

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DO COQUEIRO ATRAVÉS DA CULTURA DE TECIDOS¹

EDMAR RAMOS DE SIQUEIRA² e MÁRIO TAKAO INOUE³

RESUMO - Objetivou-se desenvolver método para a propagação vegetativa do coqueiro por meio da cultura de tecidos. Foram utilizadas as folhas de plantas jovens e adultas e a inflorescência, como fontes de explantes. Para a indução de calo, foram testadas, ainda, concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2-isopentenil adenina (2ip), separadamente e em conjunto, além do ácido (2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D). Na indução de brotações, foram utilizadas dosagens progressivas de BAP. 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 ($2,3 \times 10^{-4}$ M), induziu início de formação de calo, no maior número de explantes de tecido de folha da planta adulta. Para a 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 e diferenciação da parte aérea em explantes de inflorescências.

Termos para indexação: *Cocos nucifera*, folha de plantas jovens, folha de plantas adultas, inflorescência, propagação clonal, calo.

VEGETATIVE PROPAGATION OF COCONUT PALM THROUGH *IN VITRO* CULTURE TECHNIQUE

ABSTRACT - The purpose of this study was to develop a method for vegetative propagation of coconut palm through tissue culture. Young and adult plant leaves and inflorescence were used as explant sources. For the callus induction different concentrations of 6-benzilaminopurine (BAP), 2-isopentyl adenine (2ip) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were used. For the shoot induction progressive dosages of BAP were used. Callus was induced on most of the leaf tissues of adult plant by culturing on solid medium (1.1×10^{-4} M 2,4-D), following one week of culture in liquid medium (2.3×10^{-4} M 2,4-D). For inflorescence the best results were obtained with concentrations between 1.1×10^{-4} and 1.7×10^{-4} M in solid medium. Complete callus formation and shoot differentiation was observed on inflorescence explants.

Index terms: *Cocos nucifera*, young plant leaves, adult plant leaves, inflorescence, clonal propagation, tissue culture, callus.

INTRODUÇÃO

Devido às suas características morfológicas, o coqueiro não tem sido propagado vegetativamente, apesar de as ramificações ocorrerem, de

forma natural e esporadicamente, pela transformação de inflorescências, ramos florais e mesmo flores, em brotações vegetativas (Davis 1962 e 1969). Apesar de tentativas bem sucedidas no enraizamento desses lançamentos (Sudarisp et al. 1978), o problema de reversão do meristema floral para o vegetativo permanece sem solução. Apesar de o alporque se realizar com êxito e proporcionar o rejuvenescimento de coqueiros particularmente valiosos, ela não leva à sua multiplicação (Pannetier & Buffard-Morel 1986). O desenvolvimento de diversos lançamentos foi obtido pela divisão do

¹ Aceito para publicação em 4 de outubro de 1991.

² Eng. - Florestal, Dr., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Coco (CNPCo), Caixa Postal 44, CEP 49001 Aracaju, SE.

³ Eng. - Florestal, Dr., Prof. - Titular, Univ. Fed. do Paraná (UFPR), Bolsista do CNPq, Caixa Postal 2.959, CEP 80000 Curitiba, PR.

ponto de crescimento de mudas jovens (Davis 1969); contudo, o resultado desses experimentos não pode ser usado para a propagação de plantas superiores.

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 propagar indivíduos resistentes a certas doenças ou dotados de uma particular capacidade de adaptação a condições adversas de ambiente (Pannetier & Buffard-Morel 1986).

A abordagem principal que vem sendo utilizada, na tentativa de propagação vegetativa do coqueiro, é a que envolve a produção de calos, tentando a neoformação de gemas ou embriões somáticos de fragmentos de caules, folhas, raízes e inflorescências (Pannetier & Buffard-Morel 1986).

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 conseqüências (Pannetier & Buffard-Morel 1986). A gravidade do processo de oxidação 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 um método eficiente para se evitar o processo de oxidação. É evidente que este problema deve ter sido contornado, pois são registradas fases mais avançadas de pesquisas nesta área. O grande interesse comercial envolvido e a preocupação de obter patentes nos avanços tecnológicos pode ser uma explicação para o fato. Siqueira (1988) verificou que o isolamento inicial em meio líquido, por uma semana, é altamente eficiente no controle de oxidação, por proporcionar elevadas taxas de obtenção de explantes saudáveis.

Eeuwens (1978) estudou a influência do meio mineral em explantes provenientes de ra-

mos florais, estirpe 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 & Skoog (1962) (MS), Heller (1953) e White (1943). 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 e caseína hidrolisada), carboidratos, auxinas, citocininas e giberelinas. Os resultados mostraram que os reguladores de crescimento, tais como os ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e naftaleno acético (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, a 6-benzilaminopurina (BAP) e a zeatina encontram-se entre as mais eficientes (Eeuwens 1978). Além do crescimento dos explantes, diferentes tipos de proliferações foram obtidos. Divisões celulares, que levaram à formação de calo na superfície, ocorreram na parte superior de explantes de caule, folhas e inflorescência (Eeuwens 1976). Contudo, o incremento no peso fresco dos explantes resultou principalmente do crescimento do tecido original (Eeuwens 1978).

Calos obtidos de explantes de tecido do meristema apical (Apavatjrut & Blake 1977) e da ráquis (Eeuwens 1976 e 1978) 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 (Blake 1983).

Branton & Blake (1983), utilizando explantes de inflorescências jovens, obtiveram a iniciação de calóides (calos originados pela ex-

pansão 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 embriões. 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.

Passos importantes e decisivos, registrados na literatura, para o avanço na cultura de tecidos de coqueiro foram o ajuste dos componentes do meio de cultura (Eeuwens 1976 e 1978), a determinação da necessidade de altas concentrações de 2,4-D para que houvesse formação de calos, e, em seguida, a utilização de carvão ativado para viabilizar a subcultura desses calos (Blake 1983).

Permanecem sem solução as fases de diferenciação, pelo menos em relação a resultados publicados. As formações embriogênicas neoformadas, obtidas em calos, conduzem a uma embriogênese somática incompleta.

A pesquisa foi realizada considerando a grande importância sócio-econômica da cultura do coco para o Brasil, seu potencial de exportação e a necessidade de produção de material genético melhorado, no mais curto espaço de tempo. Desse modo, os principais objetivos foram: a) desenvolver um meio de cultura para a propagação *in vitro*, via formação de calo, por meio de investigação com reguladores de crescimento; e b) avaliar diferentes fontes de explantes: folhas (de plantas jovens e adultas) e inflorescência, e seu comportamento nas diversas etapas do processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas plantas jovens e adultas da variedade Anão Verde. O material vegetal da planta adulta foi enviado do Centro Nacional de Pesquisa de Coco, localizado em Aracaju, SE. O material jovem foi obtido de mudas de

seis meses de idade, produzidas no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, em Colombo, PR, onde foi realizado o trabalho, conforme recomendações técnicas (EMBRAPA 1986).

Os explantes provenientes de plantas jovens e adultas (25 anos) foram obtidos das folhas mais jovens, possíveis de se obter sem causar dano à gema apical, conforme Eeuwens (1976 e 1978). As inflorescências jovens foram lavadas, externamente, com hipoclorito de sódio (6% v/v). Após a remoção das espátulas 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. O meio básico utilizado foi constituído dos macroelementos de Murashige & Skoog (1962) e dos microelementos de Eeuwens (1976), e acrescido dos componentes orgânicos e carvão ativado (0,25%), conforme Branton & Blake (1983). A esterilização foi feita em autoclave a 121°C , por dez minutos. O pH do meio foi ajustado em 5,8, antes da esterilização.

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). Cada tratamento consistiu de 30 repetições. 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 constituído dos componentes básicos, acrescidos de $2,3 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D, $6,7 \times 10^{-6}$ M do BAP e $7,4 \times 10^{-6}$ M de Zip e inoculados a 30°C , no escuro. A contaminação foi avaliada após duas semanas de cultivo.

Indução de calo

Para induzir calos, foram utilizados dois tipos de experimentos. O primeiro consistiu da inoculação 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 ($4,4 \times 10^{-4}$ M) e Zip ($4,9 \times 10^{-6}$ 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 da inoculação inicial em meio líquido, com $2,3 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D. Após uma semana de cultivo, os explantes foram transferidos para meio sólido, com a concentração de $1,1 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D e variáveis de Zip ($4,9 \times 10^{-6}$ 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).

A variável analisada foi a 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 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por períodos de 45, 60 e 90 dias, quando foram avaliadas.

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 com 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 $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Cada tratamento consistiu de 30 repetições, e a variável utilizada foi a presença de brotações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos conduzidos para avaliar tratamentos de assepsia da folha, de material proveniente de folha de plantas jovens e adultas, detectou-se que não houve nenhum tipo de contaminação nos diversos tratamentos, inclusive na testemunha.

Indução de calo - experimentos com 2,4-D

Nos experimentos, na primeira avaliação, aos 45 dias, em nenhum explante de folha de planta jovem 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.

Uma percentagem razoável de explantes, de folha da planta adulta, apresentou o início de formação de calo, aos 45 dias de isolamento (Tabela 1). O processo tinha iniciado, em todos os explantes, aos 90 dias. 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.

A concentração ótima para induzir a iniciação de calo, em explantes de inflorescência,

se situou numa faixa entre $1,1 \times 10^{-4}/5,6 \times 10^{-5}$ M e $2,3 \times 10^{-4}/1,1 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D (Tabela 2). Ao contrário das outras fontes de explantes, neste caso não ocorreu a degeneração dos explantes, e o processo de completa formação do calo se verificou.

Observou-se que todos os tratamentos induziram a iniciação de calo, tal como ocorrido em material de folha adulta. Isso pode ter ocorrido devido à passagem pelo meio líquido, ou pela própria concentração do 2,4-D no meio sólido.

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 da planta jovem, impossibilitando a coleta de dados correspondentes. Para explantes provenientes de folha da planta adulta e inflorescência, não houve nenhuma diferença entre os tratamentos (Tabelas 3 e 4).

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 plantas jovens e adultas, a completa formação de calo não foi observada.

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

Na segunda tentativa, houve uma incubação inicial no escuro durante uma semana. Após esse tempo, houve a transferência para uma baixa intensidade luminosa. Os explantes sofreram enegrecimento mais lento. No segundo mês do isolamento, a maioria deles apresentou uma tonalidade clara. Após dois meses, houve uma degeneração de todo o 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 morreram.

TABELA 1. Indução de calo em explantes de folha da planta adulta, após 45, 60 e 90 dias de cultivo.

Tratamentos (molar.) 2,4-D	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
1. $1,1 \times 10^{-4}$ $5,6 \times 10^{-5}$	125	48	45	31,2b	4,1	58,3ab	7,1	100,0	-
2. $2,3 \times 10^{-4}$ $1,1 \times 10^{-4}$	96	60	60	56,2a	5,1	60,0a	6,3	100,0	-
3. $3,4 \times 10^{-4}$ $1,7 \times 10^{-4}$	103	60	60	66,0a	4,7	41,7b	6,4	100,0	-
4. $4,5 \times 10^{-4}$ $2,3 \times 10^{-4}$	67	60	60	31,3b	5,7	25,0c	5,6	100,0	-

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

s - Desvio-padrão.

TABELA 2. Indução de calo em explantes de inflorescência, após 45, 60 e 90 dias de cultivo.

Tratamentos (molar.) 2,4-D	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
1. $1,1 \times 10^{-4}$ $5,6 \times 10^{-5}$	40	32	32	27,5bc	7,1	100,0a	-	100,0	-
2. $2,3 \times 10^{-4}$ $1,1 \times 10^{-4}$	61	30	19	77,0a	5,4	66,7b	8,6	100,0	-
3. $3,4 \times 10^{-4}$ $1,7 \times 10^{-4}$	21	21	21	9,5c	6,4	100,0a	-	100,0	-
4. $4,5 \times 10^{-4}$ $2,3 \times 10^{-4}$	31	17	17	45,2b	8,9	52,9b	12,1	100,0	-

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

s - Desvio-padrão.

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 de permanência nestas condições, houve diferenciação apenas no tratamento onde não havia regulador de crescimento. Houve desenvolvimento bem diferenciado dos calos: De um aspecto mais compacto e amarelado, até uma

espécie de agregado de pequenas partes e friável, de cor branca.

Nos experimentos instalados para a indução de calos (com 2,4-D), em explantes de folha da 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 ex-

TABELA 3. Indução de calo de explantes de folha da planta adulta, utilizando citocininas, após 45 dias de cultivo.

Tratamentos (molar.)	Repe- tições	Início da formação de calo	
		%	s
1. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$)	35	100,0a	-
2. 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	40	92,5a	4,2
3. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$) + 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	40	100,0a	-
4. BAP ($13,3 \times 10^{-6}$)	45	95,6a	3,0
5. 2ip ($14,8 \times 10^{-6}$)	40	95,0a	3,4
6. BAP ($6,7 \times 10^{-6}$) + 2ip ($7,4 \times 10^{-6}$)	35	100,0a	-
7. Sem citocininas	45	93,3a	3,7

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

s - Desvio-padrão.

Todos os tratamentos contêm $1,1 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D, em meio sólido, com uma passagem anterior em meio líquido, com $2,3 \times 10^{-4}$ M.

TABELA 4. Indução de calo em explantes de inflorescência, utilizando citocininas, após 45 dias de isolamento.

Tratamentos (molar.)	Repe- tições	Início da formação de calo	
		%	s
1. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$)	20	85,0a	8,0
2. 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	25	96,5a	3,9
3. BAP ($4,4 \times 10^{-6}$) + 2ip ($4,9 \times 10^{-6}$)	20	95,0a	4,9
4. BAP ($13,3 \times 10^{-6}$)	20	90,0a	6,7
5. 2ip ($14,8 \times 10^{-6}$)	25	96,0a	3,9
6. BAP ($6,7 \times 10^{-6}$) + 2ip ($7,4 \times 10^{-6}$)	30	90,0a	5,5
7. Sem citocininas	20	95,0a	4,9

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

s - Desvio-padrão.

plantas que oxidaram morreram. Neste caso, aos 30 dias de isolamento, os explantes que

apresentavam um bom crescimento e aspecto continuavam a crescer até os 45 ou 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 da planta jovem, os da planta adulta apresentaram início de formação de calo, aos 45 dias de isolamento. Aos 90 dias, todos os explantes estavam nesta situação. Apesar de ter ocorrido a iniciação, a formação de calo, neste tipo de explante, não foi detectada. A causa foi a degeneração dos tecidos por um processo semelhante ao 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 da planta adulta. Isso pode ter ocorrido devido à passagem pelo meio líquido, ou pela própria concentração do 2,4-D no meio sólido. O meio líquido 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, os melhores resultados se dão com concentração mais elevada de 2,4-D que os exigidos por explantes de folha da planta adulta.

Nos experimentos de indução de calos utilizando citocininas, o mesmo processo de degeneração, em explantes de folha da planta jovem, ocorreu neste caso, de modo semelhante ao que se verificou nos experimentos com 2,4-D. Isso mostra que as citocininas BAP e 2ip, nas concentrações usadas, não são os fatores exigidos para a completa formação de calo, neste tipo de material. Para tecidos de folha da planta adulta e de inflorescência, houve um acréscimo do número de explantes que iniciaram a formação de calos, 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 experimen-

tos 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 tipo de regulador de crescimento, é suficiente para produzir o início de 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 das raízes. Até o final do quarto mês de cultura de calos, houve diferenciação apenas no meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento. 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.

CONCLUSÕES

1. O material proveniente de folha de plantas jovens e adultas é asséptico. Necessita apenas de uma desinfestação externa, para a obtenção de explantes sem nenhum tipo de contaminação.

2. 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 o que induziu à formação de calo no maior número de explantes de tecido de folha da planta adulta. Com técnica semelhante à de folha da planta adulta, as concentrações entre $5,6 \times 10^{-5}$ M e $1,1 \times 10^{-4}$ M de 2,4-D foram as que provocaram percentagens maiores de iniciação de calo, em explantes de tecido de inflorescência. Não se detectou a completa formação de calo em explantes de folha de plantas jovens e adultas. O

processo de completa formação de calo se verificou em explantes de tecido de inflorescência. Não se detectou influência das citocininas BAP e 2ip, utilizadas com 2,4-D, no processo de iniciação de calo.

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

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

REFERÊNCIAS

- APAVATJRUT, P.; BLAKE, J. Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Oléagineux*, v.32, n.6, p.267-271, 1977.
- 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.
- BRANTON, R.L.; BLAKE, J. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany*, v.52, n.5, p.673-678, 1983.
- DAVIS, T.A. Clonal propagation of coconut. *World Crops*, v.21, p.253-255, 1969.
- DAVIS, T.A. Rejuvenation of coconut palms. *World Crops*, v.14, n.8, p.256-283, 1962.
- 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*, v.42, p.73-78, 1978.
- 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*, v.36, p.23-28, 1976.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Coco (Aracaju). *Produção de mudas de coqueiro*. Aracaju: EMBRAPA-CNPCo, 1986. 16p. (EMBRAPA-CNPCo. Circular Técnica, 2).
- HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivées *in vitro*. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique et Biologie Vegetale*, v.14, p.1-223, 1953.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- 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.430-458.
- SIQUEIRA, E.R. *Perspectivas de propagação vegetativa do coqueiro por meio de cultura de tecidos*. Curitiba: UFPR, 1988. 65p. Tese de Doutorado.
- SUDARISP, H.; KAAT, H.; DAVIS, T.A. Clonal propagation of coconut via bulbis. *Philippine Journal of Coconut Studies*, v.3, n.3, p.5-14, 1978.
- WHITE, P.R. *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster: J.J. CATTEL, 1943.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- 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.430-458.
- SIQUEIRA, E.R. *Perspectivas de propagação vegetativa do coqueiro por meio de cultura de tecidos*. Curitiba: UFPR, 1988. 65p. Tese de Doutorado.
- SUDARISP, H.; KAAT, H.; DAVIS, T.A. Clonal propagation of coconut via bulbis. *Philippine Journal of Coconut Studies*, v.3, n.3, p.5-14, 1978.
- WHITE, P.R. *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster: J.J. CATTEL, 1943.