para a propagação vegetativa do coqueiro por meio da cultura de tecidos. Foram utilizadas a folha de planta jovem e adulta e inflorescência, como fontes de explantes. Supondo que o material proveniente de inflorescência era asséptico, foram testados tratamentos de assepsia, para aquele proveniente de folhas. O meio básico utilizado foi constituído dos macroelementos de MURASHIGE & SKOOG²⁷, com os microelementos de EEUWENS¹⁶, acrescido de componentes orgânicos e carvão ativado, conforme BRANTON & BLAKE⁸. Nos tratamentos antioxidantes, foram utilizados os ácidos cítrico e ascórbico (folha de planta jovem) e polivinil-polypyrrolidone (PVP) para folha de planta adulta e inflorescência. No crescimento de explantes e indução de calo, foram utilizadas concentrações progressivas de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Para indução de calo, foram testados, ainda, diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2-isopentenil adenina (2ip) separadamente, e em conjunto; complementares ao 2,4-D. Na indução das brotações, foram utilizadas dosagens progressivas de BAP. Concluiu-se que o material proveniente de folha de planta jovem e adulta, a exemplo do de inflorescência, é asséptico, mas altamente susceptível ao processo de oxidação. Os ácidos cítrico e ascórbico controlam 50 % da incidência de oxidação. O isolamento inicial em meio líquido é altamente eficiente no controle deste processo, propiciando altas taxas de obtenção de explantes saudáveis. As taxas mais elevadas de crescimento, de explantes de folha de planta jovem, foram obtidas com as concentrações de $6,8 \times 10^{-5}$ M e $8,1 \times 10^{-5}$ M de 2,4-D; as maiores taxas para folha de planta adulta foram de $8,1 \times 10^{-5}$ M e $9,0 \times 10^{-5}$ M, e para inflorescência, de 10^{-4} M. A concentração de $1,1 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D, em meio sólido, com uma passagem inicial de uma semana em meio líquido (com $2,3 \times 10^{-4}$ M), induziu o início de formação de calo, no maior número de explantes de tecido de folha de planta adulta. Para inflorescência, os melhores resultados foram obtidos com as concentrações entre $1,1 \times 10^{-4}$ M e $1,7 \times 10^{-4}$ M. Verificou-se a completa formação de calo em explantes de inflorescência; em explantes de folha de planta jovem e adulta, ao contrário, isso não ocorreu. Não se evidenciou nenhuma influência do BAP e do 2ip, no processo de formação de calo. Houve diferenciação da parte aérea em calos de inflorescência, em meio desprovido de regulador de crescimento e incubados no escuro.

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop technology for vegetative propagation of coconut palm through tissue culture. Young and adult plant leaves and inflorescence were used as explant sources. Assuming that the material originated from inflorescence was aseptically treated, aseptic treatments were tested for leaves. The basic nutritional media consisted of macroelements of MURASHIGE & SKOOG²⁷, with the microelements of EEUWENS¹⁶, plus organic components and activated charcoal according to BRANTON & BLAKE⁸. In the antioxidant treatments citric and ascorbic acids were used for explants of young plant leaves and polyvinyl-pyrrolidone (PVP) for explants of adult leaves and inflorescence. For the growth of explants and callus induction progressive concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were tested. For the callus induction different concentrations of 6-benzilaminopurine (BAP) and 2-isopentenyl adenine (2ip) were used separately, on the whole and as a complementary for the 2,4-D. For the shoot induction progressive dosages of BAP were used. It was concluded that the material proceeding from young and adult leaves are aseptically, but increasingly susceptible to browning. Citric and ascorbic acids control 50% of browning incidence. The initial isolation in liquid media is increasingly efficient in the control of this process, resulting high rates of healthy explants obtention. The highest growth rates for explants of young leaves explants were obtained with concentrations of $6,8 \times 10^{-5}$ M of 2,4-D, whereas the highest for explants of adult plant leaves were $6,8 \times 10^{-5}$ M, and for inflorescence, 10^{-4} M. The concentration of $1,1 \times 10^{-4}$ M of 2,4-D in solid media after a week in liquid media induced the formation of callus in the majority of explants of adult plant leaf tissue. For inflorescence the best results were obtained with concentrations between $1,1 \times 10^{-4}$ e $1,7 \times 10^{-4}$ M in solid media. It was observed a complete callus formation on inflorescence explants. This was not observed on young and adult plant leaf explants. No influence of BAP and 2ip in the callus formation process were observed. Some shoot differentiation was observed on inflorescence calli in media free of growth regulators and incubated in the dark.

1 INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera*) é uma das espécies tropicais mais importantes utilizada pelo homem, pois dele pode-se obter bebidas, alimentos "in natura", madeira, fibras, combustível, ração animal, matéria-prima para produção de cosméticos, remédios, plásticos, álcool, óleos e muitos outros produtos. Até 1962, quando suplantado pela soja, constituía-se na maior fonte de óleos vegetais, ocupando ainda hoje posição de destaque no mercado mundial, com uma produção de seis milhões e trezentas mil toneladas (FAO¹⁹).

No Brasil, estimou-se, em 1987, a existência de uma área plantada de 350.000 hectares, com uma produção bruta de 579 milhões de frutos (EMBRAPA¹⁷), distribuída desde o Equador até o Trópico de Capricórnio, ocupando, sobretudo, terras arenosas situadas ao longo da faixa litorânea, que se estende do Pará ao Rio de Janeiro (ASCENSO⁴). Todavia, 95 % desses coqueirais estão localizados no Nordeste, estendendo-se do norte do Ceará ao sul da Bahia, entre os paralelos 3° S e 18° S. Os maiores produtores são os Estados da Bahia, Ceará, Sergipe, Alagoas e Rio Grande do Norte, responsáveis por 81 % da produção nacional (EMBRAPA¹⁷).

Ao contrário dos outros países produtores, a quase totalidade da produção brasileira é destinada à alimentação humana (ASCENSO⁴): "in natura" (água e uso doméstico) e produtos industrializados (farinha, leite, água, creme, flocos e outros). Somente o refugo, isto é, os frutos impróprios para consumo "in natura" ou para processos industriais são utilizados para copra (albúmen sólido desidratado a 5 % de umidade).

De um total de vinte e sete agroindústrias de coco existentes no Brasil, apenas quinze estão em funcionamento, trabalhando com 50 % de sua capacidade, por insuficiência de matéria-prima (EMBRAPA¹⁷). Essa escassez decorre da baixa produtividade dos coqueirais, resultante, dentre outros fatores, da inexistência de material genético melhorado para implantação de coqueirais mais produtivos. A solução, para algumas empresas do setor e mesmo alguns órgãos estatais, tem sido a importação de sementes híbridas da Costa do Marfim. Essas sementes são quase que exclusivamente de um híbrido, denominado PB-121, proveniente do cruzamento da variedade Gigante do Oeste Africano com a Anão Amarelo da Malásia, produzido pelo Instituto de Pesquisas de Oleos e Oleaginosas (IRHO), da França, para as condições do Oeste da África (SIQUEIRA & FRANÇA-DANTAS³³).

O uso de sementes, de um só híbrido, pode acarretar consequências graves devido ao estreitamento da base genética. Também merece uma profunda reflexão a introdução desses híbridos em ambientes diferentes daqueles em que foram produzidos, o que implica em riscos nos ambientes receptores.

Uma das alternativas é a produção de maior número de híbridos de variedades adaptadas às condições brasileiras. No entanto, o processo de produção e teste desses híbridos necessitaria de, pelo menos, catorze anos. Por outro lado, a melhor solução, do ponto de vista genético, é o melhoramento de populações que, para atingir um nível satisfatório, demandaria não menos de vinte e cinco anos.

O uso da propagação, exclusivamente por sementes, para o coqueiro prende-se às suas particularidades morfológicas e fisiológicas, pois ele tem apenas um estipe, sem nenhum lançamento. Adicionalmente, gemas axilares produzem apenas inflorescências e a única gema vegetativa é a apical. Assim sendo, os métodos tradicionais de propagação vegetativa (enraizamento de estacas e enxertia) não se aplicam (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹).

Considerando as particularidades morfológicas, a cultura de tecidos é o método mais viável de propagação vegetativa do coqueiro (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹). Ela é uma técnica pela qual pequenas partes de tecidos ou órgãos são removidos de uma planta doadora e cultivados assepticamente num meio de cultura (BONGA⁷). Esta técnica não se restringe ao uso de material vegetativo juvenil, exige pouco espaço, apresenta economia de tempo e permite a obtenção de altas taxas de multiplicação (GONÇALVES²²).

Considerando a necessidade de produção de material geneticamente melhorado, a pesquisa teve por finalidade principal desenvolver tecnologia para a propagação vegetativa do coqueiro por meio da cultura de tecidos. Desse modo, os principais objetivos do trabalho foram:

a) desenvolver um meio de cultura para a propagação "in vitro", via formação de calo, por meio de investigações com reguladores de crescimento;

b) avaliar diferentes fontes de explantes: folhas (de planta jovem e adulta) e inflorescência e seu comportamento nas diversas etapas do processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

Apesar da existência de controvérsias, o Sudeste Asiático é tido como a mais provável região de origem do coqueiro, principalmente as ilhas entre os oceanos Índico e Pacífico. Desta região, o coqueiro foi levado para a Índia e, daí, para o Leste Africano. Após o descobrimento do Cabo da Boa Esperança, foi levado para o Oeste Africano e, desta região, para as Américas e toda a região tropical do globo (PURSEGLOVE³⁰).

A distribuição geográfica do coqueiro compreende as regiões tropicais entre as latitudes 20° N e 20° S (FRÉMOND et. al.²¹ & PURSEGLOVE³⁰). Estima-se uma área plantada em torno de dez milhões de hectares, distribuída por oitenta países (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹).

Existe uma só espécie de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e duas variedades principais; a Gigante e a Anã. Esta última divide-se em três subvariedades: Verde, Vermelha e Amarela. A variedade Gigante, que forma a maioria dos coqueirais em produção, apresenta, geralmente, fecundação cruzada; seu crescimento é rápido e sua fase vegetativa longa (cerca de sete anos). Esta variedade produz

um número médio de 50 a 60 frutos grandes por ano. Ao contrário, a variedade Anã apresenta um desenvolvimento vegetativo lento, reproduz-se por autofecundação, é mais precoce (três a quatro anos de crescimento vegetativo) e produz um grande número de frutos pequenos (100 a 120 por ano). As flores masculinas e femininas estão distribuídas, separadamente, na mesma inflorescência (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹). O tipo de fecundação é definido pela simultaneidade, ou não, da época de maturação das flores masculinas e femininas.

A variedade Gigante foi introduzida pela primeira vez no Brasil em 1553, da Ilha de Cabo Verde. As introduções de Anões se procederam da seguinte forma: Anão Verde, em 1925, de Java, e em 1939, do Norte da Malásia; Anão Amarelo, em 1938, do mesmo local; e Anão Vermelho, em 1939, também do Norte da Malásia (DIAS¹⁴).

Em 1978, a Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), através do Instituto de Pesquisas de Oleos e Oleaginosas (IRHO), introduziu da Costa do Marfim, o Gigante do Oeste Africano, Anão Amarelo da Malásia e o Anão Vermelho de Camarões (DIAS¹⁴). Essas duas últimas variedades foram reintroduzidas em 1982, pela EMBRAPA, acrescidas do Anão Vermelho da Malásia (SIQUEIRA & FRANÇA-DANTAS³³).

Em 1983, a EMBRAPA introduziu da Costa do Marfim o Gigante do Oeste Africano, G. de Rennell, G. da Polinésia, G. de Novas Hébridias, G. da Malásia, G. de Rotuma e G. de Tonga (SIQUEIRA & FRANÇA-DANTAS³³). Essas introduções foram implantadas no sul da Bahia (CEPLAC) e Sergipe (EMBRAPA), locais de condições edafoclimáticas similares às exigidas pela cultura.

Sendo uma espécie tropical, o coqueiro não suporta mudanças climáticas bruscas, motivo provável de sua adaptação à região litorânea. A temperatura ótima fica ao redor de 27° C, sendo que temperaturas abaixo de 18° C e acima de 32° C afetam a sua fisiologia. A planta necessita não somente de boa precipitação (1.700 a 2.300 mm/ano), mas de uma distribuição regular de chuvas com, pelo menos 130 mm por mês. A insolação acima de 2.000 horas é a ideal, com um nível crítico de 1.800 horas. Ele é pouco exigente em solos e cresce satisfatoriamente em pH entre 5 e 8; todavia, em pH acima de 7,5 começa a mostrar deficiências nutricionais (ENCICLOPÉDIA MIRADOR¹⁸).

Estima-se que possa haver excelentes produções mesmo com níveis de insolação mais baixos que o crítico de 1.800 horas por ano. Isso se explica pela possibilidade de a fotossíntese se processar em baixas intensidades luminosas. Na região tradicionalmente produtora de coco do Nordeste, constata-se a ocorrência de um déficit hídrico generalizado, com excessão do sul da Bahia, onde, registram-se baixas temperaturas.

Uma das principais preocupações da pesquisa em melhoramento genético do coqueiro, nos outros países, tem sido o aumento da quantidade de copra. Como no Brasil, praticamente, toda a produção é utilizada na alimentação humana, o aumento da quantidade de copra é válido principalmente para fins industriais, enquanto que para o consumo "in natura", não há grandes exigências quanto ao tamanho do fruto. Assim, para as condições de consumo de coco no Brasil, o número de frutos e as características organolépticas são as mais importantes (SIQUEIRA & FRANÇA-DANTAS³³).

Orientado nas exigências edafoclimáticas e de mercado da cultura, o programa de melhoramento genético do coqueiro no Brasil, está sendo conduzido com base nos métodos clássicos de seleção fenotípica, produção e teste de híbridos, e produção de composto.

O método de melhoramento utilizado pelo IRHO, e adotado sob sua orientação, em diversas regiões do mundo, é baseado na capacidade de combinação entre indivíduos e na seleção fenotípica para os caracteres com alta herdabilidade. De acordo com PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹, este programa pode ser sumarizado do seguinte modo: a) introduções são efetuadas para obtenção de um máximo de variabilidade genética; b) híbridos entre diferentes ecotipos e variedades são produzidos e avaliados em testes comparativos. Os melhores híbridos são reproduzidos para produção de sementes; c) cruzamentos entre indivíduos, das variedades e ecotipos, dos híbridos selecionados são realizados, para produzirem recombinação para novos ciclos de melhoramento; d) simultaneamente, um melhoramento dos melhores híbridos é realizado, escolhendo-se, dentro de ambos progenitores, os indivíduos que produzem uma melhor progênie (seleção intra-híbridos).

Para a produção de sementes, os melhores híbridos detectados no programa de melhoramento são reproduzidos em larga escala. No presente, esta produção é relativamente fácil devido ao uso das variedades Anãs, que são autógamas, como plantas mães. Para reproduzir um bom híbrido (A x B), do qual A é uma variedade Anã, um campo de produção de sementes de A é implantado e os melhores indivíduos de B são usados como polinizadores. Esse campo deve estar totalmente isolado de qualquer pólen estranho. É um método

relativamente caro e demanda rígidos controles (emasculação, conservação de pólen e a polinização) e uma sofisticada organização (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹).

2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação vegetativa do coqueiro, por meio da cultura de tecidos, poderá permitir significantes aumentos de produtividade pela propagação de indivíduos de alta produção. Da mesma forma, é óbvio o interesse de se propagar indivíduos resistentes a certas doenças, ou com uma particular adaptação a condições adversas de ambiente (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹).

Devido a suas características morfológicas, o coqueiro não tem sido propagado vegetativamente, apesar de ramificações ocorrerem, de forma natural, e esporadicamente, pela transformação de inflorescências, ramos florais e mesmo flores, em brotações vegetativas (DAVIS^{10,11}). Apesar de tentativas bem sucedidas no enraizamento desses lançamentos (SUDARISP et. al.³⁴), o problema da reversão do meristema floral para vegetativo permanece sem solução. Apesar da alporquia se realizar com êxito e proporcionar o rejuvenescimento de coqueiros, particularmente valiosos, ela não leva à sua multiplicação (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹). O desenvolvimento de diversos lançamentos foi obtido pela divisão do ponto de crescimento de mudas jovens (DAVIS¹¹), contudo o resultado desses experimentos não pode ser usado para a propagação de plantas adultas superiores.

2.3 CULTURA DE TECIDOS

Os primeiros trabalhos com a cultura "in vitro" do coqueiro foram realizados com embriões zigóticos (CUTTER & WILSON⁹; ABRAHAMS & THOMAS¹, e VENTURA et. al.³⁴).

GUZMAN¹² e DEL ROSARIO & DE GUZMAN¹³ obtiveram o cultivo "in vitro" do embrião da variedade Macapuno. O embrião desta variedade não germina naturalmente, mas, quando removido da noz e colocado em meio de cultura, ele origina uma plântula que pode ser cultivada normalmente e produz frutos típicos desta variedade.

O mesmo tipo de pesquisas, realizado com êxito, em outras variedades de Anões e Gigantes, encontra-se na literatura (FISHER & TSAI²⁰; IYER²⁵; GUPTA et. al.²³ e KARUNARATE et. al.²⁶).

ASSY BAH² trabalhou com embriões do híbrido PB-121, com a transferência das plântulas, obtidas "in vitro", para condições naturais de crescimento. O método desenvolvido, para este híbrido, foi aplicado com bons resultados, para dez variedades de Anões e dez de Gigantes.

A abordagem principal que vem sendo utilizada na tentativa de propagação vegetativa do coqueiro é a que envolve a produção de calos numa tentativa de neoformação de gemas ou embriões somáticos de fragmentos de caules, folhas, raízes e inflorescências (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹).

Pesquisas têm sido desenvolvidas para induzir calos, em explantes, de diferentes partes da planta: caule (APAVATJRUT & BLAKE³); raízes e folhas (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁸); inflorescência (EEUWENS¹⁶ e BLAKE & EEUWENS⁵); endosperma (FISHER & TSAI²⁰);

gema apical de mudas jovens (BLAKE & EEUWENS⁵) e embriões cultivados "in vitro" (EEUWENS^{15,16}).

Com relação à desinfecção, fragmentos de raízes originam sérios problemas, devido à alta contaminação. As inflorescências jovens têm a vantagem de fornecer material asséptico, pois apresentam-se inseridas em espatas protetoras. A espata externa é lavada, satisfatoriamente, com hipoclorito de sódio a 6 % (v/v) (BRANTON & BLAKE⁸).

As primeiras pesquisas sobre a formação de calos foram realizadas, principalmente, para determinar as condições de cultura que requeriam os explantes para sobreviver e crescer. Problemas de oxidação foram relatados nas primeiras culturas "in vitro"; contudo, as publicações disponíveis davam poucos detalhes acerca de sua intensidade, localização nos tecidos, emergência e consequências (PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹).

EEUWENS¹⁶ estudou a influência do meio mineral em explantes provenientes de ramos florais, estipe e fragmentos da base das folhas. Apesar do pouco tempo em cultura (seis semanas), o autor constatou a influência favorável de uma solução mineral especialmente desenvolvida (macro e micronutrientes) no aumento de peso fresco dos tecidos, quando comparada aos meios de MURASHIGE & SKOOG²⁷ (MS); HELLER²⁴ e WHITE³⁶. Esse meio, denominado de Y3, continha o nitrogênio em ambas as formas, amônia e nitrato, com altos níveis de potássio e iodo.

Em outra pesquisa, o mesmo autor verificou a influência da nutrição orgânica e dos reguladores de crescimento nos explantes de tecido de inflorescência. Ficou evidenciada a influência das diferentes fontes de nitrogênio orgânico (aminoácidos, caseína

hidrolisada e aminoácidos), carboidratos, auxinas, citocininas e giberelinas. Os resultados mostraram que os reguladores de crescimento, tais como, os ácidos 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D) e naftalenoacético (NAA), estimularam o crescimento dos tecidos apenas em baixas concentrações ($10^{-7}M$) e que sua presença no meio de cultura foi inibitória e causou a morte dos tecidos em concentrações de $10^{-6}M$. Entre as citocininas usadas na concentração de $10^{-6}M$, 6-benzilaminopurina (BAP) e zeatina encontram-se entre as mais eficientes (EEUWENS¹⁶). Além do crescimento dos explantes, diferentes tipos de proliferações foram obtidas. Divisões celulares que levaram à formação de calo na superfície ocorreram na parte superior de explantes de caule, base das folhas e inflorescência (EEUWENS¹⁵). Contudo, o incremento no peso fresco dos explantes resultou principalmente do crescimento do tecido original (EEUWENS¹⁶).

Calos, obtidos de explantes de tecido do meristema apical (APAVATJURUT & BLAKE³) e do ráquis (EEUWENS^{15,16}), não puderam ser subculturados devido ao problema de oxidação. Subculturas de calo só foram possíveis quando carvão ativado (0,25 %) e uma alta concentração de 2,4-D ($10^{-4}M$ a $10^{-3}M$) foram adicionados ao meio (BLAKE⁶).

BRANTON & BLAKE⁸, utilizando explantes de inflorescências jovens, obtiveram a iniciação de calóides (calos originados pela expansão do meristema floral) num meio com 2,4-D a $10^{-4}M$. Esses calóides eram nodulares e observações mostraram pequenas células com densas estruturas citoplasmáticas, com muito pouca diferenciação. Redução na concentração de 2,4-D para cerca de $10^{-8}M$ por

diversas subculturas resultou na produção de calóides com estruturas de cor branca semelhante a embrióides. Em muitos casos, essas estruturas desenvolviam-se em brotações anormais ou estruturas parecidas com folhas, frequentemente com um bom número de raízes primárias. Contudo, duas plântulas normais foram obtidas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

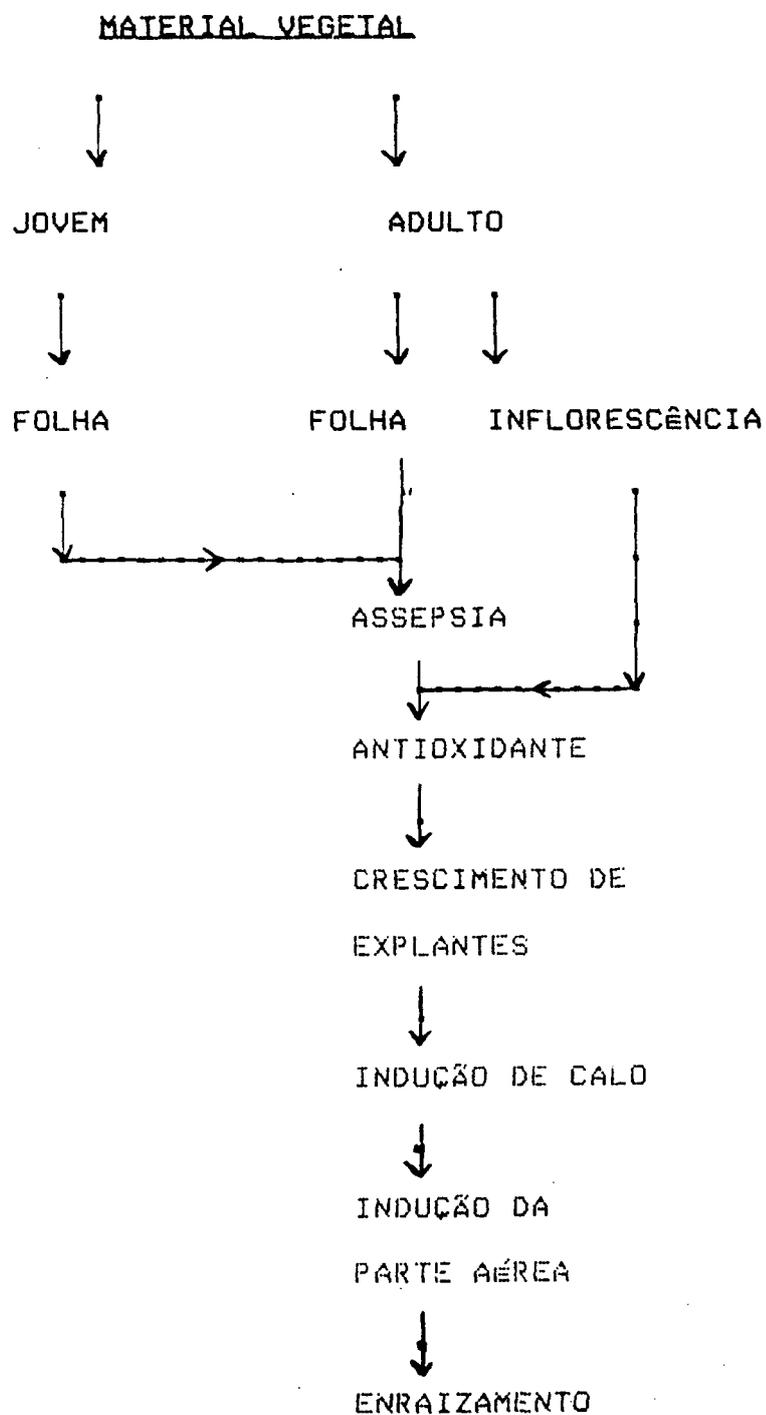
3.1 MATERIAIS

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas plantas jovens e adultas da variedade Anão Verde. O material vegetal de planta adulta foi enviado do Centro Nacional de Pesquisa de Coco, localizado em Aracaju, Sergipe. O material jovem foi obtido de mudas produzidas no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, em Colombo, Paraná, onde foi realizado o trabalho.

3.2 MÉTODOS

A metodologia empregada na realização do trabalho seguiu o esquema delineado na FIGURA 1.

FIGURA 1. ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.



3.2.1 Origem dos Explantes

Os explantes provenientes de folhas de planta jovem e adulta, foram obtidos daquelas mais jovens, possíveis de se obter, sem causar dano à gema apical. Foram coletados cilindros (de 8 x 12 mm) de tecido de folíolos desprovidos de nervura central, que foram submetidos aos tratamentos de assepsia. Após esta fase, um cilindro menor (de 4 x 12 mm) foi cortado assepticamente dos originais, novamente seccionado para 4 x 6 mm e lavados em água bidestilada. Esses últimos foram cortados transversalmente em segmentos de aproximadamente 0,25 mm de espessura e colocados no meio de cultura.

As inflorescências jovens foram lavadas, externamente, com hipoclorito de sódio (6 % v/v). Após a remoção das espatas externa e interna, os ramos florais (de 8-50 mm de comprimento) foram cortados transversalmente em segmentos de, aproximadamente, 0,25 a 1,0 mm de espessura.

3.2.2 Assepsia

Como métodos de assepsia, do material proveniente de folhas, foram utilizadas combinações de dois fatores: hipoclorito de sódio (1 e 2 %) e ácido cítrico ($7,8 \times 10^{-4}$ M). O experimento, no arranjo fatorial ficou constituído, então, dos seguintes tratamentos:

- (1) hipoclorito de sódio (1 %);
- (2) hipoclorito de sódio (1 %) e ácido cítrico;

- (3) hipoclorito de sódio (2 %);
- (4) hipoclorito de sódio (2 %) e ácido cítrico;
- (5) ácido cítrico;
- (6) testemunha (sem tratamento).

Cada tratamento foi repetido 30 vezes. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado.

Após os tratamentos, os explantes foram lavados por três vezes com água esterilizada e bidestilada e, então, colocados no meio de cultura mais completo e incubados a 30° C, no escuro.

A avaliação foi realizada após duas semanas em cultura, pela porcentagem de contaminação.

3.2.3 Meio Básico

O meio básico utilizado foi constituído dos macronutrientes de MURASHIGE & SKOOG²⁷, os micronutrientes de EEUWENS¹⁵, acrescido dos componentes orgânicos e carvão ativado (0,25 %), conforme BRANTON & BLAKE⁸. A esterilização foi feita em autoclave a 121° C, por dez minutos. O pH do meio foi ajustado, antes da esterilização, em 5,8.

3.2.4 Antioxidantes

Como métodos antioxidantes, foram utilizados dois tipos de experimentos. O primeiro consistiu da utilização do ácido ascórbico ($5,7 \times 10^{-4}$ M) e ácido cítrico ($7,8 \times 10^{-4}$ M) para folha de planta jovem; os tratamentos foram, então, os seguintes:

- (1) ácido cítrico, sem mudança de local;

(2) ácido ascórbico, sem mudança de local;

(3) ácido ascórbico, com mudança de local dos explantes, no mesmo frasco, a intervalos de dois dias;

(4) ácido cítrico, com mudança de local dos explantes no mesmo frasco, a intervalos de dois dias;

(5) imersão em água, com mudança de local dos explantes no mesmo frasco, a intervalos de dois dias;

(6) imersão em água.

Os tratamentos constituíram-se da imersão dos explantes nestas soluções, por 30 minutos, antes do isolamento em meio básico.

No segundo experimento, testou-se a eficiência do polivinil-polyrrolidone (PVP) e do isolamento inicial em meio líquido, para explantes de folha de planta adulta e inflorescência. Os explantes foram isolados neste meio, por uma semana; após esse período, foram transferidos para meio sólido. Os dois tipos de meios tiveram a mesma composição; a única diferença foi o emprego de ágar no meio sólido.

Os tratamentos foram os seguintes:

(1) meio sólido sem PVP;

(2) meio líquido sem PVP;

(3) meio sólido com PVP;

(4) meio líquido com PVP.

A concentração de PVP foi de 1,0 mg/l.

Os tratamentos tiveram um número inicial de 60 repetições.

A variável foi a presença de oxidação, o desvio padrão foi calculado pela fórmula da distribuição binomial, e o teste estatístico utilizado no primeiro experimento foi o teste exato de Fisher e, no segundo, o qui-quadrado (SIEGEL³²).

As culturas foram mantidas a 30°C, no escuro, por um período de 21 dias, quando foram avaliadas.

3.2.5 Crescimento de Explantes

Para avaliar o desenvolvimento dos explantes, os tratamentos consistiram de concentrações variáveis de 2,4-D ($6,8 \times 10^{-5}$ M; $8,1 \times 10^{-5}$ M; $9,0 \times 10^{-5}$ M; 10^{-4} M e $1,08 \times 10^{-4}$ M) e fixas de Zip ($4,9 \times 10^{-6}$ M) e BAP ($4,4 \times 10^{-6}$ M).

Cada tratamento foi representado, inicialmente, por 50 explantes.

A variável analisada foi o crescimento do explante; o desvio padrão foi calculado pela fórmula da distribuição binomial e o teste estatístico utilizado foi o teste exato de Fisher (SIEGEL³²).

Devido à impossibilidade de se medir diretamente os explantes (devido a sua forma irregular e ao risco de contaminação) ou pesá-los; optou-se por avaliar o crescimento de forma indireta. Adotaram-se quatro classes de crescimento para avaliá-los: NENH. (nenhum); PEQ. (pequeno); REG. (regular) e GR. (grande). Foram selecionados os explantes padrões para cada classe e, por comparação, foi realizada a avaliação. O mesmo critério foi adotado para avaliar o aspecto, com três classes: RUIM; REG. (regular) e BOM.

As condições de incubação foram idênticas às anteriores.

3.2.6 Indução de Calo

Para induzir a formação de calo, foram utilizados dois tipos de experimentos. O primeiro, consistiu do isolamento inicial em meio líquido, por uma semana, em concentrações variáveis de 2,4-D ($1,1 \times 10^{-4}$ M; $2,3 \times 10^{-4}$ M; $3,4 \times 10^{-4}$ M e $4,5 \times 10^{-4}$ M) e fixas de BAP ($4,4 \times 10^{-6}$ M) e 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$ M).

Após esse período, os explantes foram transferidos para meio sólido com a metade das concentrações anteriores de 2,4-D ($5,6 \times 10^{-5}$ M; $1,1 \times 10^{-4}$ M; $1,7 \times 10^{-4}$ M e $2,3 \times 10^{-4}$ M).

O outro experimento consistiu do isolamento inicial em meio líquido, com o dobro da concentração ótima de 2,4-D, identificada no primeiro experimento. Após uma semana deste isolamento, os explantes foram transferidos para meio sólido com a concentração ótima de 2,4-D e variáveis de 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$ M; $7,4 \times 10^{-6}$ M e $14,8 \times 10^{-6}$ M) e BAP ($4,4 \times 10^{-6}$ M; $6,7 \times 10^{-6}$ M e $13,3 \times 10^{-6}$ M). Os tratamentos foram, então, os seguintes:

1. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$ M);
2. 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$ M);
3. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$ M) + 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$ M);
4. BAP ($13,3 \times 10^{-6}$ M);
5. 2ip ($14,8 \times 10^{-6}$ M);
6. BAP ($6,7 \times 10^{-6}$ M) + 2ip ($7,4 \times 10^{-6}$ M);
7. Testemunha.

A variável analisada foi presença de calo; o desvio padrão foi calculado pela fórmula da distribuição binomial e o teste estatístico utilizado foi o teste exato de Fisher.

As culturas foram mantidas a 30°C, no escuro, por períodos de 45, 60 e 90 dias, quando foram avaliadas.

3.2.7 Indução da Parte Aérea

Para induzir a diferenciação da parte aérea foram utilizadas diferentes concentrações de BAP (0,0; $4,4 \times 10^{-6}$ M; $13,3 \times 10^{-6}$ M; $4,4 \times 10^{-5}$ M; $6,7 \times 10^{-5}$ M e $8,9 \times 10^{-5}$ M).

Foram utilizadas diferentes condições de incubação, quanto à luminosidade: a) incubação imediata em baixa intensidade luminosa (1000 lux); b) incubação inicial no escuro (por uma semana), antes da transferência para uma baixa intensidade luminosa; c) permanência de 21 dias no escuro, antes da transferência para a luz e finalmente, d) incubação no escuro até o surgimento das brotações. A temperatura, nas condições de luz e escuro, foi de 30°C.

Cada tratamento foi repetido 30 vezes.

A variável utilizada foi a presença de brotações.

4. RESULTADOS

4.1 ASSEPSIA

Nos experimentos conduzidos para avaliar tratamentos de assepsia da folha, de material proveniente de folha de planta jovem e adulta, detectou-se que não houve nenhum tipo de contaminação nos diversos tratamentos, inclusive na testemunha. Isso mostra que as folhas mais jovens, utilizadas como fontes de explantes, estão protegidas pelas mais velhas e estão totalmente isoladas do ambiente externo.

Ao contrário da contaminação, houve oxidação de todos os explantes (FIGURA 2).

4.2 ANTIOXIDANTE

4.2.1 Folha de Planta Jovem

Pela análise da TABELA 1, pode-se observar um efeito benéfico dos ácidos cítrico e ascórbico, no controle das oxidações de explantes provenientes de folha de planta jovem. Apesar disso, persiste uma incidência relativamente alta de oxidações.

A remoção, com mudança de local, a intervalos de dois dias, não diminuiu a taxa de oxidação. Ao contrário, agravou-a, chegando a anular o efeito benéfico dos antioxidantes.

FIGURA 2. PROCESSO DE OXIDAÇÃO (COLORAÇÃO MARROM) EM EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA.

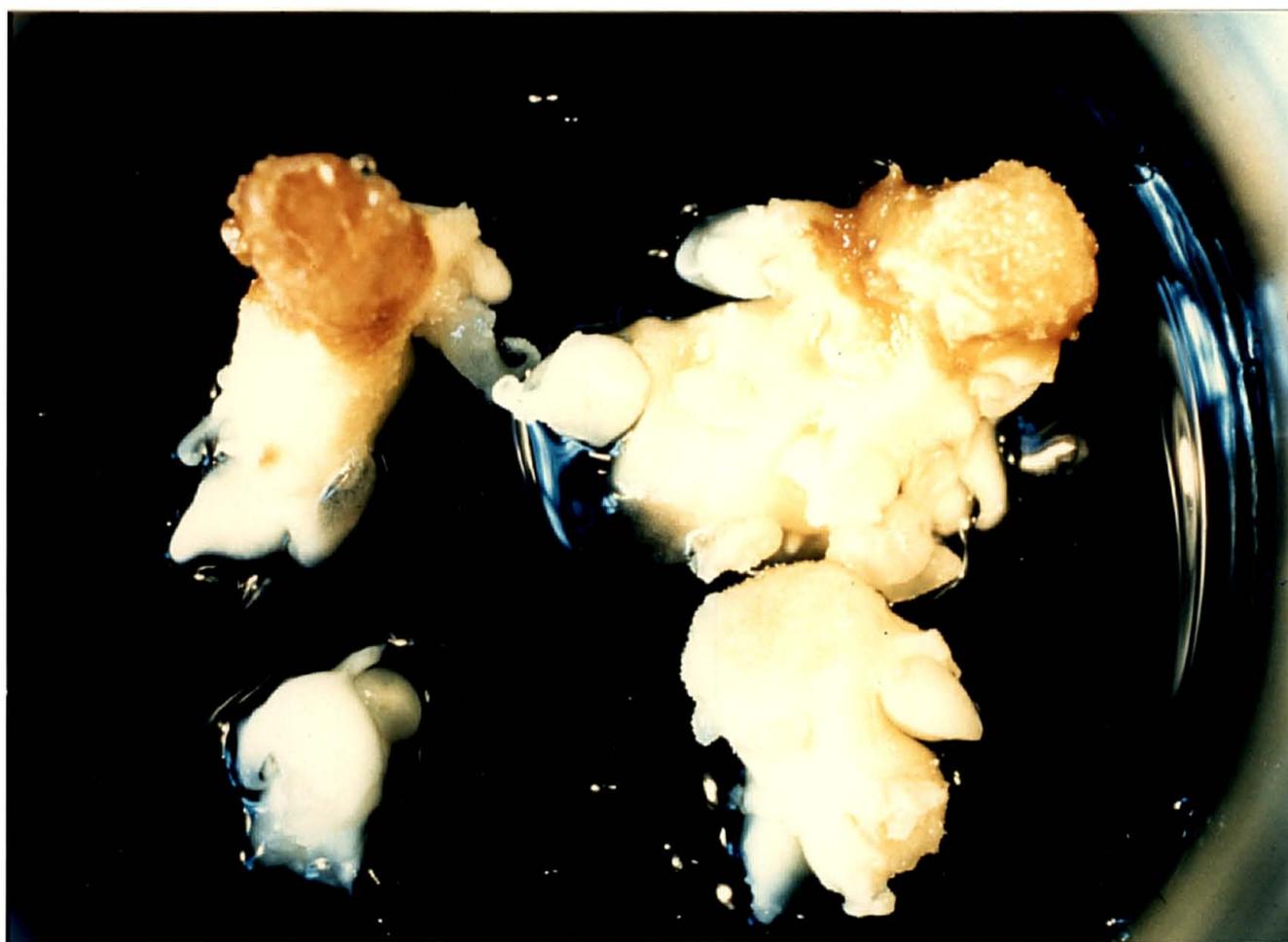


TABELA 1. EFEITO DE ANTIOXIDANTES EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEM, APÓS TRES SEMANAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTOS	TOTAL DE EXPLANTES	% DE OXIDADOS	EXPLANTES SADIOS		
			TOTAL	%	s
1. Ácido cítrico	45	46,7	24	53,3 a	7,4
2. Ácido ascórbico	50	54,0	23	46,0 a	7,0
3. Ácido ascórbico, com remoção	30	90,0	03	10,0 b	5,5
4. Ácido cítrico, com remoção	25	100,0	00	00,0	-
5. Imersão em água, com remoção	15	100,0	00	00,0	-
6. Imersão em água	40	100,0	00	00,0	-

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão

4.2.2 Folha de Planta Adulta

O isolamento direto em meio sólido causa uma oxidação significativa em explantes provenientes de folha de planta adulta, que não é amenizada pela presença do PVP (TABELA 2). O meio líquido, independente da presença do PVP, diminui significativamente a incidência de oxidação. Pelo seu comportamento, tanto no meio sólido, como líquido, fica evidenciado que o PVP não tem nenhum efeito no controle das oxidações.

4.2.3 Inflorescência

O comportamento dos explantes de inflorescência, submetidos aos tratamentos antioxidantes, é idêntico aos de folha de planta adulta (TABELA 3). Neste caso, também verificaram-se altas taxas de obtenção de explantes sadios.

TABELA 2. EFEITO DE ANTIOXIDANTES EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA, APÓS TRES SEMANAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTOS	TOTAL	%	EXPLANTES SADIOS		
	DE		TOTAL	%	s
	EXPLANTES	OXIDADOS			
11. Meio sólido sem PVP	59	42,0	34	58,0 b	6,4
12. Meio líquido sem PVP	52	3,8	50	96,2 a	2,6
13. Meio sólido com PVP	55	54,5	25	45,5 b	6,7
14. Meio líquido com PVP	50	8,0	46	92,0 a	3,8

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste qui-quadrado ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão

TABELA 3. EFEITO DE ANTIOXIDANTES EM EXPLANTES DE INFLORESCENCIA, APÓS TRES SEMANAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTOS	TOTAL	% DE	EXPLANTES SADIOSI		
	DE	OXIDADOS	TOTAL	%	S
	EXPLANTES				
11. Meio sólido sem PVP	35	45,7	19	54,3 b	8,4
12. Meio líquido sem PVP	43	9,3	39	90,7 a	4,4
13. Meio sólido com PVP	45	40,0	27	60,0 b	7,3
14. Meio líquido com PVP	41	7,3	38	92,7 a	4,1

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste qui-quadrado ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão

4.3 CRESCIMENTO DE EXPLANTES

4.3.1 Folha de Planta Jovem

As maiores taxas de crescimento de explantes, provenientes de folha de planta jovem, verificam-se nas concentrações de $6,8 \times 10^{-5}$ M e $8,1 \times 10^{-5}$ M de 2,4-D (TABELA 4).

Pelos gráficos das FIGURAS 3 e 4, observa-se uma proporcionalidade entre concentração do produto, porcentagem de crescimento e aspecto. Concentrações maiores que $8,1 \times 10^{-5}$ M deprimem o crescimento. O mesmo ocorre com o aspecto; os melhores situam-se nas menores concentrações e, nas demais, há predominância dos piores.

TABELA 4. CRESCIMENTO E ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEN, APÓS QUATRO SEMANAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTO (molar.)	TOTAL DE EXPLANTES	CRESCIMENTO (Z)								ASPECTO (Z)							
		NENH.		PEQ.		REG.		GR.		RUIZ		REG.		BOM			
2,4-D			s		s		s		s		s		s		s		
$16,8 \times 10^{-5}$	30	13,9	6,2	26,7	8,1	20,0	7,3	40,0	ab	8,9	20,0	7,3	30,0	8,4	50,0	a	9,1
$18,1 \times 10^{-5}$	40	7,5	4,2	22,5	6,6	12,5	5,2	57,5	a	7,8	50,0	7,9	12,5	5,2	37,4	ab	7,6
$19,0 \times 10^{-5}$	35	34,3	8,0	22,8	7,1	14,3	5,9	28,6	bc	7,6	51,4	8,4	28,6	7,6	20,0	bc	6,8
10^{-4}	35	74,3	7,4	5,7	3,9	2,9	2,8	17,1	c	6,4	85,7	5,9	2,9	2,8	11,4	c	5,4
$11,00 \times 10^{-4}$	35	65,7	8,0	8,6	4,7	14,3	5,9	11,4	c	5,4	71,4	7,6	20,0	6,8	8,6	c	4,7

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher (P > 0,05).

NENH. - Nenhum
 PEQ. - Pequeno
 REG. - Regular
 GR. - Grande
 s - Desvio-padrão

FIGURA 3. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO CRESCIMENTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEM.

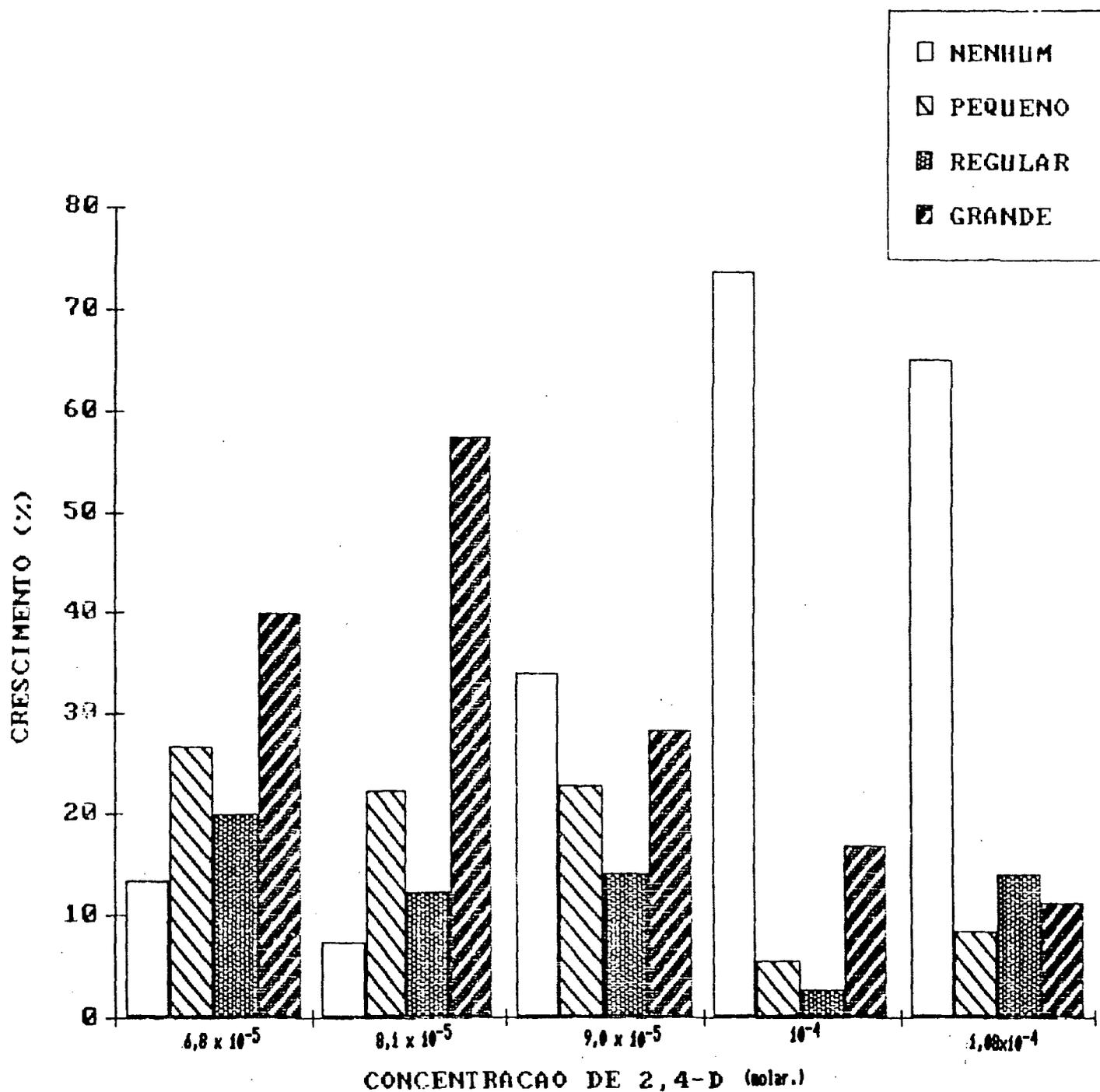
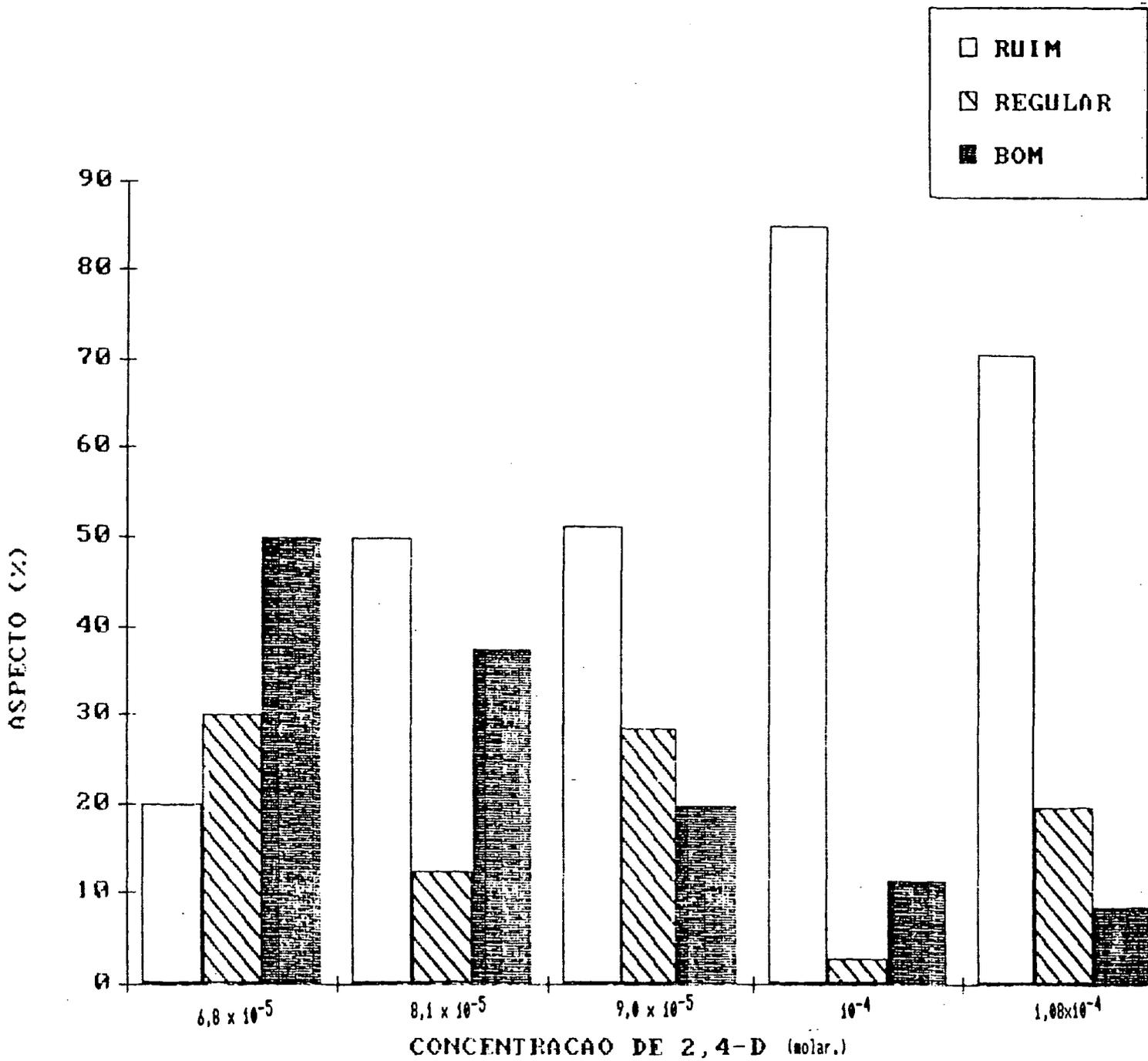


FIGURA 4. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA JOVEM.



4.3.2 Folha de Planta Adulta

As concentrações de $8,1 \times 10^{-5}$ M e $9,0 \times 10^{-5}$ M foram as que provocaram as maiores taxas de crescimento (TABELA 5).

Quanto ao aspecto, os melhores resultados foram os das concentrações de $6,8 \times 10^{-5}$ M, $8,1 \times 10^{-5}$ M, $9,0 \times 10^{-5}$ M e $1,08 \times 10^{-4}$ M, sem diferença estatística entre eles.

A análise dos gráficos das FIGURAS 5 e 6 realça um desempenho negativo, tanto para crescimento e aspecto, na concentração de 10^{-4} M, e um desempenho melhor, na de $1,08 \times 10^{-4}$ M, o que é de difícil explicação. O esperado era que, a partir de uma concentração ótima, houvesse uma desaceleração proporcional do crescimento, nas concentrações maiores.

4.3.3 Inflorescência

Para os explantes de inflorescência, a concentração de 10^{-4} M de 2,4-D foi a que provocou a maior taxa de crescimento (TABELA 6).

Os melhores resultados, em termos de aspecto, se situam nas concentrações de 10^{-4} M e $1,08 \times 10^{-4}$ M.

A análise do gráfico da FIGURA 7 evidencia uma baixa taxa de ocorrência na classe de NENHUM crescimento, em relação ao de folha, tanto de planta jovem, como de adulta.

A mesma observação vale para o gráfico da FIGURA 8, referente ao aspecto, na classe RUIM.

TABELA 5. CRESCIMENTO E ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA, APÓS QUATRO SEMANAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTO (molar.)	TOTAL DE EXPLANTES	CRESCIMENTO (Z)								ASPECTO (Z)							
		NENH.	s	PEQ.	s	REG.	s	GR.	s	RUIM	s	REG.	s	BOM	s		
$16,8 \times 10^{-5}$	50	12,0	4,6	10,0	4,2	28,0	6,3	50,0	b	7,1	40,0	6,9	18,0	5,4	42,0	a	7,0
$18,1 \times 10^{-5}$	50	18,0	5,4	10,0	4,2	18,0	5,4	54,0	ab	7,0	44,0	7,0	20,0	5,6	36,0	a	6,8
$19,0 \times 10^{-5}$	45	15,6	5,4	-	-	13,3	5,1	71,1	a	6,8	51,1	7,4	8,9	4,2	40,0	a	7,3
10^{-4}	40	40,0	7,7	17,5	6,0	30,0	7,2	12,5	c	5,2	72,5	7,1	15,0	5,6	12,5	b	5,2
$11,00 \times 10^{-4}$	50	20,0	5,6	14,0	4,9	28,0	6,3	38,0	b	6,9	56,0	7,0	16,0	5,2	28,0	ab	6,3

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

NENH. - Nenhum
 PEQ. - Pequeno
 REG. - Regular
 GR. - Grande
 s - Desvio-padrão

FIGURA 5. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO CRESCIMENTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA.

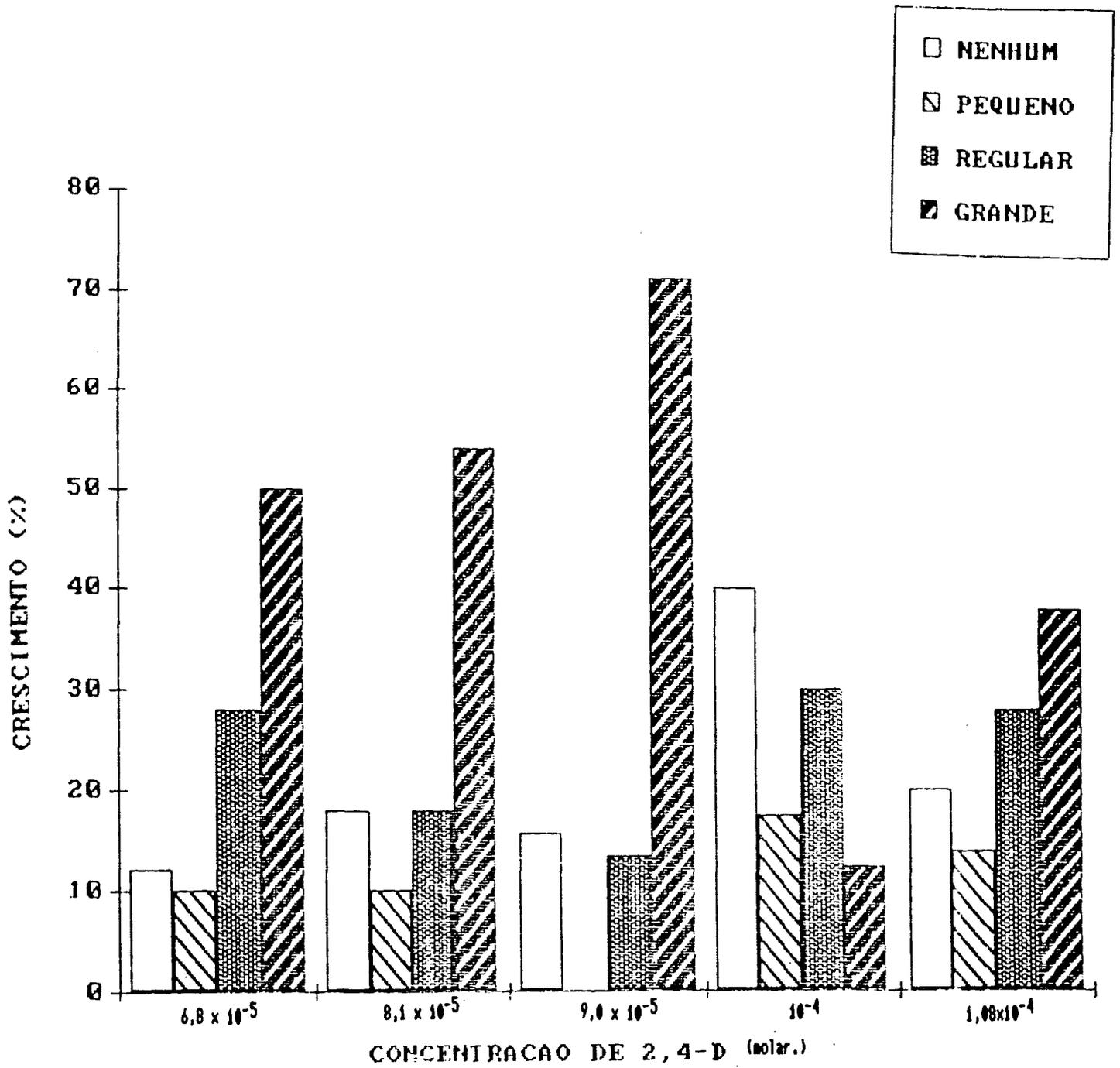


FIGURA 6. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO ASPECTO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA.

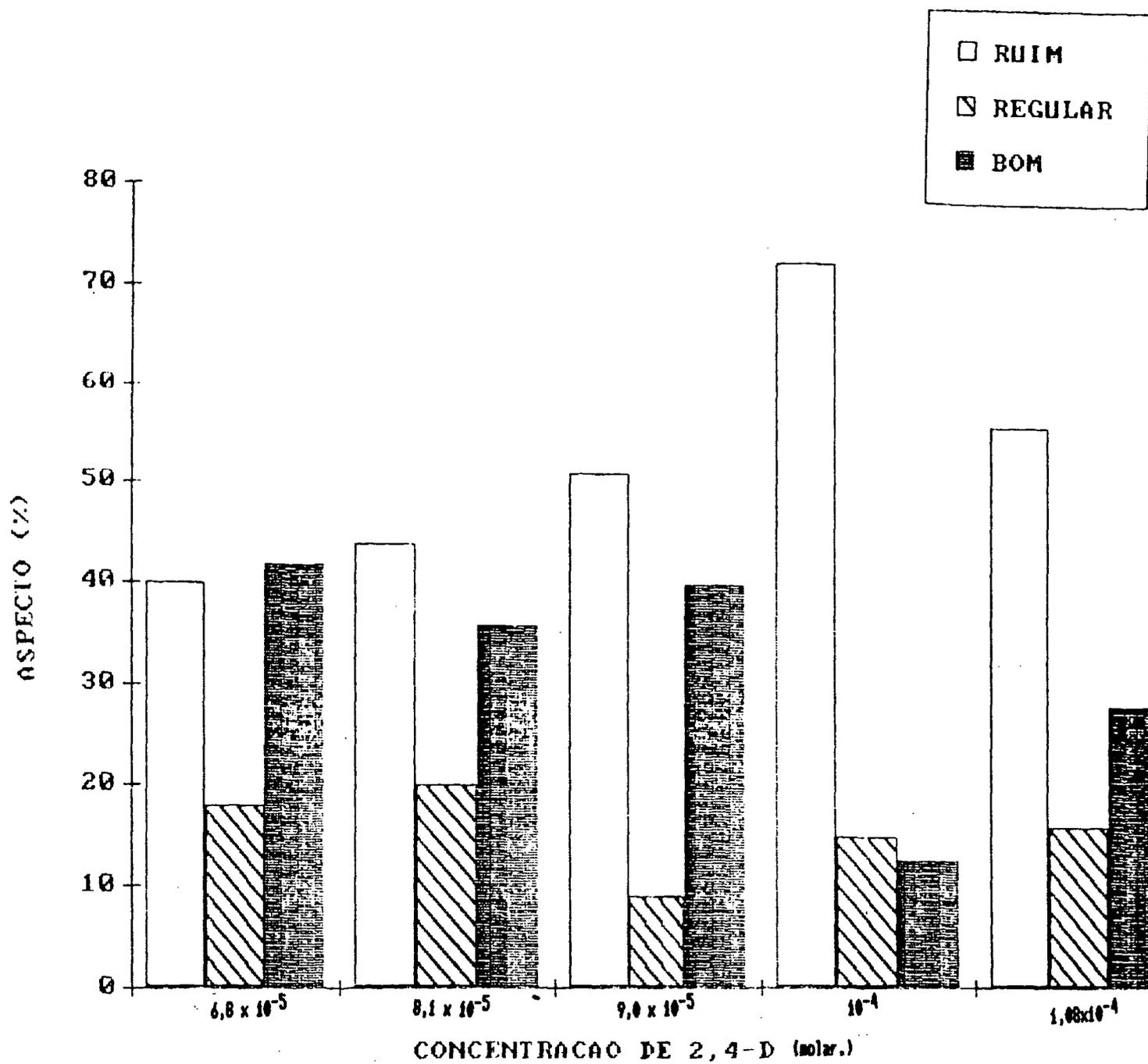


TABELA 6. CRESCIMENTO E ASPECTO DE EXPLANTES DE INFLORESCENCIA, APÓS QUATRO SEMANAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTO (molar.)	TOTAL DE EXPLANTES	CRESCIMENTO (Z)								ASPECTO (Z)							
		NENH.	s	PEQ.	s	REG.	s	GR.	s	RUIM	s	REG.	s	BOM	s		
$16,8 \times 10^{-5}$	50	16,0	5,2	14,0	4,9	26,0	6,2	44,0	b	7,0	24,0	6,0	30,0	6,5	46,0	c	7,0
$18,1 \times 10^{-5}$	50	20,0	5,6	10,0	4,2	24,0	6,0	46,0	b	7,0	24,0	6,0	12,0	4,6	64,0	bc	6,8
$19,0 \times 10^{-5}$	50	28,0	6,3	16,0	5,2	14,0	4,9	42,0	b	7,0	36,0	6,8	16,0	5,2	48,0	c	7,1
10^{-4}	50	-	-	6,0	3,4	12,0	4,6	82,0	a	5,4	4,0	2,8	14,0	4,9	82,0	a	5,4
$11,08 \times 10^{-4}$	45	-	-	20,0	6,0	20,0	6,0	60,0	b	7,3	4,4	3,0	26,7	6,6	68,9	ab	6,9

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

NENH. - Nenhum
 PEQ. - Pequeno
 REG. - Regular
 GR. - Grande
 s - Desvio-padrão

FIGURA 7. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO CRESCIMENTO DE EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA.

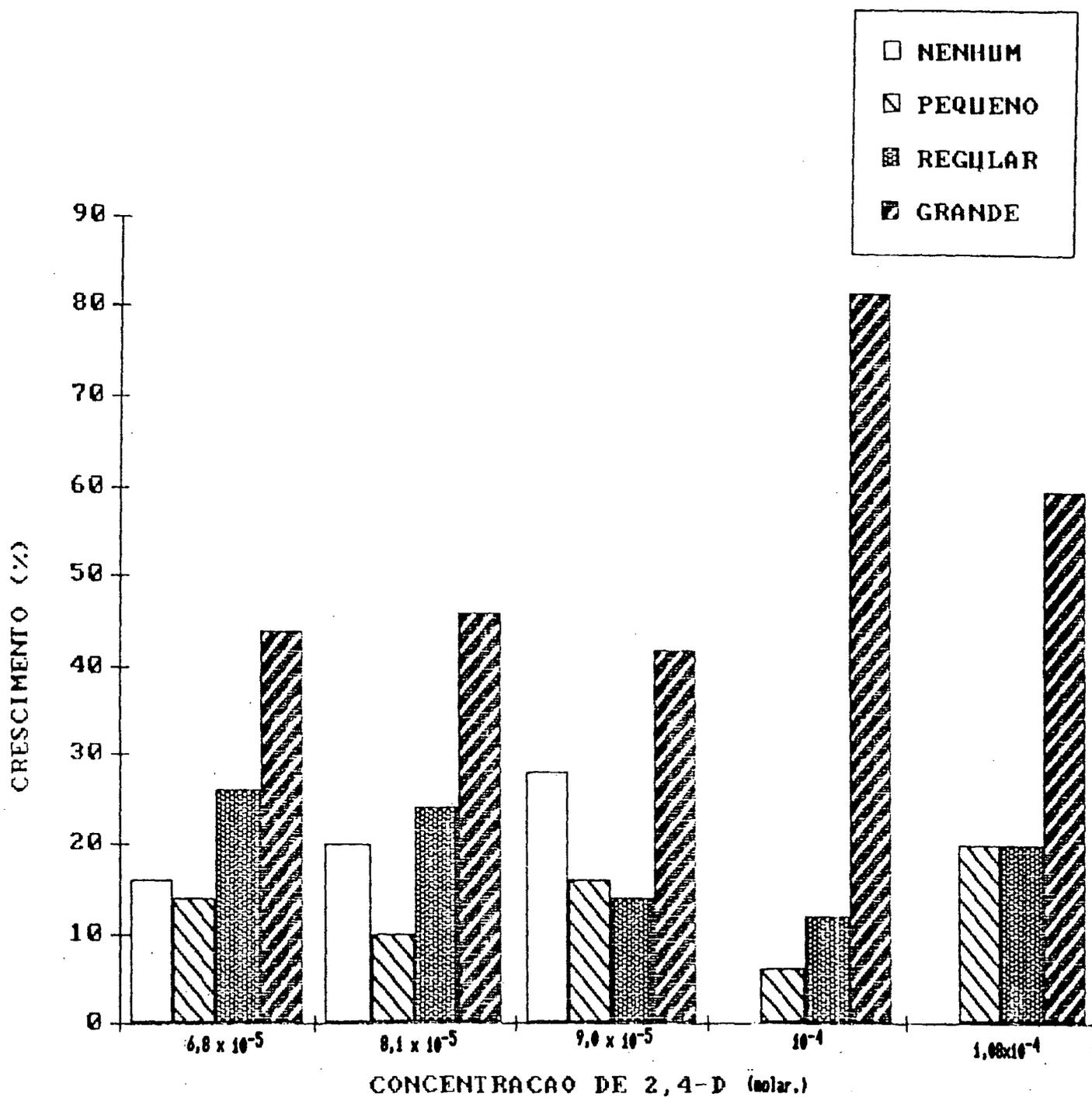
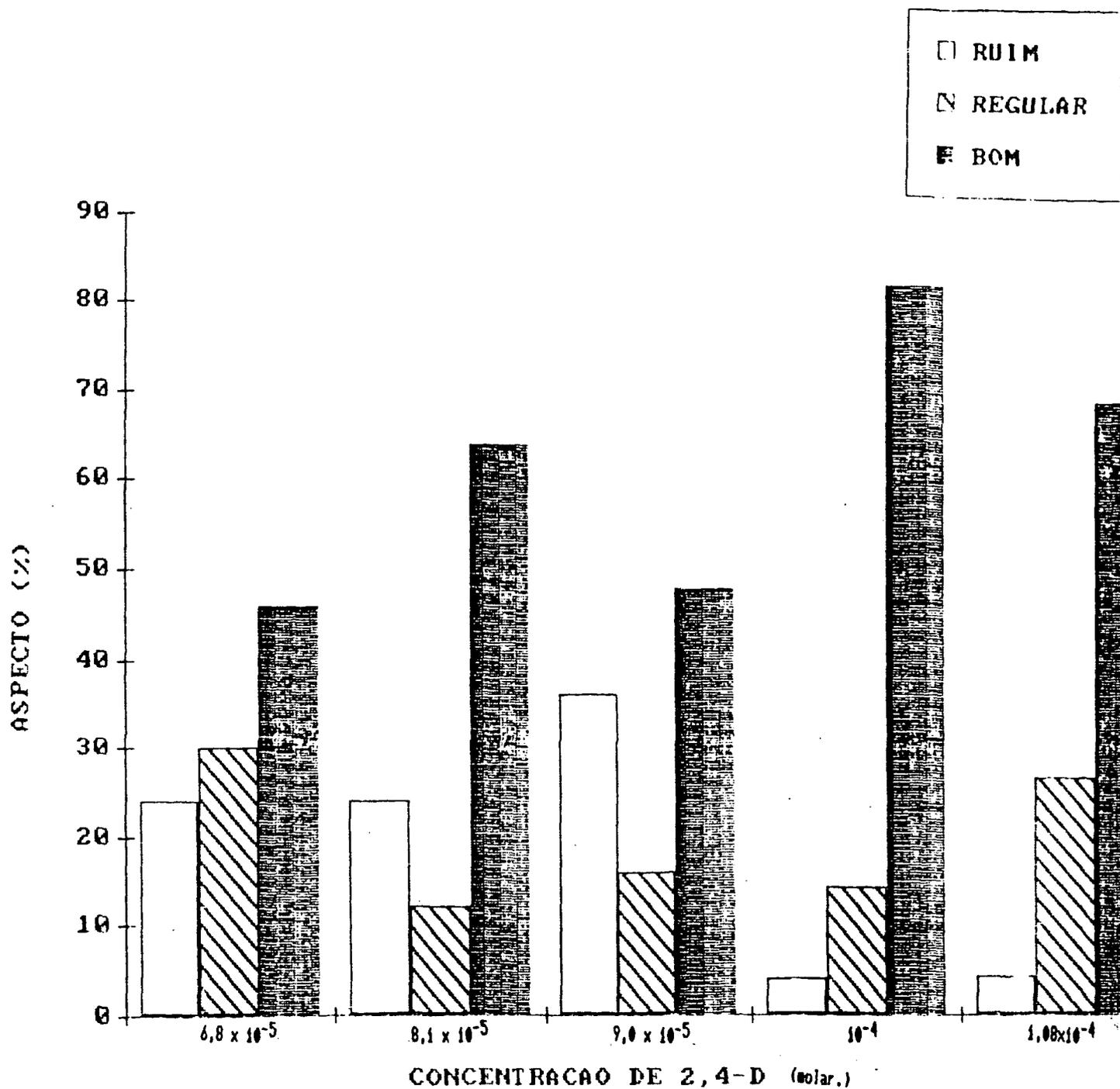


FIGURA 8. GRÁFICO REPRESENTATIVO DO ASPECTO DE EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA.



4.4. INDUÇÃO DE CALO - EXPERIMENTOS COM 2,4-D

4.4.1 Folha de Planta Jovem

Nos experimentos instalados, na primeira avaliação, aos 45 dias, em nenhum explante houve início de formação de calo, e o número de explantes viáveis já estava bem reduzido. Assim, não foi possível a coleta de dados de indução de calo neste tipo de material.

4.4.2 Folha de Planta Adulta

Uma percentagem razoável de explantes, de folha de planta adulta, apresentou o início da formação de calo, aos 45 dias de isolamento (TABELA 7). O processo tinha iniciado, em todos os explantes, aos 90 dias (FIGURA 9).

A diminuição drástica do número de repetições dificulta a interpretação dos dados. Pode-se observar casos de diminuição de valores, de uma avaliação mais adiantada, em relação a uma anterior, no mesmo tratamento; quando deveriam ser, no mínimo, iguais.

A concentração de $2,3 \times 10^{-4}$ / $1,1 \times 10^{-4}$ M foi a melhor, visto que foi a única superior tanto aos 45, como aos 60 dias.

TABELA 7. INDUÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA, APÓS 45, 60 E 90 DIAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTOS (molar.)	NÚMERO DE REPETIÇÕES			INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CALO NOS EXPLANTES					
	45 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	45 DIAS		60 DIAS		90 DIAS	
				%	s	%	s	%	s
11. $1,1 \times 10^{-4}$ / $5,6 \times 10^{-5}$	125	48	45	31,2 b	4,1	58,3 ab	7,1	100,0	-
12. $2,3 \times 10^{-4}$ / $1,1 \times 10^{-4}$	96	60	60	56,2 a	5,1	60,0 a	6,3	100,0	-
13. $3,4 \times 10^{-4}$ / $1,7 \times 10^{-4}$	103	60	60	66,0 a	4,7	41,7 b	6,4	100,0	-
14. $4,5 \times 10^{-4}$ / $2,3 \times 10^{-4}$	67	60	60	31,3 b	5,7	25,0 c	5,6	100,0	-

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão

FIGURA 9. INÍCIO DE FORMAÇÃO DE CALO EM EXPLANTE FOLHA DE PLANTA ADULTA



4.4.3 Inflorescência

A concentração ótima para induzir a iniciação de calo, em explantes de inflorescência, se situa numa faixa entre $2,3 \times 10^{-4}$ / $1,1 \times 10^{-4}$ M e $3,4 \times 10^{-4}$ / $1,7 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D (TABELA 8).

Ao contrário das outras fontes de explantes, neste caso, não ocorre a degeneração dos explantes e o processo de completa formação do calo se verifica (FIGURA 10).

Observa-se que todos os tratamentos induzem a iniciação de calo, tal como ocorrido em material de folha de planta adulta. Isso pode ocorrer devido à passagem pelo meio líquido, ou pela própria concentração do meio sólido.

4.5 INDUÇÃO DE CALO - EXPERIMENTOS COM CITOCININAS

Semelhante ao que ocorreu no experimento de indução de calo, utilizando 2,4-D, houve degeneração dos explantes provenientes de folha de planta jovem, impossibilitando a coleta dos dados correspondentes.

Para explantes provenientes de folha de planta adulta e inflorescência, não houve nenhuma diferença entre os tratamentos (TABELAS 9 e 10).

TABELA 8. INDUÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE INFLORESCENCIA, APÓS 45, 60 E 90 DIAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTOS (molar.)	NÚMERO DE REPETIÇÕES			INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CALO NOS EXPLANTES					
	45 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	45 DIAS		60 DIAS		90 DIAS	
2,4-D				%	s	%	s	%	s
11. $1,1 \times 10^{-4}$ / $5,6 \times 10^{-5}$	40	32	32	27,5 bc	7,1	100,0 a	-	100,0	-
12. $2,3 \times 10^{-4}$ / $1,1 \times 10^{-4}$	61	30	19	77,0 a	5,4	66,7 b	8,6	100,0	-
13. $3,4 \times 10^{-4}$ / $1,7 \times 10^{-4}$	21	21	21	9,5 c	6,4	100,0 a	-	100,0	-
14. $4,5 \times 10^{-4}$ / $2,3 \times 10^{-4}$	31	17	17	45,2 b	8,9	52,9 b	12,1	100,0	-

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão

FIGURA 10. CALO EM EXPLANTES DE INFLORESCÊNCIA.



FIGURA 11. CALO EMBRIOGÊNICO EM EXPLANTE DE INFLORESCÊNCIA.

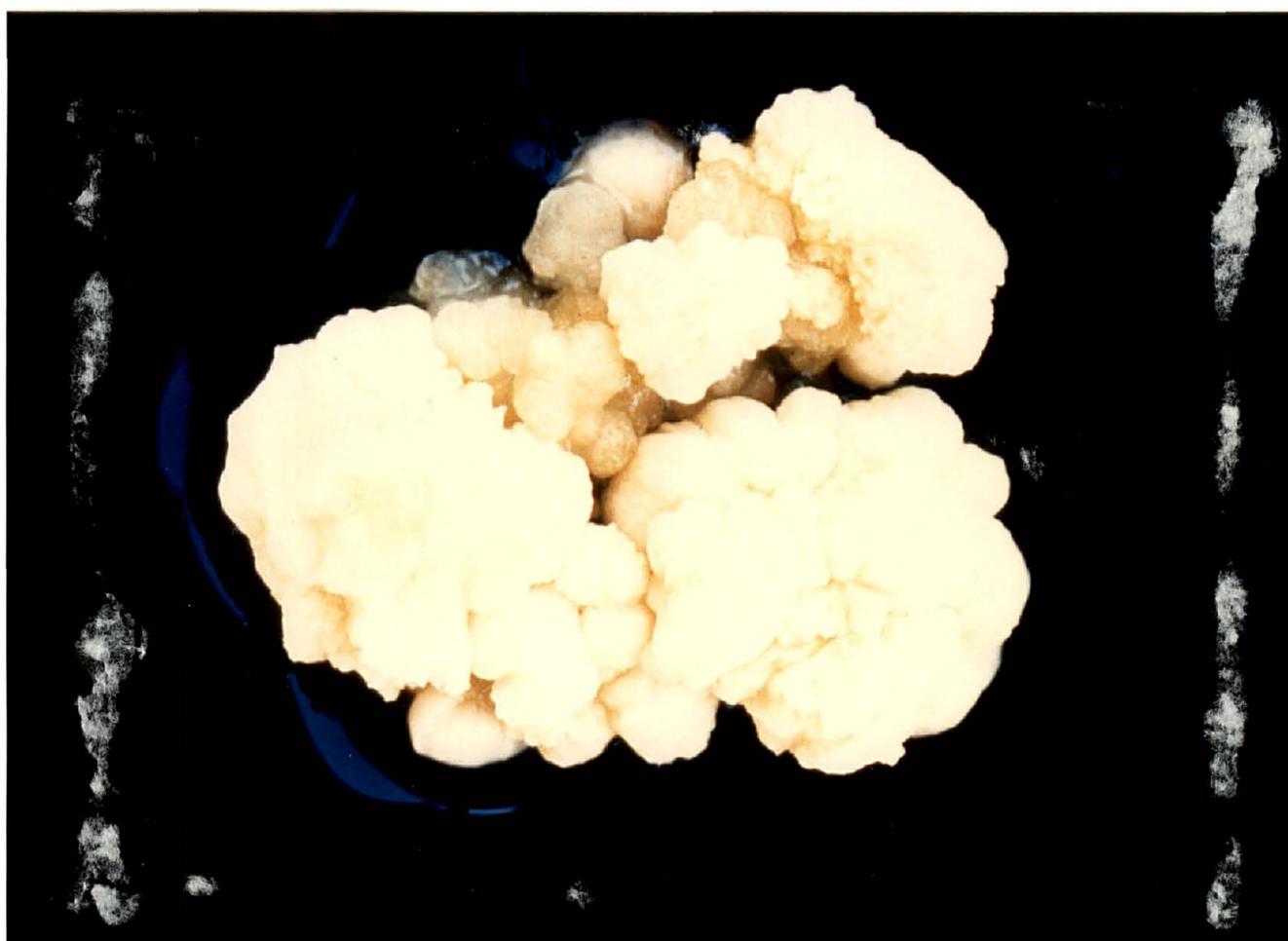


TABELA 9. INDUÇÃO DE CALO DE EXPLANTES DE FOLHA DE PLANTA ADULTA, UTILIZANDO CITOCININAS, APÓS 45 DIAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTOS (molar.)	REPETIÇÕES	INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CALO	
		Z	s
1. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$)	35	100,0 a	-
2. 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	40	92,5 a	4,2
3. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$) + 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	40	100,0 a	-
4. BAP ($13,3 \times 10^{-6}$)	45	95,6 a	3,0
5. 2ip ($14,8 \times 10^{-6}$)	40	95,0 a	3,4
6. BAP ($6,7 \times 10^{-6}$) + 2ip ($7,4 \times 10^{-6}$)	35	100,0 a	-
7. Testemunha	45	93,3 a	3,7

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão

TABELA 10. INDUÇÃO DE CALO EM EXPLANTES DE INFLORESCENCIA, UTILIZANDO CITOCININAS, APÓS 45 DIAS DE ISOLAMENTO.

TRATAMENTOS (molar.)	REPETIÇÕES	INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CALO	
		%	s
1. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$)	20	85,0 a	8,0
2. 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	25	96,5 a	3,9
3. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$) + 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	20	95,0 a	4,9
4. BAP ($13,3 \times 10^{-6}$)	20	90,0 a	6,7
5. 2ip ($14,8 \times 10^{-6}$)	25	96,0 a	3,9
6. BAP ($6,7 \times 10^{-6}$) + 2ip ($7,4 \times 10^{-6}$)	30	90,0 a	5,5
7. Testemunha	20	95,0 a	4,9

Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

s - Desvio-padrão

4.6 INDUÇÃO DA PARTE AÉREA

Os experimentos, dessa fase, foram repetidos quatro vezes, utilizando-se calos de material de inflorescência, visto que, em explantes de folha de planta jovem e adulta, a completa formação de calo não ocorreu.

Os explantes, do primeiro experimento foram incubados em condição de baixa intensidade luminosa. Todos explantes, após um mês do isolamento, apresentaram-se enegrecidos e inviáveis.

Na segunda tentativa, houve uma incubação inicial no escuro, por uma semana; após esse tempo, houve a transferência para uma baixa intensidade luminosa. Os explantes sofreram uma deterioração mais lenta. No segundo mês do isolamento, a maioria deles apresentou uma tonalidade clara. Após dois meses, houve uma degeneração de todo material.

Na terceira tentativa, houve uma permanência de 21 dias no escuro, antes da transferência para a luz. O resultado foi um pouco melhor que os anteriores. Alguns calos chegaram a ficar com uma tonalidade verde. Mas, também neste caso, todos os calos tornaram-se inviáveis.

Na quarta tentativa, permanência no escuro até o surgimento das brotações, antes da transferência para a luz, o resultado foi melhor que os anteriores. A grande maioria do material permaneceu com um bom aspecto. No terceiro mês da permanência nestas condições, houve diferenciação, apenas no tratamento onde não ha-

via regulador de crescimento FIGURAS(12 e 13).

Houve um desenvolvimento bem diferenciado dos calos. De um aspecto mais compacto e amarelado (FIGURA 10), até uma espécie de agregado de pequenas partes e friável, de cor branca (FIGURA 11). Diversos tipos de diferenciação foram obtidos (FIGURAS 12 e 13).

FIGURA 12. DIFERENCIAÇÃO DA PARTE AÉREA EM EXPLANTE DE INFLORESCÊNCIA.



FIGURA 13. OUTRO ASPECTO DA DIFERENCIAÇÃO DA PARTE AÉREA EM EX-
PLANTE DE INFLORESCÊNCIA.



5. DISCUSSÃO

Tal como ocorre com os explantes de inflorescência, aqueles provenientes de folhas, tanto de planta jovem, como de adulta, não apresentaram nenhum tipo de contaminação.

A imersão do palmito em hipoclorito de sódio (6%), por dez minutos, com a posterior eliminação das folhas mais velhas, foi suficiente para obtenção de explantes assépticos.

Ressalva-se que, quando da existência de bactérias endógenas, elas não são eliminadas pelos tratamentos de assepsia; estes restringem-se uma desinfestação externa.

Uma hipótese a ser testada, para evitar a contaminação por bactéria endógena, é a permanência em geladeira, por um, dois, três ou mais dias, do material fonte de explantes. Ele permanece totalmente viável, nestas circunstâncias, por dez dias.

Ao contrário da contaminação, a oxidação é um problema grave na cultura de tecidos do coqueiro. Nos primeiros sete dias de isolamento, no experimento de assepsia, não se detectou nenhum sintoma de oxidação. Entre a primeira e a segunda semana, teve início um amarelecimento do material, agravado entre a segunda e a terceira semana e, no final desta todos os explantes estavam oxidados. Ao final de 30 dias, todo o material estava morto.

A gravidade do processo é tão grande que, sem uma boa técnica antioxidante, fica impossível a cultura desses tecidos.

É interessante ressaltar a inexistência, na literatura, de qualquer registro de uma metodologia para se evitar o processo de oxidação, com excessão do trabalho de REYNOLDS & MURASHIGE³¹. A observação de PANNETIER & BUFFARD-MOREL²⁹, em 1986, de que problemas de oxidação haviam sido relatados nas primeiras culturas "in vitro", sem contudo dar detalhes de sua incidência, continua válida. Evidente que esse problema deve ter sido contornado pois, fases mais avançadas de pesquisas nesta área são registradas. O grande interesse comercial envolvido e a preocupação de obtenção de patentes nos avanços tecnológicos, como registra BLAKE⁶, pode ser uma explicação para o fato.

No experimento realizado com explantes de folha de planta jovem, contornou-se, de maneira significativa, em relação a testemunha, o processo de oxidação. Mas persistiu ainda uma taxa elevada, em torno de 50% de explantes oxidados.

A técnica antioxidante, mais adequada que se infere daquele experimento, é a que se segue: explantes prontos para o isolamento são imersos em soluções de ácido cítrico ($7,8 \times 10^{-4}$ M) ou de ácido ascórbico ($5,7 \times 10^{-4}$ M), por, no mínimo, 30 minutos, antes da colocação definitiva no meio de cultura.

É importante salientar que esses ácidos não são termoestáveis, e, portanto, não podem ser submetidos ao processo de autoclavagem. Suas soluções devem, então, ser esterilizadas por outros processos que não envolvam a utilização de calor; por exemplo, filtração por meio de miliporos.

Para se tentar baixar ainda mais a taxa de incidência de oxidação prosseguiram-se com os experimentos, com folha de planta adulta e inflorescência, para identificar uma técnica antioxidante. Testou-se a eficiência de um terceiro antioxidante, o PVP. Considerando que o processo de oxidação se deve, principalmente, a intoxicação dos tecidos por fenóis liberados por tecidos recém feridos, testou-se um segundo fator, que foi o meio líquido. A hipótese era que esses fenóis difundiriam-se no meio líquido, ao contrário de sua localização fixa, próxima aos explantes, no meio sólido.

As altas taxas de obtenção de explantes sadios mostraram que a permanência em meio líquido, por uma semana, antes do isolamento em meio sólido é altamente eficiente no controle deste processo.

As maiores taxas de crescimento de explantes de folha de planta jovem, ocorreram com as menores concentrações de 2,4-D, seguidas pelas de folha de planta adulta, e por fim pelas de inflorescência.

A necessidade de se identificar a correlação entre o crescimento dos tecidos, com a formação de calo, para se determinar qual a menor concentração, que no menor espaço de tempo, estimula a indução de calos embriogênicos, sem a desorganização do material genético; justificam o prosseguimento de experimentos de crescimento de explantes.

Nos experimentos instalados para indução de calos (com 2,4-D), em explantes de folha de planta jovem, em nenhum explante houve início de formação de calo, e o número de explantes viáveis estava muito reduzido aos 45 dias do isolamento. A causa desta redução não é o processo de oxidação, cujos sintomas aparecem logo na

segunda semana e aos 30 dias, todos os explantes que oxidam, morrem.

Neste caso, aos 30 dias de isolamento, os explantes que apresentavam um bom crescimento e aspecto continuavam a crescer até aos 45, 50 dias. A partir desse momento, começava um amarelecimento lento, e, aos 60 dias, o explante estava inviável. É como se existissem, no meio de cultura, todas as condições para um bom desenvolvimento inicial do explante e, a partir de certo momento, faltasse um fator importante.

Ao contrário dos explantes de folha de planta jovem, aqueles de planta adulta apresentaram início da formação de calo, aos 45 dias de isolamento. Aos 90 dias, todos os explantes estavam nesta situação. Apesar de ter ocorrido a iniciação, a completa formação de calo, nesse tipo de explante, não foi detectada. A causa foi a degeneração dos tecidos por um processo semelhante àquele que ocorreu em planta jovem, porém, em fase mais adiantada.

Em explantes de inflorescência, todos os tratamentos induziram a iniciação de calo, o que também ocorreu em material de folha de planta adulta. Isso pode ter ocorrido devido à passagem pelo meio líquido, ou pela própria concentração do meio sólido. O meio líquido, teóricamente, deve predispor mais fortemente o explante à formação de calo, pela maior concentração, como também pela melhor distribuição e penetração do 2,4-D nos tecidos.

Neste tipo de explante, verificou-se a completa formação de calo.

Também nesta fase, como naquela de crescimento dos explantes, os melhores resultados se dão com concentração mais elevada de 2,4-D que os exigidos por explantes de folha de planta adulta.

Nos experimentos de indução de calos, utilizando citocininas, o mesmo processo de degeneração, em explantes de folha de planta jovem, ocorreu neste caso, semelhante ao que se verificou nos experimentos com 2,4-D. Isso mostra que as citocininas BAP e 2ip não são os fatores exigidos para a completa formação de calo, neste tipo de material.

Para tecidos de folha de planta adulta e de inflorescência, houve um acréscimo no número de explantes que iniciaram a formação de calo e, aos 45 dias, praticamente, todos os explantes estavam nesta condição. Isso, provavelmente, se deve ao uso da concentração mais adequada do 2,4-D, identificada nos experimentos anteriores.

Não houve diferença entre as citocininas utilizadas, ou entre as concentrações do mesmo produto, nem entre os tratamentos e a testemunha. Isso mostra que apenas o 2,4-D, sem nenhum outro tipo de regulador de crescimento, é suficiente para produzir o início da formação de calos.

Na fase de indução da parte aérea ficou evidenciada a grande influência do fator luz na evolução dos calos e na organogênese. Houve diferenciação apenas na ausência de luz.

É longo o tempo de permanência dos explantes, no meio de cultura próprio, antes do início da diferenciação. Somente a partir do terceiro mês é que houve início do aparecimento da parte aérea e de raízes.

Até o final do quarto mês de cultura dos calos, apenas no meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento, houve diferenciação.

Simultaneamente à diferenciação da parte aérea, houve o aparecimento de raízes em porções do calo, não necessariamente conectadas com a parte aérea.

O interessante, a partir do calo embriogênico obtido, será o desenvolvimento de uma tecnologia de separação e cultivo de células individuais, que possibilitarão a obtenção de verdadeiros embriões somáticos. Quando do domínio dessa tecnologia, perspectivas interessantes se apresentarão, como a fusão de protoplastos, para hibridização somática; seleção de mutantes e engenharia genética.

6. CONCLUSÕES

1. O material proveniente de folha de planta jovem e adulta é asséptico. Necessita apenas de uma desinfestação externa para obtenção de explantes sem nenhum tipo de contaminação.

2. As fontes de explantes pesquisadas (folha de planta jovem e adulta e inflorescência) são altamente suscetíveis ao processo de oxidação. A cultura desses tecidos só é possível com o emprêgo de uma técnica antioxidante.

3. Os ácidos cítrico e ascórbico são eficientes no controle do processo de oxidação. Apesar disso, quando de sua utilização, ainda persiste uma incidência relativamente alta, em torno de 50%. A remoção, com a mudança de local, dos explantes, não diminui a taxa de oxidação; ao contrário, agrava o processo. O PVP não foi eficiente no controle da oxidação. O isolamento inicial em meio líquido, por uma semana, é altamente eficiente no controle de oxidação, proporcionando elevadas taxas de obtenção de explantes saudáveis. O comportamento de explantes de folha de planta adulta, em relação aos tratamentos antioxidantes, é idêntico ao de inflorescência.

4. As concentrações de $6,8 \times 10^{-5}$ M e $8,1 \times 10^{-5}$ M de 2,4-D provocaram as maiores taxas de crescimento e melhor aspecto, em explantes de folha de planta jovem. Para tecidos de folha de planta adulta, as maiores taxas de crescimento ocorreram nas concentrações de $8,1 \times 10^{-5}$ M e $9,0 \times 10^{-5}$ M de 2,4-D. Em relação ao aspecto, não houve diferença entre as concentrações de $6,8 \times 10^{-5}$ M; $8,1 \times 10^{-5}$ M e $1,08 \times 10^{-4}$ M. A maior taxa de crescimento, em tecido de inflorescência, se verificou na concentração de 10^{-4} M de 2,4-D. As de 10^{-4} M e $1,08 \times 10^{-4}$ M causaram os melhores aspectos.

5. A concentração de $1,1 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D, em meio sólido, com uma passagem anterior, de uma semana, em meio líquido, com $2,3 \times 10^{-4}$ M, foi a que induziu a formação de calo no maior número de explantes de tecido de folha de planta adulta. Com técnica semelhante à de folha de planta adulta, as concentrações entre $1,1 \times 10^{-4}$ M e $1,7 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D foram as que provocaram porcentagens maiores de iniciação de calo, em explantes de tecido de inflorescência. Não se detectou a completa formação de calo em explantes de folha de planta jovem e adulta. Em explantes de tecido de inflorescência, o processo de completa formação de calo se verificou. Não se detectou influência das citocininas BAP e 2ip, utilizadas com o 2,4-D, no processo de iniciação de calo.

6. A permanência dos calos de inflorescência no escuro, até a diferenciação da parte aérea, é a melhor condição de incubação para esta fase.

7. Houve diferenciação da parte aérea, em calos de inflorescência, no tratamento sem nenhum tipo de regulador de crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAMS, A. & THOMAS, K.J. A note on the 'in vitro' culture of excised coconut embryos. Indian Coconut Journal, 15:84-7, 1962.
2. ASSY BAH, B. 'In vitro' culture of coconut zygotic embryos. Oléagineux, 41:321-8, 1986.
3. APAVATJRUT, P. & BLAKE, J. Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). Oléagineux, 32:267-71, 1977.
4. ASCENSO, J.C. A agroindústria do coco no Brasil. Brasília, EMBRAPA/DTC, 1977. 31p.
5. BLAKE, J. & EEUWENS, C.J. Culture of coconut palm tissues with a view to vegetative propagation. In: RAO, A.N. Proceedings COSTED Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants. 1981. p. 145-8.
6. BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DODDS, J.H. Tissue culture of trees. London, Croom Helm, 1983. p. 29-50.
7. BONGA, J.M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Tissue culture in forestry. Boston, M. Ny hoff/Dr. W. Junk, 1985. p. 4-35.

8. BRANTON, R.L. & BLAKE, J. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. Annals of Botany, 52(5):673-8, 1983.
9. CUTTER, V.M. & WILSON, K.S. Effect of coconut endosperm and other growth stimulants, upon the development "in vitro" of embryos of *Cocos nucifera*. Botanical Gazette; 115:234-40, 1954.
10. DAVIS, T.A. Rejuvenation of coconut palms. World Crops, 14(8):256-83, 1962.
11. DAVIS, T.A. Clonal propagation of the coconut. World Crops, 21 (set./out.): 253-5, 1969.
12. DE GUZMAN, E.V. The growth and development of coconut "Macapuno" embryo "in vitro". The induction of rooting. Philippine Agriculturist, 53:65-78, 1971.
13. DEL ROSARIO, A.G. & DE GUZMAN, E.V. The status of plant tissue culture in the Phillipines. In: RAO, A.N. Proceedings of COSTED symposium on tissue culture of economically important plants. 1981. p. 293-4.
14. DIAS, B.C. Subsídios ao grupo de trabalho para elaboração de diretrizes da política nacional de coco (Cocos nucifera L.). Maceió, CEPLAC, 1980. 15 p.
15. EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured "in vitro". Physiologia Plantarum, 36: 23-8, 1976.

16. EEUWENS, C.J. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera* L.) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured "in vitro". Physiologia Plantarum, 42: 73-8, 1978.
17. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Coco, Aracaju, SE. Programa nacional de pesquisa de coco. Aracaju, 1987. 21 p.
18. ENCICLOPÉDIA Mirador Internacional. São Paulo, Melhoramentos, 1976. p. 2870-1.
19. FAO, Roma, Itália. World Annual Production, 1987. Roma, 1987.
20. FISHER, J.B. & TSAI, J.H. "In vitro" growth of embryos and callus of coconut palm. "In vitro", 14(3): 307-11, 1978.
21. FRÉMOND, Y.; ZILLER, R. & NUCÉ DE LAMOTHE, M. Le cocotier. Barcelona, Blume, 1969. 239 p.
22. GONÇALVES, A.N. Reversão a juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*, S.L. Blake "in vitro". Piracicaba, ESALQ, 1982. 97 p. Tese de Doutorado.
23. GUPTA, P.K., KENDURKAR, S.V., KULKARNI, V.M., SHIGURKAR, M.V. & MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) "in vitro". Plant Cell Report, 3: 222-5, 1984.
24. HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivées "in vitro". Annales des Sciences Naturelles. Botanique et Biologie Végétale, 14: 1-223, 1953.

25. IYER, R.D. Embryo and tissue culture for crop improvement, especially of perennials, germplasm conservation and exchange - relevance to developing countries. In: RAO, A.N. Proceedings COSTED Symposium on tissue culture of economically important plants. Singapura, 1981. p. 219-30.
26. KARUNARATNE, S.; KURUKULARACHCHI, C. & GAMAGE, C. The culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var. *nana* 'in vitro'. Cocos, 3: 1-8, 1985.
27. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 4797, 1962.
28. PANNETIER, C. & BUFFARD-MOREL, J. First results for somatic embryo production from leaf tissue of coconut (*Cocos nucifera* L.). Diéagineux, 37: 349-54, 1982.
29. Pannetier, C. & BUFFARD-MOREL, J. Coconut palm (*Cocos nucifera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin, Springer Verlag, 1986. p. 430-58.
30. PURSEGLOVE, J.W. Tropical crops monocotyledons. London, Longman, 1972. 607 p.
31. REYNOLDS, J.F. & MURASHIGE, T. Assexual embryogenesis in callus of palms. In vitro, 5: 383-387, 1979.
32. SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica. São Paulo, McGraw-Hill, 1975. 350p.
33. SIQUEIRA, E.R. & FRANÇA-DANTAS, M.S. Melhoramento genético do coqueiro. Aracaju, EMBRAPA - UEPAE Aracaju, 1984. 19 p. (EMBRAPA - UEPAE Aracaju. Documentos 2).

34. SUDARISP, H.; KAAT, H. & DAVIS, T.A. Clonal propagation of the coconut via bulbis. Philippine Journal of Coconut Studies, 3 (3): 5-14, 1978.
35. VENTURA, F.; ZUNIGA, L.C. & FIGUERA, J.E. A progress report on the development of coconut embryo in artificial media. Philippine Journal of Plant Industry, 31: 81-7, 1966.
36. WHITE, P.R. A handbook of plant tissue culture. Lancaster, J. J. Cattel, 1943.