

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE
***Cocos nucífera* L.**

VANDA DOS SANTOS SILVA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Maio – 2002

**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE
Cocos nucífera L.**

VANDA DOS SANTOS SILVA
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. **LUIZ ANTONIO GALLO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Maio – 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Vanda dos Santos
Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L. / Vanda dos Santos Silva. - - Piracicaba, 2002.
78 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Coco 2. Melhoramento genético vegetal 3. Propagação vegetal 4. Regeneração "in vitro" I. Título

CDD 634.61

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus filhos, Daniel, Máira e João Carlos, que colaboraram com compreensão, amor e carinho nesta jornada.

OFEREÇO

Ao meu marido João Florêncio e a minha mãe Aparecida, que sempre estiveram ao meu lado dando apoio e acreditando em mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Antonio e Heloisa pelo incentivo e compreensão.

Aos meus sobrinhos Victor e Lucas, pelo carinho e amizade.

À minha irmã Vilma e ao meu cunhado José Antonio pelo carinho e dedicação.

Ao Prof. Dr. Luiz António Gallo pela orientação, disponibilidade, e a oportunidade de realização do curso.

Ao colega Enio Tiago pela amizade, colaboração, atenção e sugestões durante este trabalho.

À Maria Solizete Granzio Silva pelo auxílio e dedicação.

À Cássia Regina Figueiredo pela amizade e colaboração.

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pelo incentivo e ensinamentos na realização deste trabalho.

Ao Romeu pelo espírito de equipe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia Sabino pela atenção e revisão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
1 LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Histórico.....	4
2.2 Ecofisiologia do coqueiro.....	5
2.3 Morfologia do coqueiro.....	6
2.4 Sistema reprodutivo.....	9
2.5 Propagação.....	11
2.6 Pragas e doenças	12
2.6.1 Pragas.....	12
2.6.2 Doenças	13
2.7 Importância econômica.....	18
2.8 Importância medicinal.....	22
2.9 Cultura de Tecidos.....	23
2.9.1 Embriogênese zigótica	24
2.9.2 Embriogênese somática.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33

3.1	Regeneração de Embriões	33
3.1.1	Desinfestação de embriões	33
3.1.2	Meios de cultura	34
3.1.2.1	Germinação e desenvolvimento dos embriões	36
3.1.3	Avaliação dos resultado	40
4	RESULTADO E DISCUSSÕES.....	41
4.1	Regeneração de embriões	41
4.1.1	Influência dos componentes dos meios de cultura.....	43
4.1.2	Utilização de reguladores vegetais	47
5	CONCLUSÕES.....	56
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	58

LISTA DE FIGURAS

1	Corte longitudinal do Coco	6
2	Inflorescência de <i>Cocos nucifera</i> anão	9
3	Aspecto da planta desenvolvida <i>in vitro</i> cultivada em meio nutritivo Y ₃ (2).....	41
4	Embriões com 90 dias de cultivo em meio de cultura com reguladores vegetais	42
5	Porcentagem de embriões germinados aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo	44
6	Avaliação através de observações visuais do efeito do meio de cultura no desenvolvimento dos embriões zigóticos.....	44
7	Germinação de embrião em meio nutritivo. A: MS + 8 mg.L ⁻¹ de BAP + 4 mg.L ⁻¹ de GA. B: MS + 8 mg.L ⁻¹ de BAP + 6 mg.L ⁻¹ de GA. 1: início do desenvolvimento da parte aérea. 2: Primórdios radiculares – 60 dias de cultivo.....	49
8	Germinação do embrião de coqueiro em meio nutritivo MS + 2 mg.L ⁻¹ de BAP + 8 mg.L ⁻¹ de GA – 60 dias de cultivo	49
9	Efeito do GA e do BAP e sua relação na regeneração de embriões.	50
10	Efeito da adição de caseína hidrolisada ao meio de cultura MS.	51
11	Embriões em meio nutritivo MS + 100 mg.L ⁻¹ de caseína hidrolisada aos 45 dias de cultivo.....	51
12	Embriões em meio nutritivo MS + 300 mg.L ⁻¹ de caseína hidrolisada – 45 dias de cultivo.....	51

13	Efeito do AIA e do BAP e sua relação na regeneração de embriões.....	53
14	Plântulas com 125 dias e 12 cm, desenvolvidas em meio nutritivo MS na presença de carvão ativo	54
15	Embrião de coqueiro com 90 dias em MS + 3 mg.L ⁻¹ de BAP.....	54
16	Embrião aos 60 dias em MS+2 mg.L ⁻¹ de AIA+3 mg.L ⁻¹ de BAP..	55

LISTA DE TABELAS

1	Características das variedades do coqueiro	8
2	Concentrações de macromelementos nos tratamentos Y3(1), Y3(2) e MS	35
3	Concentrações de microelementos e Fe-EDTA nos tratamentos Y3(1), Y3(2) e MS.....	35
4	Concentrações de vitaminas e aminoácidos nos tratamentos Y3(1), Y3(2) e MS.....	37
5	Concentrações de Sacarose e Phytigel nos tratamentos Y3(1), Y3(2) e MS.....	37
6	Concentração de regulador de vegetal nos tratamentos Y3(1), Y3(2) e MS.....	38
7	Tratamentos com concentrações crescentes GA e BAP. (mg.L ⁻¹).....	38
8	Tratamento com concentrações crescentes de caseína hidrolisada (mg.L ⁻¹).....	39
9	Tratamentos com concentrações crescentes de AIA e BAP (mg.L ⁻¹)	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2/4-D	ácido 2,4 diclorofenoxiacético
ABA	ácido abscísico
ANA	ácido naftaleno acético
AIB (IBA)	ácido indol butírico
BAP	benzil amino purina
C	Carbono
cm	centímetro
grama	g
GA	Giberelina
Kg	kilograma
L	litro
m	metro
mg	miligrama
mm	milímetro
MS	meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962)
°C	graus Celsius
Y ₃	meio de cultura Y ₃ (Eeuwens 1976)
EDTA	etilenodiamino tetraacetato

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE *Cocos nucifera* L.

Autora: Vanda dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo

RESUMO

O setor de produção de coco é atingido por vários problemas que afetam sua produtividade especialmente o uso difundido de plantas sem seleção devido a características intrínsecas da cultura que dificultam a seleção de cultivares com características superiores. O uso eficiente dos recursos genéticos do coco tem encontrado dificuldades na coleta e troca de germoplasma. A cultura de tecidos tem por finalidade viabilizar a troca segura de germoplasma e facilitar o desenvolvimento de variedades produtivas em um programa de melhoramento genético, porém a regeneração de plantas através de técnicas *in vitro* tem apresentado dificuldades adicionais no estabelecimento de protocolos viáveis.

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo viável para a regeneração de embriões zigóticos para ser utilizado em programas de melhoramento genético e para o transporte seguro de germoplasma, testando diferentes meios básicos de cultura, presença de reguladores vegetais,

concentração de sacarose e fontes de aminoácidos. A regeneração de embriões foi mais efetiva em meio de cultura Y₃ (Eeuwens, 1976) com concentração de Fe₂SO₄ 41,7 mg.L⁻¹ e Na₂EDTA 55,8 mg.L⁻¹ na presença de glicina e ausência de mio-inositol, contendo carvão ativado. A presença de reguladores vegetais e a caseína hidrolisada foram limitantes inclusive inibindo a germinação. A presença de altas concentrações de sacarose (60 g/L) mostrou melhores resultados.

***IN VITRO* REGENERATION OF *Cocos nucifera* L . EMBRYOS.**

Author: Vanda dos Santos Silva

Adviser: Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo

SUMMARY

The sector of coconut production is reached by several problems that affect his productivity especially the spread use of plants without selection due to intrinsic characteristics of the culture that difficult the selections for cultivars whit superiors characteristics. The efficient use of the genetic resources of the coconut has been having difficulties in collecting and germplasm exchange. The tissue culture has for purpose to make possible the safety change of germplasm and to facilitate the development of productive varieties in a program of genetic improvement; however the regeneration of plants through *in vitro* techniques has been presenting additional difficulties in the establishment of viable protocols.

The present work had for objective to establish a viable protocol for the regeneration of coconut zigotic embryos to be used in programs of genetic improvement and for the safe movement of germplasm, testing different basic

media of tissue culture, presence of growth regulators, sucrose concentration and sources of amino acids. The regeneration of embryos was more effective in Y₃ (Eeuwens, 1976) media with concentration of Fe₂SO₄ 41,7 mg.L⁻¹ and Na₂EDTA 55,8 mg.L⁻¹ whit presence of glycine and absence of meso-inositol, containing activated charcoal. The growth regulators and hydrolysate casein presence even inhibited germination. The presence of high sucrose concentrations (60 g/L) showed better results.

1 INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma das principais culturas em áreas tropicais. Conhecido como "a árvore da vida" é uma das plantas de grande utilidade, sendo a principal cultura perene para extração de óleo em escala industrial. Constitui-se numa importante cultura perene passível de gerar um sistema sustentável de exploração e geração de renda para pequenos proprietários, fornecendo não somente alimento, água e óleo de cozinha, como também matéria prima para telhados, cordas, tapetes, redes, utensílios, ornamentos, açúcar, álcool feitos da seiva de sua inflorescência e inúmeros outros produtos (Ferreira, et al. 1998). O coqueiro também é muito utilizado como planta ornamental para casas, parques e jardins.

Porém, o setor de produção de coco é atingido por vários problemas que afetam sua produtividade, particularmente o uso difundido de plantas sem seleção, a idade avançada das plantações existentes e a ocorrência de várias pragas e doenças para as quais pouco ou nenhum tratamento fitossanitário se encontra atualmente disponível (Ferreira, et al. 1998).

A coleta e o intercâmbio de germoplasma de coqueiro, por meio convencional, é difícil e de alto custo em virtude do volume e peso das sementes. Além disso, são recalcitrantes, pois não suportando armazenamento e germinam durante o transporte que é feito normalmente por navio. Incluindo-se ainda os riscos, sempre presentes, da introdução de novas pragas e doenças.

O volume cada vez maior de troca internacional de germoplasma, juntamente com os recentes avanços da biotecnologia, criou necessidades urgentes de avaliações específicas, com uma revisão do conhecimento existente

em todas as disciplinas relativas à segurança fitossanitária de transferência de germoplasma. Isto incitou a FAO e o IBPGR a lançar um programa de colaboração para o movimento seguro de expedição de germoplasma, refletindo a complementaridade de seus mandatos no que diz respeito ao movimento seguro de germoplasma. A FAO, como depositária da Convenção Internacional de Proteção Vegetal, de 1951, tem mandato para ajudar aos governos membros a fortalecer seus Serviços de Quarentena Vegetal, enquanto que o mandato do IBPGR é para incrementar a coleta, conservação e uso da diversidade genética de plantas úteis para o benefício da humanidade (Frison et al., 1999).

As diretrizes da FAO e do IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) recomendam para o movimento seguro de germoplasma o uso de embriões zigóticos *in vitro* como uma maneira ideal de se evitar a disseminação de doenças (IPGRI, 1997).

Considerando as dificuldades da propagação vegetativa convencional do coqueiro devido as suas particularidades morfológicas, seria de grande interesse nos programas de melhoramento a utilização da propagação do coqueiro envolvendo técnicas *in vitro*, numa tentativa de neoformação de gemas ou embriões somáticos a partir de tecidos do caule, folhas, raízes e inflorescências (Pannetier & Buffard-Morel, 1986).

Os primeiros trabalhos com cultura *in vitro* do coqueiro foram realizados com embriões zigóticos (Abrahams & Thomas, 1962). As principais aplicações desta tecnologia estão na coleta, intercâmbio e conservação do germoplasma e na propagação de híbridos raros, que não germinam pelo processo natural, tais como o coqueiro Makapuno e Kopyor. A cultura de embriões pode também ser técnica coadjuvante para o processo de transgênese, ou seja, introdução de genes exógenos no genoma de um organismo (Hu & Ferreira, 1998).

Pesquisas coordenadas pelo IPGRI/COGENT (Coconut Genetic Resources Network) tiveram, como objetivos, comparar e melhorar os protocolos para cultura *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro, visando altas taxas de germinação e de obtenção de plântulas *in vivo*.

O uso controlado destas técnicas tornarão possível a troca de genótipos destinados à formação de bancos de germoplasma por meio do transporte de embriões. A existência deste tipo de programa e a manutenção de coleções de germoplasma no país são também importantes como parte de projetos de melhoramento genético do coqueiro.

Com base no esposto acima, este trabalho foi planejado e desenvolvido desenvolvido com o objetivo de estabelecer um protocolo viável para a obtenção de embriões zigóticos para ser utilizado na propagação e nos programas de melhoramento genético da cultura do coqueiro, bem como para o intercâmbio seguro de germoplasma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A origem do coqueiro é bastante controversa. Existem relatos afirmando ser ele oriundo da Índia, outros afirmam que é proveniente das ilhas do Pacífico; outros mais, o julgam africanos. Existem evidências de que já existia em tempos pré-colombianos, na América Central. O consenso, é que o coqueiro seja originário do sudeste asiático.

No Brasil, mais precisamente na Bahia, o *Cocos nucifera* L chegou em 1553, a bordo de embarcações portuguesas provenientes das ilhas de Cabo Verde. Da região do Recôncavo Baiano espalhou-se por toda a costa do Brasil, provavelmente, por dispersão natural através das correntes marítimas. Foi com a chegada dos escravos africanos, especialmente aqueles originários de Moçambique, onde a extração e o aproveitamento do leite de coco já era prática comum herdada da Índia, que se iniciou a perfeita alquimia que culminou com a criação dos deliciosos pratos da original culinária afro-brasileira.

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é cultivado em mais de 86 países, ocupando uma área de 11.600.000 hectares (Persley, 1992), distribuindo-se entre as latitudes 20° N e 20° S (Frémond et al., 1966).

O coqueiro anão (*Cocos nucifera* var. anã) foi introduzido no Brasil por Artur Neiva e Miguel Calmon, quando retornavam de uma viagem ao Oriente, estimulados pela precocidade na produção e facilidade de colheita dos frutos. Vindo da Malásia, o mesmo não alcança mais do que 10 metros de altura.

2.2 Ecofisiologia do coqueiro

O coqueiro é uma planta de clima tropical e apresenta melhor desenvolvimento em condições de temperatura em torno de 27°C, não tolerando temperaturas inferiores a 15°C. Necessita cerca de 2000 horas de luz por ano para ter um bom desenvolvimento.

Os fatores climáticos afetam de diferentes maneiras o desenvolvimento do coqueiro, dependendo da sua localização geográfica. No Nordeste do Brasil, as elevadas taxas de evapotranspiração associadas à irregularidade na distribuição das chuvas provocam déficits hídricos estacionais. Tais déficits representam o fator mais limitante do desenvolvimento do coqueiro que, por ter crescimento e produção contínuos, exige condições de clima favoráveis durante todo o ano. Na região Norte, a elevada umidade atmosférica favorece o aparecimento de doenças fúngicas. Na região Centro-Oeste e Sudeste, baixas temperaturas e umidade relativa do ar durante os meses de menor pluviosidade constituem os principais fatores limitantes. No entanto, esses fatores climáticos adversos podem ser contornados com a adoção de tratamentos culturais adequados a cada região, devendo-se considerar, neste caso, outros aspectos como a altitude para que se possam evitar as baixas temperaturas e geadas, a aplicação de irrigação, preço que compense a baixa produtividade, aplicação de tecnologias etc. A variedade escolhida tem também grande importância na capacidade de adaptação às adversidades de cada região (Passos, 1998).

O déficit de água nos tecidos da planta exerce influência direta sobre seus processos fisiológicos sendo que as condições de umidade do solo são fatores determinantes da magnitude desse déficit (Slatyer, 1967). O nível de nutrientes exerce também influência considerável sobre as relações hídricas da planta (Begg & Turner, 1976).

2.3 Morfologia do coqueiro

O coqueiro apresenta sistema radicular fasciculado concentrado nos primeiros 0,60 metros de profundidade e num raio de 2 metros (Anikumar & Wahide, 1988). O caule é do tipo estipe, não ramificado, muito desenvolvido e bastante resistente e não apresentando crescimento secundário.

A folha do coqueiro é do tipo penada, sendo constituída pelo pecíolo que continua pela ráquis, onde se prendem numerosos folíolos, a qual pode atingir até 6 metros de comprimento.

A inflorescência é paniculada, axilar, protegida por bráctea grande, chamada de espata; com flores masculinas e femininas na mesma inflorescência.

O fruto é uma drupa formada por uma epiderme lisa ou epicarpo, que envolve o mesocarpo espesso e fibroso, apresentando na parte mais interna uma camada muito dura, o endocarpo. A semente é constituída por uma camada fina de cor marrom, o tegumento, que se localiza entre o endocarpo e o albúmem sólido (carne) onde se encontra o embrião. O fruto apresenta uma cavidade interna que é preenchida pelo albúmem líquido a água do coco (Figura 1).

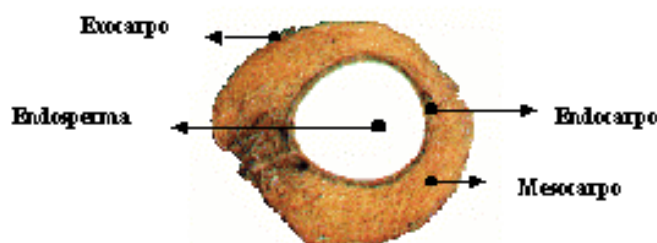


Figura 1 - Corte longitudinal do fruto do coqueiro

O coqueiro pertence à família *Palmae*, uma das mais importantes famílias da classe das monocotiledôneas. Sua classificação taxonômica é a seguinte (Purseglove, 1981):

Classe: *Monocotyledoneae*

Ordem: *Palmales*

Família: *Palmae*

Subfamília: *Cocoideae*

Gênero: *Cocos*

Espécie: *Cocos nucifera* L.

O coqueiro é constituído de uma única espécie, *Cocos nucifera* L., podendo ser dividido em três grupos: Gigantes, Anões e Intermediários (tabela 1), com cada grupo contendo um grande número de variedades. As variedades são geralmente nomeadas de acordo com a sua suposta localidade de origem. As variedades gigantes apresentam, de modo geral, fecundação cruzada; seu crescimento é rápido e a fase vegetativa longa (cerca de sete anos). Os frutos são grandes, geralmente em número de 50 a 80 por planta/ano. Os frutos se prestam tanto para o consumo "in natura" como para a produção de copra para a indústria, pois possuem endocarpo espesso e firme. As principais variedades existentes no Brasil são:

Coqueiro Gigante – Plantas de porte alto, atingindo cerca de 35 m de altura; pouco produtiva (60 a 80 frutos/planta/ano); início de produção aos sete anos após o plantio; os frutos são utilizados pela indústria de processamento na forma de coco ralado, leite de coco, flocos, óleo de coco, etc.

Coqueiro Anão – Planta de porte baixo, atingindo até 12 m de altura, muito produtiva (200 a 250 frutos/planta/ano); início de produção aos três anos após o plantio; os frutos são utilizados na forma de "coco verde", em função da excelente qualidade de sua água.

Híbridos - Destacam-se os híbridos obtidos do cruzamento entre o coqueiro anão (planta mãe) e o coqueiro gigante (planta polinizadora). São plantas de porte intermediário, atingindo cerca de 20m de altura; produzem de 120 a 150 frutos/planta/ano. Iniciam a produção aos quatro anos após plantio, sendo os frutos utilizados tanto pela indústria de processamento do coco-seco quanto na forma de coco-verde (água de coco).

Tabela 1. Características de cultivares de coqueiro.

CARACTERÍSTICA	ANÃO	HÍBRIDO	GIGANTE
Início da Floração (anos)	2 a 3 (Precoce)	3 a 4 (Intermediário)	5 a 7 (Tardio)
Vida Útil (anos)	30 a 40	50 a 60	60 a 80
Tamanho do Fruto	Pequeno	Intermediário/Grande	Grande
Crescimento	Lento	Intermediário	Rápido
Porte (Altura)	8 a 10m	20m	35m
Produção (frutos/ano)	130 a 150	120 a 150	60 a 80
Peso de Fruto	900g	1200g	1400g
Peso de Noz	550g	800g	700g
Peso de Albúmem	250g	400g	350g
Exigência Edafoclimática	Muito Exigente	Exigente	Rústico
Destino da Produção	Água	Agroindústria/Culinária/Água	Agroindústria/Culinária

Fonte: Aragão et al. (2002).

2.4 Sistema reprodutivo

O coqueiro é uma planta monóica. Cada folha em sua axila, apresenta uma gema floral que se converterá em inflorescência frutífera, de acordo com as condições de clima e nutrição. Em condições favoráveis na axila de cada folha formará uma inflorescência (Figura 2). Em média o coqueiro emite 12 folhas por ano, podendo variar entre 11 a 15 folhas (Frémond et al., 1966).

Entre os fatores de produção, o número de flores femininas por inflorescência é o mais importante. As plantas mais produtivas de uma população apresentam não apenas ao maior número de inflorescências, mas também o maior número de flores femininas por inflorescência (Frémond et al., 1966). A análise da biologia floral do coqueiro demonstra a existência de diferenças no modo de reprodução (Sangaré et al., 1978).



Figura 2 - Inflorescência de *Cocos nucifera* anão.

O comportamento sexual do coqueiro varia sensivelmente segundo as variedades; as variações referem-se, principalmente, à duração da fase feminina, contada a partir do tempo de receptividade dos estigmas e sua

concomitância com a fase masculina, ou seja, a tempo de emissão do pólen, sendo esta última mais constante (Siqueira et al., 1998).

Segundo Siqueira et al., (1998) a fase feminina dura desde o início da receptividade da primeira flor até a necrose dos últimos estigmas. A fase masculina começa com a abertura da inflorescência e termina com a queda da última flor masculina. O estudo da simultaneidade entre as duas fases permite a constituição de quatro grupos de comportamento:

Grupo 1 – Fase feminina curta, sem simultaneidade com a fase masculina da mesma inflorescência e a da inflorescência seguinte. É uma alogamia completa.

Grupo 2 – Fase feminina curta, sem simultaneidade com a fase masculina da mesma inflorescência, mas com uma simultaneidade importante com a fase masculina da inflorescência seguinte. É uma alogamia preferencial.

Grupo 3 – Fase feminina longa, completamente simultânea com a fase masculina da mesma inflorescência, com ou sem simultaneidade com a fase masculina da inflorescência seguinte. É a autogamia direta.

Grupo 4 – Fase feminina curta com simultaneidade com a fase masculina da mesma inflorescência e com a fase masculina da inflorescência seguinte, podendo-se observar uma simultaneidade das duas fases masculinas com uma parte da fase feminina. É uma autogamia preferencial.

A simultaneidade com a fase masculina da inflorescência seguinte depende intensamente do número anual de inflorescências emitidas, o que é influenciado por condições ambientais. No caso da variedade gigante, ocorrem apenas os grupos 1 e 2.

Na variedade gigante, a fase feminina começa por volta de três semanas após a abertura da espata, ou seja, de três a seis dias após o fim da fase masculina da mesma inflorescência, não havendo, desta maneira, possibilidade de autofecundação. Diz-se que o coqueiro-gigante é uma planta alógama por causa da não coincidência na floração dos elementos masculinos e femininos de uma mesma inflorescência. No entanto esta não coincidência entre as fases não é absoluta para uma mesma planta, pois pode haver fecundação entre duas inflorescências sucessivas. Esta possibilidade varia com a época, podendo ser importante durante a estação da seca, na qual há um grande número de inflorescências funcionais e o intervalo entre a abertura de duas inflorescências sucessivas é relativamente curto (Frémond et al., 1966).

Do ponto de vista da biologia floral, o coqueiro-anão apresenta diferenças relevantes. As fases femininas nessa variedade iniciam por volta de uma semana após o início da fase masculina e termina quase ao mesmo tempo, durando aproximadamente dez dias. Devido esta concomitância, constatada em 90% dos casos, é que a autofecundação constitui a regra no coqueiro anão, ainda que existam diferenças relacionadas ao ecotipo (Siqueira et al., 1998).

2.5 Propagação

Além das características genética e procedência das sementes, a formação, o vigor e a sanidade das mudas são indispensáveis para a obtenção de plantas mais produtivas. Quando se selecionar material a ser propagado, deve-se considerar a exigência do mercado. A variedade do coqueiro gigante é preferida pela indústria e para consumo *in natura*, devido ao seu tamanho e espessura do albúmem sólido. Os frutos do coqueiro anão são utilizados para consumo de água (albúmem líquido) pelo seu sabor, mas não são utilizados na indústria, pois o rendimento do albúmem sólido é baixo. O coqueiro híbrido, resultante do cruzamento da variedade anã e gigante, constitui boa alternativa

para associar as características favoráveis do fruto do coqueiro-gigante à produtividade e precocidade do coqueiro anão (Fontes et al. 1998).

As sementes devem ser colhidas completamente secas, com aproximadamente 11 a 12 meses após a abertura das inflorescências e depois estocadas ao ar livre para completar a maturação. Nestas condições, iniciam a germinação entre 40 e 60 dias no caso do coqueiro anão, entre 70 e 90 dias no híbrido e entre 100 e 150 dias no coqueiro gigante. É importante salientar que as sementes não germinadas até 120 dias devem ser descartadas, uma vez que existem indicações de que a velocidade de germinação está correlacionada com a precocidade de produção da planta (Fontes et al. 1998).

O solo para produção do coqueiro deve apresentar textura de arenosa a areno-argilosa, ser bem drenado e possuir boa fertilidade (Ferreira, et al. 1998).

2.6 Pragas e doenças

2.6.1 Pragas

A ação nociva das pragas é observada desde a implantação da cultura, ocasionando grande número de replantes, atraso no desenvolvimento vegetativo e conseqüente retardamento no início de produção, agravando-se à medida que a planta entra em produção e atinge a fase adulta. Nesta fase é intensa a ação de coleobrocas, cuja larva se alimenta dos tecidos internos da planta, podendo ocasionar tanto a sua perda total como afetando diretamente a produção (Ferreira et al.1998).

As Lepidópteras, quando na fase de lagartas se alimentam do limbo foliar, podendo destruir toda a folhagem da palmeira, restando apenas as nervuras centrais dos folíolos e a raquis de cada folha, o que prejudica o fenômeno de transpiração e fotossíntese da planta hospedeira, ocasionando

queda prematura dos frutos e atraso na produção, e em alguns casos extremos, a morte da planta (Lever 1969).

As Homópteras, por se tratarem de insetos sugadores, provocam clorose nas folhas do coqueiro, obstruindo os estômatos, o que concorre para o depauperamento da planta. Em outros casos provoca atraso no desenvolvimento de coqueiros jovens, e em plantas em produção, provoca abortamento de flores femininas, queda de frutos pequenos ou frutos em desenvolvimento (Ferreira et al.1998).

Os ácaros são organismos diminutos, diferem dos insetos por apresentarem quatro pares de patas, no estágio adulto. A maioria dos ácaros se alimentam de tecido vegetal; no entanto, existem ácaros micófagos, saprófagos, parasitas de outros animais ou predadores (Flechtmann, 1979). Alguns ácaros se desenvolvem sob as brácteas dos cocos novos, sugando-lhe a seiva da epiderme e causando clorose, prejudicando o mercado do fruto para consumo de água (Rosas et al., 1992). Além do ataque aos frutos causam severos danos em plantas jovens (Robbs & Peracchi, 1965; Flechtmann, 1979; Ferreira, 1987). O aparecimento de pequenas manchas cloróticas, visíveis de ambos lados dos folíolos das folhas novas, as quais se expandem com o envelhecimento da folha também são sintomas de ataque de ácaro. Sendo os sintomas iguais aos que ocorrem em Dendê descrito por Genty & Reyes (1977).

2.6.2 Doenças

A cultura do coqueiro, nas condições brasileiras, é atacada por diversas doenças, que variam de importância, de uma região para outra, havendo, inclusive, doenças pouco estudadas, de origem desconhecida (Warwick et al., 1998).

Queima-das-folhas – *Botryosphaeria cocogena* – Doença causada por fungo, constatada por Robbs et al. (1975), é atualmente um dos mais sérios problemas da cultura do coqueiro no Nordeste brasileiro (Renard, 1988). A doença é originária do Brasil, não tendo sido registrada em outras regiões do mundo. Quando as condições são favoráveis à doença, os prejuízos chegam a mais de 50% da produção de coco (Warwick et al., 1994). Os sintomas manifestam-se nas folhas inferiores da planta a partir de um ano e seis meses de cultivo no campo. O sintoma mais característico dessa doença é uma lesão na forma de “V”, de coloração marrom avermelhada, na extremidade da folha (Warwick et al., 1998).

Lixa-Pequena – *Phyllachora torrendiella* – A lixa pequena foi relatada pela primeira vez no Estado de Pernambuco, em 1940 (Batista, 1948). Atualmente, é encontrada em quase todas as regiões onde se cultiva o coqueiro, causando prejuízos variáveis, podendo passar despercebida sem causar danos durante anos, ou acarretar acentuada perda na produção, quando a precipitação for alta (Subileau, 1993). Os sintomas do ataque do fungo são pequenos pontos negros, conhecidos como verruga, ocorrendo por todas as áreas dos folíolos, ráquis e frutos do coqueiro (Renard, 1982).

Lixa-Grande – *Sphaerodothis acrocomiae* – Esta doença causada por fungo tem distribuição semelhante à Lixa-Pequena. Sua ocorrência está associada ao ataque da queima-das-folhas. A doença manifesta-se sobre o limbo, na nervura dos folíolos e na ráquis foliar, com grossos peritécios de coloração marrom (Joly, 1961).

Anel-Vermelho – *Bursaphelenchus cocophilus* – O anel-vermelho foi descrito, pela primeira vez por Stockdale em 1906 (Franco, 1964). Esse autor observou que a doença era responsável pela morte de coqueiros na Costa Ocidental de Trinidad e concluiu que era uma doença de raiz. Nowell (1919) observou que a doença estava relacionada com nematóide. Atualmente encontra-se disseminada na América Central, no Caribe e na América do Sul. Foi registrada pela primeira vez em Barretos, São Paulo (Lordello e Zamith, 1954). Atualmente é encontrada em toda região produtora de coco do País (Warwick et al., 1998). Os sintomas variam segundo as condições ambientais, idade e variedade das plantas afetadas. A doença não ocorre em plantas jovens no campo. A inoculação mecânica em plantas no viveiro demonstrou que o nematóide é capaz de parasitar plantas muito jovens (Warwick & Bezerra, 1992). Os sintomas externos são caracterizados pela cor amarelo-ouro das folhas basais. Os sintomas podem ser confundidos com outras desordens, como as provocadas pela seca ou por encharcamento. Em estágio avançado, a doença afeta a copa da palmeira, ficando esta com aspecto amarelo-ouro, com exceção de um tufo central de folhas verdes que, finalmente, dobra-se, seca e a planta morre. Num corte transversal do estipe, observa-se um anel vermelho. Um corte longitudinal através do centro da palmeira mostra que a zona avermelhada envolve completamente a base do caule, estendendo-se para cima (Warwick et al., 1998).

Murcha-de-Phytomonas – *Phytomonas sp.*- O agente causal é um tripanossoma que fica restrito ao floema da planta. Também conhecida como "hartrot", "wilt" ou "marchitez sorpresiva", com ocorrência em vários países da América do Sul (Ohhler, 1984). No Brasil, os principais focos estão na Bahia e no Pará (Warwick et al., 1998). A doença inicia-se por um amarelecimento que passa a um empardecimento dos folíolos terminais das

folhas mais baixas, evoluindo da extremidade para a base da folha e das folhas inferiores para as superiores. O empardecimento e o conseqüente ressecamento generalizado são rápidos, entre quatro e seis semanas. Antes de a folhagem tornar-se completamente marrom, a podridão da flecha já alcançou o meristema central. As raízes das plantas contaminadas apresentam pontas azuis; e as raízes terciárias e quaternárias apodrecem rapidamente. A podridão do córtex atinge, em seguida, as raízes secundárias e primárias. Ocorre também uma queda anormal de frutos pequenos, os frutos maiores permanecem na planta e caem mais tarde. Ao mesmo tempo manchas necróticas aparecem nas pontas das espiguetas das inflorescências ainda fechadas (Renard, 1989). Não há registro de recuperação de plantas doentes (Warwick et al., 1998).

Helmintosporiose – *Drechslera incurvata* – É uma doença que ocorre principalmente em viveiros. Umidade relativa elevada, pouco arejamento e temperatura entre 18 e 27°C, são condições que favorecem a ocorrência da doença, entretanto seu desenvolvimento é retardado e até paralisado em ambientes secos. As lesões causadas em folhas do coqueiro são pequenas, de forma elíptica e alongada, cor marrom, com alo amarelo-ouro. A doença desenvolve-se inicialmente nas folhas inferiores, progredindo para a parte superior da planta. Em casos severos, as lesões coalescem e as margens dos folíolos ficam necróticas (Warwick et al., 1998).

Podridão-seca – Esta doença ocorre esporadicamente em viveiros e em plantios definitivos. Foi registrada na Costa do Marfim, Brasil, Filipinas, Malásia e Indonésia. O dendê também é susceptível a esta doença. A primeira manifestação da doença se dá com pequenas manchas esbranquiçadas, isoladas ou em cadeias, localizadas na flecha ou na folha recém aberta. Ocorre também paralisação do desenvolvimento da planta. Em uma fase mais avançada, a folha

central da planta fica totalmente seca. Simultaneamente ao desenvolvimento dos sintomas nas folhas, aparecem no coleto lesões internas, marrons, com aparência de cortiça; esse é o sintoma peculiar da doença. Finalmente todas as folhas secam quando a podridão alcança o meristema central. As plantas atacadas por podridão não se recuperam (Renard et al., 1975). O agente causador é desconhecido. A enfermidade é transmitida pelos homópteros da família *Delphacidae* (Julia & Mariau, 1982).

Amarelo letal das palmeiras - *Phytoplasma palmae* – segundo Alerta Quarentenário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento esta praga ocorre em: Belize, Cuba, Estados Unidos, Gana, Haiti, Honduras, Ilhas Caimã, Jamaica, México, Nigéria, República Dominicana e República dos Camarões. Os sintomas, em geral, ocorrem cerca de 114 a 405 dias após a infecção. Nos frutos ocorre inicialmente uma queda prematura da maioria dos frutos dos cachos mais jovens. O fruto caído tem a extremidade peduncular encharcada, de coloração marrom e preta. As espatas abrem-se revelando as inflorescências com extremidades necrosadas. Após a perda dos frutos a folhagem mais velha apresenta uma coloração amarelo-ouro que progride rapidamente para as folhas mais jovens atingindo toda a copa da planta. Pode ocorrer este amarelecimento somente na folha flecha. A folhagem amarelada permanece túrgida por algum tempo, eventualmente torna-se marrom, seca e fica pendurada formando uma saia em torno do estipe. Simultaneamente ao desenvolvimento dos sintomas da parte aérea da planta, ocorre uma extensiva necrose do sistema radicular. Internamente, ocorre uma podridão do meristema central, causada principalmente por uma invasão de microorganismos secundários. Plantas infectadas morrem 3 a 5 meses após o início dos primeiros sintomas, após o colapso da copa da planta, os estipes permanecem sem

folhagem, o que é chamado na língua inglesa de "telephone poles" ou seja "poste de telefone".

O patógeno é encontrado nos tubos crivados de tecidos jovens, em fase de desenvolvimento, ou de armazenamento. Estes organismos são mais numerosos nas bases das folhas, que ainda não emergiram em torno do meristema apical.

A introdução do amarelecimento letais têm sido devastadoras (Alerta quarentenário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Na Jamaica ocorreu a destruição quase total do coqueiral e somente no ano de 1979 foi estimado que as perdas já tinham alcançado 4 milhões de plantas mortas. No México, a introdução é mais recente, ocorreu no final dos anos 70, porém foi suficiente para arrasar a cocoicultura na Península de Yucatan. No Estado do Texas, EUA.

O controle desta epidemia só pode ser realizado com medidas preventivas, evitando a entrada do patógeno em áreas ainda livres do mesmo.

2.7 Importância econômica

Atualmente são conhecidos cerca de 230 gêneros e 2.650 espécies de palmeiras. A maioria destas palmeiras são utilizada como plantas ornamentais, entretanto três espécies têm causado impacto internacional quanto ao que delas se pode extrair: *Elaeis guineensis* Jacq (dendê), *Cocos nucifera* L. e *Phoenix dactylifera* (Tâmara). As duas primeiras são importantes fontes de óleo comestível e a última é fonte de carboidratos (Reynolds, 1982).

Durante a última década tem surgido um crescente interesse em plantas oleaginosas devido, em parte, à demanda por óleos vegetais para consumo humano e mais recentemente como fonte alternativa renovável de energia (Lleras, 1985).

Embora as palmeiras possam se constituir em fontes mais promissoras de óleos vegetais, até o presente momento somente o dendezeiro e o coqueiro foram domesticados para este fim.

Na América do sul ocorre a maior concentração de palmeiras, cerca de 1.200 espécies das quais 500 são nativas do Brasil (Markey, 1956).

O coqueiro tem tanta importância nos dias de hoje como em tempos passados. Constitui-se na mais importante cultura perene possível de gerar um sistema auto-sustentável de exploração tendo uma importância social muito grande pelos empregos que gera e principalmente porque é cultivada, na sua maioria, por pequenos agricultores, em pequenas propriedades dotadas de solos arenosos com baixa fertilidade natural. Atualmente 96% da produção mundial de coco é proveniente de propriedades com 1 a 5 ha, envolvendo aproximadamente 50 milhões de pessoas. Somente na Ásia, 30 milhões de pessoas dependem diretamente da cultura do coqueiro para sua sobrevivência (Persley, 1992).

Além disso, a cultura favorece a consorciação com outras culturas anuais e perenes em todas as fases de seu cultivo e na fase adulta permite o manejo com animais, barateando a sua implantação e representando mais uma fonte de renda para o produtor. Todas estas características tornam a cultura do coqueiro uma atividade que favorece a fixação do homem no campo (Aragão et al. 2002).

No Brasil o coqueiro é cultivado em área de 300.000 ha (área plantada) com produção em 1997, segundo a FAO, de um bilhão de frutos. Noventa e quatro por cento dessa produção é proveniente do Nordeste, região onde se concentram as principais agroindústrias de coco do país e mais de noventa por cento das pessoas que dependem dessa cultura para sobreviverem. Entretanto, o coqueiro está se expandindo para outras regiões do país, como o Norte, Centro-Oeste, partes do Sudeste e Sul, e até para a região semi-árida do

Nordeste, através de projetos governamentais de fomento à cultura e principalmente, de projetos privados. Portanto é considerada uma palmeira alternativa para o desenvolvimento sustentável dessas regiões.

O coqueiro fornece não somente alimento; dele se obtém mais de 100 produtos e subprodutos, podendo ser classificados como:

- Produtos utilizados para alimentação pelo aproveitamento do albúmem sólido e líquido do fruto, destacando-se dentre estes o coco ralado, o leite de coco, a água de coco e óleo para a indústria alimentícia (Cuenca, 1998).
- Produto fibroso, utilizado principalmente pela indústria têxtil, tais como, fibras para cordas, tapetes, redes, assentos e encostos para bancos de automóveis, escovas, pincéis, cortiça isolante e cama de animais (Ferreira et al., 1998).
- O endocarpo é utilizado na produção de carvões desodorizante, ativado, gasogênio, e coque metalúrgico que, pelo alto valor calórico e baixo teor de cinzas, é usado em ourivesaria, metalúrgica e indústria artesanal, em substituição ao carvão mineral (Cuenca, 1998).
- No processamento industrial, seja para extração de óleo de coco seja na produção de leite de coco, obtém-se um resíduo de grande importância na alimentação animal: a torta de coco, que é muito utilizada como dieta alimentar de animais, rica em proteínas e energia.
- A copra, um dos produtos derivados do coco, tem grande comercialização no mundo inteiro, pela facilidade e baixo custo de transporte. Ela é usada principalmente para a extração de óleo, e ainda como combustível e matéria-

prima na fabricação de borracha sintética, fluido para freio hidráulico de aviões, inseticidas e germicidas, agente plastificador de vidros de segurança, adesivo na fabricação de lubrificantes, na fabricação de glicerina e principalmente na indústria de sabões.

- O óleo de coco é muito utilizado na fabricação de álcool, graças ao seu alto teor de ácido láurico e ácido saturados de menor peso molecular. Ele serve especialmente na fabricação de detergente. Os sulfatos de álcool não são poluentes, graças a sua propriedade biodegradável e, portanto, não poluidor do meio ambiente. Devido à multiplicidade de usos do óleo de coco por diversas indústrias, haverá cada vez mais compradores interessados nas propriedades químicas derivadas de seu alto teor de ácido láurico (48%), além de outros ácidos, que são muito valorizados pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos e de produtos de limpeza (Ohler, 1984). Sua composição química só se compara ao óleo de amêndoa de dendê, garantindo-lhe demanda, cada vez maior, no mercado mundial.

Apesar da grande importância do coqueiro para o país, a sua produtividade é extremamente baixa, isto é, em média 50 frutos/planta/ano, independentemente da pequena ou da grande propriedade, seja no Nordeste ou em outra região. Isto tem acarretado sérios problemas para os diferentes segmentos que exploram a cultura. Em primeiro lugar porque essa produção não atende à demanda; em segundo porque, como consequência, há necessidade de importação do produto de outros países. Conforme dados da FAO, o Brasil importa coco desidratado desde 1973, contudo foi na década de 90 que esse processo foi muito intensificado. Por exemplo, a importação desse produto em 1995 foi de 16.845 t, quantidade esta superior à demanda das principais agroindústrias brasileiras de coco; em terceiro porque, essa importação proporciona grande evasão de divisas do país e em quarto, porque a

importação reduz acentuadamente o valor da produção nacional de coco. Para aumentar a produtividade de coco no Brasil a pesquisa na área de melhoramento genético é de fundamental importância. Os recursos genéticos são a estratégia mais urgente para se aumentar e produzir a estabilidade de produção do coqueiro. Há a necessidade urgente de coletar e conservar as populações de coqueiro anão e gigante naturalizados do Brasil (Aragão et al. 2002).

2.8 Importância medicinal

O folclore e escritas antigas estão repletas de exemplos da eficácia do coco para muitas doenças como a cura de feridas, úlceras, infestação de piolho, para dissolução de pedras dos rins (Macalalag et al., 1997) e tratamento de disenterias de cólera (Anzaldo et al., 1975).

Recentemente, Lím-Sylianco et al. (1992) demonstraram em animais um efeito protetor do óleo de coco contra poderosas substâncias químicas mutacarcinogênicas, como benzipirina, azaserina e nitrosaminas. A proteção foi observada não só quando o óleo de coco era administrado com a dieta durante vários dias antes do mutacarcinogênico, mas também quando era administrado em uma pílula ou dose com o mutacarcinogênico. Em ambas as experiências, o óleo de coco deu uma proteção significativamente mais alta que o óleo de soja.

Em uma série de trabalhos publicados na década de 1970, Kabara et al. (1972) estudou a atividade antimicrobiana de vários ácidos graxos. Eles encontraram cadeias médias de ácidos graxos (Medium Chain Fatty Acids - MCFA) com 6 a 12 carbonos, possuindo significativa atividade contra bactérias gram positivas, mas não contra gram negativas; elas também eram ativas contra cobertura lipídica de vírus assim como contra fungos e protozoários.

De acordo com Mary Enig, da organização de apoio a pacientes com AIDS "Keep Hope Alive", foram documentados vários pacientes de HIV-AIDS

cuja carga virótica caiu para níveis tão baixos a ponto de serem indetectáveis, quando eles utilizaram óleo de coco ou comeram coco (meio coco por dia) ou ainda quando eles acrescentaram coco ao medicamento anti-HIV (antiprotease e/ou antiretroviral) que previamente não estava sendo efetivo (Dayrit, 2000).

O primeiro teste clínico (estudo piloto) usando monolauril durante seis meses como monoterapia em 15 pacientes de HIV foi há pouco completado. Esta tentativa inicial confirmou os relatos populares de que o óleo de coco tem um efeito antivirótico e pode reduzir vantajosamente a carga virótica de HIV de pacientes. A ação antivirótica positiva foi vista não só com o monoglicerídeo de ácido láurico, mas com o óleo de coco por si só. Isto indica que o óleo de coco é metabolizado em formas de monoglicerídeos C-8, C-10, C-12 aos quais devem sua atividade antipatogênica (Dayrit, 2000).

2.9 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é uma forma de multiplicação assexuada, semelhante à adotada pelos agricultores há muitos anos visando a propagação de determinadas plantas, tais com cana-de-açúcar, mandioca ou batata. A diferença fundamental é que a cultura de tecidos possibilita a multiplicação do indivíduo a partir de uma única célula ou de um pequeno número de células. Desta forma ela é uma importante ferramenta, não só na genética e no melhoramento de plantas como também pode ser auxiliar em inúmeras outras áreas da agricultura (Ramalho et al., 2000).

A técnica de cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa, não só no desenvolvimento de protocolos para produção de plantas a partir de cultura de calos levando à embriogênese somática, mas principalmente na cultura de embriões zigóticos. Neste último caso se poderia viabilizar a produção racional de mudas através da uniformização e da redução do período de germinação da semente.

A tecnologia da micropropagação é útil por si mesma, e pode ser extremamente valiosa na propagação de genótipos superiores, desde que os protocolos permitam alta freqüência de regeneração de plantas. A tecnologia *in vitro* é uma poderosa ferramenta com vantagens qualitativas (espaço e tempo), precedendo a incorporação das plantas regeneradas em um programa convencional de melhoramento (Crocomo & Cabral, 1985).

Por não apresentarem o fenômeno de propagação vegetativa de modo natural, o interesse em cultura de tecidos de palmeiras como meio para produção em massa de clones com alta produção ou resistência a doenças teve início na década de 1960. Na década de 1970 uma série de metodologias *in vitro* foi desenvolvida sendo que na década de 1980 intensificaram-se os estudos de técnicas de micropropagação e estudos morfogenéticos. Estes estudos, quando dizem respeito à palmeiras, têm sido feitos quase que exclusivamente em *P. dactylifera*, *E. guineensis*, *C. nucifera* e outras ornamentais (Brackpool et al., 1986).

Para Tisserat (1987), a cultura de tecidos em palmeiras pode ser dividida em três categorias com objetivos distintos: a) propagação clonal; b) cultura de embriões; c) estudos fisiológicos do crescimento e desenvolvimento (Holdgate, 1977).

2.9.1 Embriogênese zigótica

No início do século passado, Hanning (1904) publicou um trabalho que representa um marco para o estudo da fisiologia do desenvolvimento de embriões (Raghavan, 1976). Utilizando meios de cultura contendo sais minerais, açúcar e aminoácidos, Hanning foi capaz de cultivar embriões isolados de *Raphanus* e *Cochlearia*. Desde então, a técnica de cultura de embriões tem-se expandido e dado importantes contribuições em estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião, em programas de melhoramento genético, pela

recuperação de híbridos de interesse provenientes de cruzamentos incompatíveis, bem como para a quebra de dormência de sementes, observadas em algumas espécies (Ferreira et al., 1998).

Um dos primeiros trabalhos em cultura de tecidos envolveu o estudo do crescimento de embriões de coco, em modificações do meio White, contendo água de coco (Cutter & Wilson, 1954).

O melhoramento de palmeiras e o estudo genético podem ser beneficiados a partir da aplicação da cultura de embriões para acelerar a germinação de embriões os quais apresentam germinação lenta e para desenvolvimento de híbridos interespecíficos ou intergenéricos que não sobrevivem naturalmente (Tisserat 1984).

É comum observar, em certos cruzamentos, a manifestação de barreira "pós-zigótica", isto é, de mecanismos de incompatibilidade que são observados após a fecundação, geralmente afetando o desenvolvimento do endosperma ou de outros tecidos e, por sua vez, o embrião. Nestes casos, procede-se à polinização normal seguida de resgate de embrião em estágio inicial de desenvolvimento (Williams et al., 1982.). As condições especiais de cultura *in vitro* proporcionam o desenvolvimento normal do embrião imaturo, até a obtenção do híbrido interespecífico (Ferreira et al., 1998).

Além disso, a técnica de cultura de embriões oferece um sistema controlado para estudar os problemas nutricionais, fisiológicos e bioquímicos dos embriões em vários estágios de desenvolvimento (Tisserat, 1984).

À medida que o embrião zigótico se desenvolve, ocorrem mudanças progressivas nas suas exigências nutricionais, passando de heterotrófico para autotrófico. A distinção entre estas duas fases se baseia na dependência do embrião pelas substâncias nutritivas armazenadas no endosperma. Inicialmente, o zigoto e o embrião nas fases subseqüentes à fecundação têm pouca capacidade de síntese utilizando as reservas nutricionais, reguladores vegetais e

outros metabólitos essenciais presentes no endosperma e células acessórias do saco embrionário. Ainda no estágio globular o embrião continua sendo heterotrófico. Somente a partir do estágio cordiforme final, com o início do desenvolvimento dos cotilédones, é que o embrião começa a se tornar independente e autotrófico (Raghavan, 1976).

A cultura *in vitro* de embriões facilita a coleta de germoplasma, troca e armazenamento de material. Isto pode também eliminar o complicado tratamento fitossanitário das volumosas e pesadas sementes do coqueiro, tornando o movimento de germoplasma mais fácil e com menos risco de introdução de patógenos, uma vez que no sistema *in vitro* a ocorrência de doenças é praticamente nula (Ramalho et al., 2000).

Cutter & Wilson (1954) cultivaram embriões de coqueiro em vários meios para elucidar o papel do endosperma durante o crescimento do embrião. Esses autores observaram um aumento em tamanho, mas o desenvolvimento dos brotos e das raízes foi muito lento. Em cultura sólida, a germinação dos embriões produziu várias folhas, mas formaram-se somente raízes rudimentares (Abrahams e Thomas 1962; De Guzman e Del Rosário, 1964).

A equipe de De Guzman fez um extenso estudo sobre a cultura *in vitro* do coqueiro "Makapuno", cujo embrião não germina *in vivo* devido a uma anormalidade do endosperma. Em uma série de experimentos mostrou uma seqüência de cultura em meio líquido White (White e Davidson 1976) e meio MS sólido (Murashige e Skoog, 1962) promovendo concomitantemente um desenvolvimento mais rápido de brotações e raízes (De Guzman, 1971).

A incorporação de carvão ativado no meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido e a decapitação das raízes das plântulas também melhoraram o desenvolvimento das raízes e plântulas de embriões de coqueiro "Makapuno" (De Guzman & Manuel 1977). Del Rosário e De Guzman (1981) observaram um efeito positivo promovido pela alta concentração de açúcar no crescimento de

raízes usando meio MS. Este efeito não se repetia quando o meio White era utilizado.

A técnica de cultura de embrião do coqueiro "Makapuno" desenvolvida por De Guzman encontrou muitas aplicações, além de ter conseguido resgatar o embrião do "Makapuno".

Conforme Grupta et al. (1986), plantas completas foram desenvolvidas de embriões zigóticos da variedade West Coast Tall em meio de cultura líquido Y3 (Eeuwens 1976) básico suplementado com água de coco, BA e ANA.

O intumescimento antes da germinação dos embriões em meio White líquido leva de 6 a 8 semanas. Assy Bah (1989) utilizando os nutrientes do meio Murashige e Skoog (1962) como meio básico observou a duplicação de peso em 12 a 13 dias.

Embriões zigóticos maduros (11 a 12 meses) de *Cocos nucifera* L. da variedade "East African Tall" foram armazenados *in vitro* por 6 meses. Varias concentrações de sacarose (0, 20, 40, 60 e 80 g/L), (Mkumbo et al. 1997) foram testadas em 2 tipos de meios (MS e Y3 ± carvão ativado). Durante o armazenamento foram avaliados os ganhos em comprimento, espessura e peso. Os embriões foram testados a cada 2 meses para avaliação da viabilidade. Plantas foram regeneradas de embriões zigóticos e o tecido plumular extraído dos embriões zigóticos maduros. O meio de recuperação foi MS e Y3 (Eeuwens 1976) contendo carvão ativado, gelrite e sacarose (45g/L). O crescimento do embrião e a germinação foram suprimidos durante o armazenamento. O escurecimento causado pela oxidação foi eliminado pela adição de carvão ativado ao meio. A viabilidade dos embriões foi assegurada por todo o período de armazenamento. Plúmulas apresentaram maiores taxas de germinação que embriões zigóticos, mas a produção de plântulas foi retardada por altos níveis de vitrificação nestes explantes.

2.9.2 Embriogênese somática

Embriogênese somática, adventícia ou assexuada, são termos empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão de gametas (Williams & Maheswaran, 1986).

A embriogênese somática é um processo que vem sendo estudado intensamente em cultura de tecidos (Raghavan, 1976; Ammirato, 1983; Coelho, 1997; Tomaz, 2000), é muito importante na propagação de plantas, onde células somáticas sofrem uma seqüência de desenvolvimentos semelhantes ao processo de formação do embrião zigótico. É uma ferramenta essencial para a pesquisa básica no desenvolvimento do embrião (Dudits et al., 1991) e aspectos da fisiologia da planta (Jacobsen, 1991).

Embora não esteja completamente esclarecido se a maioria ou apenas determinadas células do explante ou do calo apresentam competência embriogênica, alguns fatores como o tipo de explante, o genótipo da planta matriz, condições de cultivo e o meio de cultura podem afetar a embriogênese somática *in vitro* (Button & Kochba, 1977).

Qualquer célula que, sob determinadas condições de crescimento, possui capacidade para resultar na formação de embriões somáticos é denominada célula com competência embriogênica. Segundo Sharp et al. (1980), a embriogênese somática pode ser iniciada por dois diferentes caminhos. Em algumas culturas, a embriogênese ocorre diretamente na ausência de formação de qualquer calo para determinar a célula pró-embriônica. Respostas para este modelo foram verificadas em células nucelares de variedades poliembriônicas de *Citrus* (Sharp et al., 1982). O segundo tipo de desenvolvimento requer a proliferação prévia de calos e os embriões originam-se da célula embriogênica induzida no calo (Vasil & Vasil, 1980).

A expressão destes dois padrões embriogênicos parecem estar relacionados com os eventos determinativos da citodiferenciação durante o ciclo mitótico. Yeoman (1970) observou que o destino de determinadas células filhas, após a mitose, define-se em um ciclo mitótico anterior à diferenciação, isto é, células que passaram por um processo embriogênico são derivadas de uma divisão celular determinativa antecedente. Segundo Sharp et al. (1982), estas células determinadas podem sofrer uma pausa pós-mitótica até que as condições sejam favoráveis para o início da seqüência de desenvolvimento característico da embriogênese somática.

Conforme Bhalla-Sarin et al. (1986), embriões de sementes de coco da variedade West Coast Tall formaram calos em meio Gamborg B5 contendo conjugados de AIA (AIA-acido aspártico e AIA-alanina) a 2 mg/L. A formação de calos foi maior quando ambos os conjugados foram fornecidos (50%), do que quando eles eram fornecidos separadamente (40% de AIA-ala e 20% de AIA-asp). A diferenciação de brotações ocorreu na transferência para o meio B5 suplementado com 2 mg/L AIA - asp e 2 mg/L kinetin ou ANA (2 mg/L). Plântulas completas foram obtidas em meio B5 suplementado com 0,5 mg/L ANA, 2 mg/L BA e 1 g/L polivinilpirrolidone, porém estas não se desenvolveram após a transferência para o solo.

Um protocolo aperfeiçoado para a embriogênese somática em coqueiro (*Cocos nucifera* L.) foi descrito por Samosir et al. (1998). Explantes de embriões zigóticos imaturos foram utilizados para induzir a embriogênese somática por serem mais suscetíveis do que embriões maduros. Por outro lado, cortes longitudinais em embriões zigóticos maduros melhoraram a capacidade de embriogênese somática. Os explantes provenientes da região média do embrião foram mais produtivos e secções mais externas não produziram embriões somáticos. Para induzir a embriogênese somática em explantes maduros foram necessários 2,4-D (125 μ M) e carvão ativado (2,5 g/L). A

incubação das culturas sob condições de luminosidade inibiu a produção de embriões somáticos. Porém, a maturação dos embriões somáticos não foi influenciada pela luminosidade, enquanto que para a regeneração das plântulas a luminosidade foi necessária. Plântulas foram produzidas com sucesso, mas os alongamentos das brotações foram inibidos pela formação de um grande sistema radicular. A remoção destas raízes e o restabelecimento do estágio anterior com a aplicação de ANA (10 μ M) permitiram o desenvolvimento normal dos "seedlings". Estas foram aclimatadas (com taxa de 30% de sobrevivência) e cresceram normalmente em estufa.

Também em coqueiro, explantes de folhas jovens de mudas de viveiro (I), plantas com 5 anos (II) e plantas maduras (III), foram colocadas em meio contendo sais de Eeuwens acrescido de vitaminas de Morel, 3% de sacarose e 0,8% de agar. Carvão ativado e 2,4-D, em várias concentrações, foram adicionados. BA foi usado para a indução de embriogênese. As proporções de explantes que geraram calos foram (I) 70%, (II) 50% e (III) 20%. Houve a produção de embriões 6 meses após os explantes terem sido colocados em meio de cultura (Pannetier et. al. - 1986).

Segundo Griffis et al., (1997), diversos tecidos, incluindo anteras, filamentos, ovários infertilizados e pedaços de folhas imaturas, foram usadas como explantes para morfogênese *in vitro* dos cultivares de coqueiro Jamaican Tall e Malayan Dwarf. A indução de calos e a indução direta de proembriões somáticos foram obtidas com adição de 2,4-D no meio de cultura. Em alguns experimentos, pró-embriões somáticos apareceram a partir de filamentos ligados a anteras imaturas após vários meses em cultura. Ovários não fertilizados cultivados em meio suplementado com 2,4-D e diethylstilbestrol (DES) foram monitorados por 24 meses em cultura. Houve um substancial ganho de peso e numerosas mudanças morfogênicas anormais ocorreram em ovários cultivados em meio Eeuwens Y3 modificado, suplementado com DES a 5

ou 15 mg/L, 2,4-D a 25 e 50 mg/L e N⁶-(2-isopentenil) adenina (2iP) (3 mg/L). Vários ovários não fertilizados formaram calos e raízes adventícias, mas não embriões somáticos. Quando cultivados em formulações de meios similares, folhas de plântulas imaturas formaram calos em seu lado cortado, enquanto outros formaram raízes ou numerosos pró-embriões somáticos diretamente. Alguns pró-embriões também desenvolveram haustório ou raízes e evidente bipolaridade, entretanto o favorecimento do desenvolvimento de brotação apical não ocorreu, com apenas uma exceção.

Segundo Fernando & Gamage (2000), a embriogênese somática em coqueiro geralmente é induzida por redução gradual de concentração de auxina no meio de cultura e incorporação de citocininas. Embora a regeneração da planta por embriogênese somática seja possível, o protocolo ainda necessita ser aperfeiçoado. Neste estudo os autores relatam a ocorrência de calos nodular obtido de embriões zigóticos imaturos (7-9 meses) de coqueiro em um meio contendo 2,4-D (24 μ M). Em uma nova linha de pesquisa, o ácido abscísico (ABA) nas concentrações de 2,5 a 7,5 μ M foi incorporado ao meio de cultura durante 3 a 7 semanas para induzir a embriogênese somática. Alternadamente, o calo foi sub-cultivado em intervalos de 5 semanas em meio contendo concentrações gradualmente reduzidas de 2,4-D para induzir embriogênese somática. A incorporação de ABA aumentou a produção de embriões somáticos. A aplicação de 2,5 a 5 μ M de ABA durante 5 semanas foi considerada efetiva. Um grande número de embriões somáticos desenvolvidos em meio contendo ABA formou brotos normais e plantas completas quando comparado àqueles produzidos em meios com baixos níveis de 2,4-D.

Verdeil & Huet, (1994) cultivaram inflorescências imaturas de 3 genótipos de coqueiro em um meio sólido com suplemento de carvão ativado (2%) e várias concentrações de 2,4-D. Calos brancos e globulares se desenvolveram de meristemas florais imaturos. Esta é a primeira descrição de

um embrião somático de coqueiro com uma estrutura bi-foliar funcional e meristema completamente diferenciado. A maturação deste embrião permitiu a completa regeneração de plantas de coqueiro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Agrícola do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, no Campus da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba – S.P.

3.1 Regeneração de embriões - embriogênese zigótica

Os embriões de sementes de coco (*Cocos nucifera* L.) utilizados nos experimentos Y₃(1), Y₃(2) e MS(0) foram provenientes de sementes do Banco Ativo de Germoplasma de Coco (BAG de Coco), situado no Campo Experimental de Betume, município de Neópolis/SE da EMBRAPA Tabuleiros costeiros, enquanto que os embriões utilizados nos experimentos de MS(1) a MS(32) foram provenientes de cocos adquiridos na central de abastecimento de São Paulo (CEAGESP).

Os embriões zigóticos foram retirados de frutos maduros 13 meses após a abertura da inflorescência.

3.1.1 Desinfestação dos embriões

A desinfestação foi realizada através de lavagem dos embriões com água destilada estéril. Posteriormente, em condições assépticas, os embriões foram colocados em uma solução comercial de hipoclorito de sódio (Kboa®), na concentração 20% (v/v) por 20 minutos, lavados 3 vezes com água destilada estéril e colocados no meio de cultura os frascos sendo mantidos em sala de

crescimento com temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 14/10 h (claro/escuro) densidade de fluxo fotossintético (DFFF) de 47 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$.

3.1.2 Meios de cultura

Para a seleção do melhor meio de cultura para a regeneração de embriões de coqueiro, os embriões foram inoculados em meios de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) e Y₃ (Eeuwens 1976), (Tabela 2 e 3).

Os meios de cultura Y₃ foram modificados na quantidade de Fe₂SO₄.7H₂O e Na₂EDTA assim com nas concentrações de vitaminas e de sacarose (Tabelas 4, 5 e 6), constituindo os meios denominados Y₃(1) e Y₃(2).

Tomando como base o meio MS constituíram-se tratamentos variando os tipos e quantidade de reguladores vegetais, vitaminas e antioxidante, denominados MS(1) a MS(32).

O valor do pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sempre realizada por 15 minutos, a 120°C e sob pressão de 1,5 atm. Em todos os tratamentos, foi utilizado 2,5 g/L de carvão ativado.

Tabela 2. Concentrações de macromelementos nos tratamentos Y₃(1), Y₃(2) e MS.

Componentes Macroelementos	Y₃(1)	Y₃(2) Concentração (mg.L⁻¹)	MS
NH ₄ NO ₃	----	----	1650
NH ₄ Cl	535	535	----
KNO ₃	2020	2020	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	247	247	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	294	294	440
KCl	1492	1492	----
KH ₂ PO ₄	----	----	170
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	312	312	----

Tabela 3. Concentrações de microelementos e Fe-NaEDTA nos tratamentos Y₃(1), Y₃(2) e MS.

Componentes	Y₃(1)	Y₃(2) Concentração (mg.L⁻¹)	MS
KI	8,3	8,3	0,83
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	11,2	11,2	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,2	7,2	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,25	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24	0,24	0,025
NaMoO ₄ .H ₂ O	0,24	0,24	0,025
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024	0,024	----
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	13,9	41,7	24,9
Na ₂ EDTA	37,3	55,8	26,1

3.1.2.1 Germinação e desenvolvimento dos embriões cultivados *in vitro*

Foram avaliados os meios Y₃ e MS com variação nas concentrações de sacarose, reguladores vegetais, vitaminas, caseína hidrolisada, Fe-EDTA e presença de agente gelificante que são descritos a seguir:

Tratamento - Y₃(1) - Meio de cultura Y₃. Meio líquido contendo IBA (7 mg.L⁻¹), com 45 g/L de sacarose, conforme Tabelas 4, 5 e 6, com 40 repetições.

Os embriões foram mantidos por 30 dias no escuro, posteriormente iluminados com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro) e transferido para o mesmo meio sem regulador de crescimento.

Tratamento - Y₃(2) - Meio de cultura Y₃. Meio sólido (2,3 g/L de Phytigel), sem regulador de crescimento, com 60 g/L de sacarose, conforme tabela 4, 5 e 6, com 40 repetições.

Os embriões foram mantidos por 30 dias no escuro e posteriormente iluminados com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro) e densidade de fluxo fotossintético (DFFF) de 47 μ mol.m⁻². s⁻².

Tratamento - MS(0) – Meio de cultura MS. Meio líquido, sem regulador de crescimento, com 60 g/L de sacarose e 100 mg.L⁻¹ de Ascorbato de Sódio, conforme tabela 4, 5 e 6, com 40 repetições.

Os embriões foram mantidos por 30 dias no escuro e posteriormente iluminados com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro), sob densidade de fluxo fotossintético (DFFF) de 47 μ mol.m⁻². s⁻².

Tabela 4. Concentração de vitaminas e aminoácidos nos tratamentos Y₃(1), Y₃(2) e MS.

Componentes	Y ₃ (1)	Y ₃ (2)	MS
Meso-inositol	100	----	100
Piridoxina-HCl	0,05	0,05	1
Tiamina-HCl	0,05	0,05	1
Ácido nicotínico	0,05	0,05	1
Ca-D-pantotenato	0,05	----	1
Biotina	0,05	0,05	0,01
Ácido fólico	----	0,05	----
Glicina	----	1	----
Ascorbato Sódio	----	----	100

Tabela 5. Concentração de sacarose e Phytigel nos tratamentos Y₃(1), Y₃(2) e MS.

Componentes	Y ₃ (1)	Y ₃ (2)	MS (0)
Sacarose	45	60	60
Phytigel	0	2,3	0

Tabela 6. Concentração de regulador de crescimento nos tratamentos Y₃(1), Y₃(2) e MS.

Componentes	Y ₃ (1)	Y ₃ (2)	MS (0)
Regulador de crescimento	Concentração (mg.L ⁻¹)		
IBA	7	----	----

Tratamento - MS(1) a MS(16) – Foi utilizado meio de cultura MS com agente gelificante (2,3 g/L de Phytigel), 30 g/L de sacarose e concentrações crescentes de Giberelina (GA) (0, 2, 4 e 6 mg.L⁻¹) e concentrações crescentes de BAP (0, 2 e 4 mg.L⁻¹), conforme tabela 7.

Os embriões foram mantidos por 30 dias no escuro e posteriormente iluminados com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro).

Tabela 7. Tratamentos com concentrações crescentes de GA e BAP.(mg.L⁻¹)

BAP	GA			
	0	2	4	6
0	MS(1)	MS(2)	MS(3)	MS(4)
2	MS(5)	MS(6)	MS(7)	MS(8)
4	MS(9)	MS(10)	MS(11)	MS(12)
8	MS(13)	MS(14)	MS(15)	MS(16)

Tratamentos MS(17) a MS(20) – Meio de cultura MS. Meio sólido (2,3 g/L de Phytigel), com 30 g/L de sacarose e concentrações crescentes de caseína hidrolisada (0, 100, 300 e 900 mg.L⁻¹), conforme tabela 8.

Os embriões foram mantidos por 30 dias no escuro, posteriormente iluminados com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro) e densidade de fluxo fotossintético (DFFF) de $47 \mu \text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$.

Tabela 8. Tratamento com concentrações crescentes de caseína hidrolizada (mg.L^{-1}).

Caseína	Tramento
0	MS(17)
100	MS(18)
300	MS(19)
900	MS(20)

Tratamentos MS(21) a MS(32) - Meio de cultura MS, sólido com 2,3 g/L de Phytigel, 30 g/L de sacarose, concentrações crescentes de AIA (0, 1 e 2 mg.L^{-1}) e concentrações crescentes de BAP (0, 1, 2 e 3 mg.L^{-1}), conforme tabela 9.

Os embriões foram mantidos por 30 dias no escuro, posteriormente iluminados com fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro) e densidade de fluxo fotossintético (DFFF) de $47 \mu \text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$.

Tabela 9. Tratamentos com concentrações crescentes de AIA e BAP(mg.L^{-1}).

BAP	AIA		
	0	1	2
0	MS(21)	MS(22)	MS(23)
1	MS(24)	MS(25)	MS(26)
2	MS(27)	MS(28)	MS(29)
3	MS(30)	MS(31)	MS(32)

3.1.3 Avaliação dos resultados

A avaliação foi feita atribuindo-se nota de 0 a 5 aos embriões, sendo:

- a) Nota zero atribuída ao embrião que não obteve nenhum desenvolvimento;
- b) Nota 1 para embrião com tamanho entre 1cm e 2 cm;
- c) nota 2 para embrião com tamanho maior que 2 cm mas sem início de germinação;
- d) Nota 3 para embrião com início de desenvolvimento da parte aérea ou radícula;
- e) Nota 4 para início de desenvolvimento sistema aéreo e radicular;
- f) Nota 5 para embrião com o sistema radicular e aéreo maior que 2 cm.

A avaliação foi iniciada aos 30 dias da inoculação a cada 30 dias durante 120 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Regeneração de embriões

Visando regenerar embriões zigóticos *in vitro*, este trabalho teve como objetivo testar diferentes meios de cultura, a quantidade e o tipo de regulador vegetal.

Os resultados mostraram que os meios de cultura sem reguladores vegetais mostraram-se mais efetivos e sem a ocorrência de oxidação do explante.

Plântulas bem desenvolvidas foram obtidas após 4 meses de inoculação (Fig. 3), possibilitando a transferência para condição *ex vitro*.



Figura 3 - Aspecto da planta desenvolvida *in vitro* cultivada em meio nutritivo Y₃(2) – 8 meses de cultivo.

O meio de cultura mais utilizado para palmeiras é o MS completo (Tisserat, 1987) ou modificado (Nwankwo & Krikorian, 1986). Cutter & Wilson (1954) cultivaram embriões de coqueiro em vários meios de cultura para elucidar o papel do endosperma durante o crescimento do embrião, observando um aumento em tamanho, mas o desenvolvimento dos brotos e raízes foram muito lentos. Gupta et al. (1986), obtiveram plantas completas, desenvolvidas de embriões zigóticos da variedade West Coast Tall em meio de cultura líquido Y3 básico (Eeuwens 1976) suplementado com água de coco, BA e ANA.

Para a cultura de embriões de coqueiro anão a inclusão de reguladores vegetais no meio de cultura ocasionou o início da germinação, mas posterior escurecimento e morte dos embriões (Figura 4).

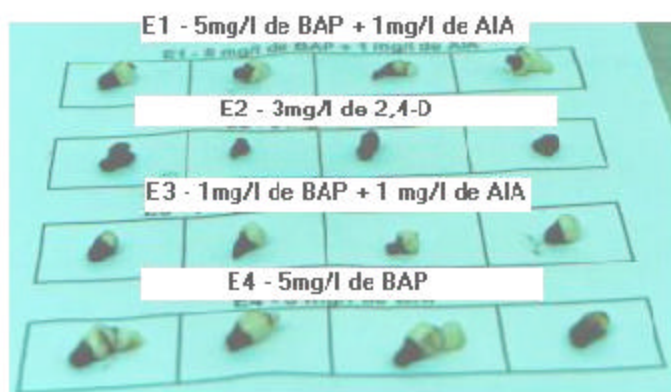


Figura 4 - Embriões com 90 dias de cultivo em meio de cultura MS, com diferentes combinações de reguladores vegetais.

No presente ensaio o meio de cultura Y₃ líquido (Eeuwens 1976) favoreceu a germinação dos embriões e o desenvolvimento de plântulas.

A adição de carvão ativado foi indispensável para todos os meios testados, mostrando-se eficiente na eliminação do escurecimento causado pela oxidação.

Rillo & Paloma (1990) reportaram que a adição de carvão ativado no meio de germinação é essencial para a otimização da germinação.

O carvão ativado possui a capacidade de adsorver substâncias tóxicas liberadas pelos explantes ou que, casualmente, são adicionadas ao meio de cultura através de seus componentes, a exemplo das contidas no agar, sacarose e sais. É de se supor que o crescimento e desenvolvimento dos embriões sejam favorecidos quando componentes inibitórios são adsorvidos pelo carvão ativado (Debergh, 1983).

Segundo Choo (1984), estas oxidações prejudicam a germinação e também o desenvolvimento da plântula. Este escurecimento é atribuído aos produtos da oxidação de compostos fenólicos os quais inibem o crescimento da planta.

De Guzman & Manuel (1977), adicionando 1% de carvão ativado ao meio de cultura aumentaram grandemente a porcentagem de germinação, enraizamento e desenvolvimento das brotações.

Fridborg & Erikson (1975) e Fridborg et al. (1978) concluíram que além de remover substâncias como ácido fenilacético e ácido p-OH-benzóico em cenoura; ácido 2,6-OH-benzóico em *Allium*, ácido benzóico em *Pelargônio* e caprilico em *Haplopappus* do meio de cultura, o carvão ativado também poderia remover as auxinas do meio de cultura.

4.1.1 **Influência dos componentes dos meios de cultura**

Ocorreram diferenças na germinação e no desenvolvimento dos embriões nos meios MS e Y₃ como também ocorreram diferenças entre os tratamentos Y₃ e Y₃ modificado (Fig.5 e 6).

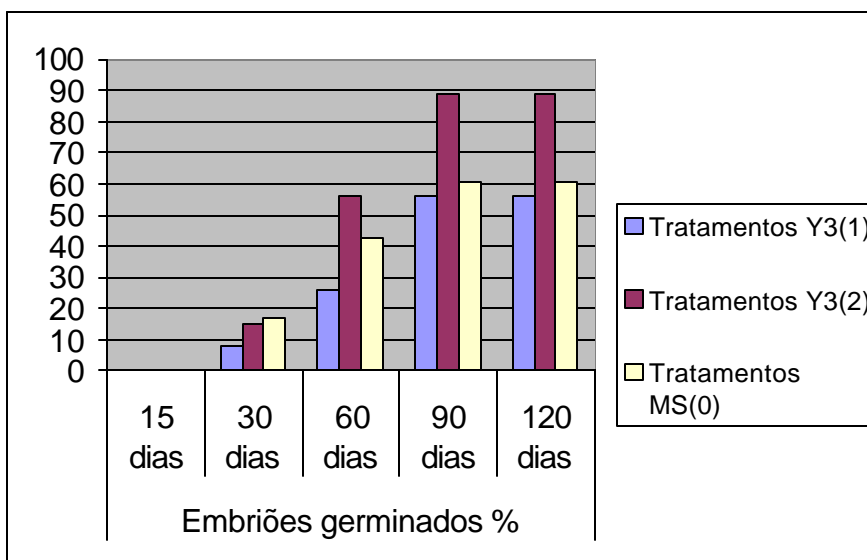


Figura 5 - Porcentagem de embriões de coco germinados aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo.

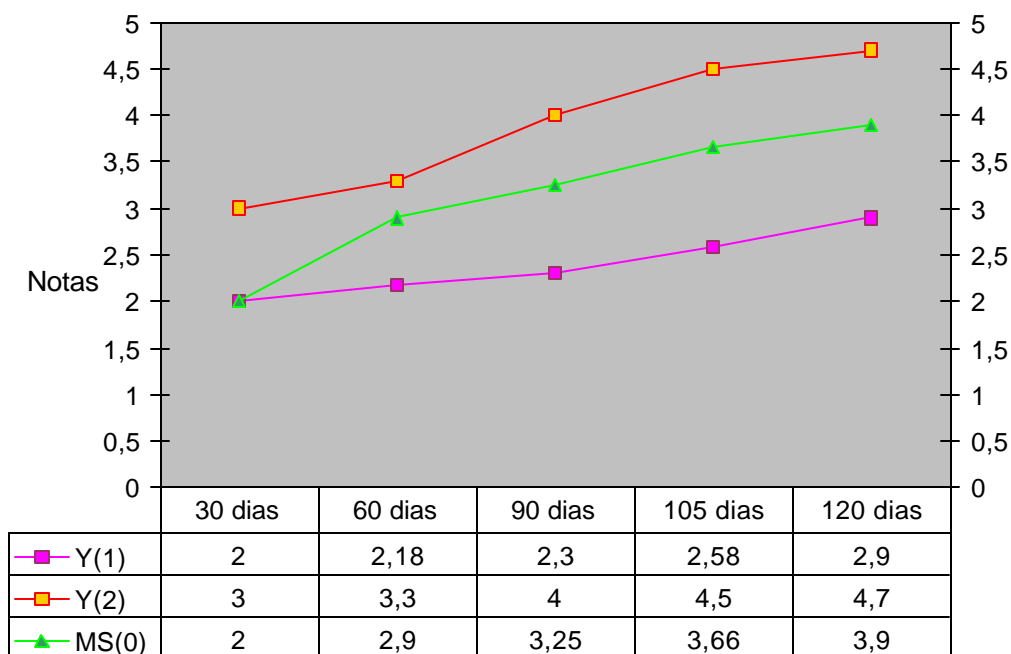


Figura 6 - Avaliação através de observações visuais do efeito do meio de cultura no desenvolvimento dos embriões zigóticos.

Como se pode observar pelas Figuras 5 e 6, o meio Y3(2) foi o que produziu melhor rendimento na germinação do embrião de coco. O meio Y3(2) contém fhytagel e mais sacarose que o meio Y3(1), e não contém regulador de crescimento, nem mio inositol. Também contém 3 vezes mais ferro que o meio Y2(1) e o aminoácido glicina.

O mio-inositol é um hexitol, um composto cíclico com grupos –OH em todos os seus seis carbonos que foi muito testado em cultura de tecidos vegetal (White, 1937), sendo um componente da maioria dos meios utilizados atualmente.

Moore (1982), observa que o inositol é incorporado às moléculas de fosfolípidios que compõem a estrutura da membrana plasmática e, talvez, de outras membranas celulares. A sua ação na conjugação de auxinas forma o composto auxina-inositol, que é inativo como regulador de crescimento. Quando a auxina é novamente liberada, volta a exercer os seus efeitos sobre o desenvolvimento e crescimento das células (Cohen & Bandurski, 1982).

O aminoácido glicina é um componente padrão da maioria dos meios de cultura, White (1943), Murashige e Skoog (1962) e Gamborg et al. (1968), apresentando efeito benéfico no crescimento de raiz *in vitro* (White, 1939, Bonner, 1940), não estimulando, porém, o crescimento de calos (Linsmaier & Skoog, 1968).

O ferro pertence a uma faixa intermediária entre os macronutrientes e os micronutrientes, pois normalmente é exigido em concentrações intermediárias entre os mesmos e, diferentemente dos outros nutrientes, não é absorvido como íon livre do meio nutritivo (Street et al., 1952). A forma utilizada nos meios de cultura é a de quelato de ferro com EDTA, este é absorvido com facilidade pela célula (White, 1942; Heller, 1965). Na forma não complexada ao EDTA, o ferro formaria quelatos com substâncias orgânicas, liberadas pelo explante no meio (Heller, 1965).

A ausência de inositol no meio nutritivo $Y_3(2)$ não se mostrou limitante, pois não prejudicou a germinação, o desenvolvimento dos embriões e a formação de plântulas. A ausência do aminoácido glicina nos meios nutritivos $Y_3(1)$ e $MS(0)$, pode ter sido limitante, pois os embriões nestes meios apresentaram um retardamento no desenvolvimento quando comparado com o tratamento $Y_3(2)$, que possuía 1 mg/L deste aminoácido (Figuras 5 e 6).

A alta concentração de Fe_2SO_4 pode ter favorecido o desenvolvimento dos embriões, pois o tratamento $Y_3(2)$ com $41,7 \text{ mg.L}^{-1}$ teve melhor desempenho que os tratamentos $MS(0)$ com $24,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e $Y_3(1)$ com $13,9 \text{ mg/L}$.

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar determinou as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Dependendo do explante a concentração de sacarose mais usada é 3% (p/v) (Caldas et al., 1998).

De Guzman et al. (1976), aumentando o nível de açúcar para 8% durante a segunda fase da cultura obtiveram um melhor desenvolvimento radicular do embrião e conseqüentemente maior chance de sobrevivência. Em um estudo subseqüente Del Rosário & De Guzman (1976), mostraram que níveis crescentes de açúcar no meio White líquido durante a cultura inicial aumentaram a germinação e o desenvolvimento de raízes dos embriões quando estes eram transferidos para meio MS sólido com 4% de sacarose, concluindo que parte do açúcar teria agido como um agente osmótico.

Gallo (1974) também encontrou que a sacarose adicionada ao meio de cultura em concentrações crescentes favoreceu o crescimento e o desenvolvimento de embriões de feijoeiro.

Verdeil et al. (1997), em experimento testando diferentes concentrações de sacarose (20, 30, 60, 90 e 120 g/L) demonstraram que os níveis de sacarose influenciam diretamente a germinação dos embriões. A

porcentagem de germinação é maior com 60 g/L de sacarose. Nesta concentração 70% dos embriões germinaram em 2 meses contra 44% de germinação no meio contendo 20 g/L de sacarose. Após seis meses de cultura o crescimento radicular mais satisfatório foi observado em plântulas no tratamento com 60 g/L de sacarose.

Mkumbo et al., (1997) armazenaram embriões zigóticos maduros (11 a 12 meses) de *Cocos nucifera* da variedade "East African Tall" *in vitro* por 6 meses. Varias concentrações de sacarose (0, 20, 40, 60 e 80 g/L), foram testadas em 2 tipos de meios (MS e Y3 ± carvão ativado). Durante o armazenamento foram avaliados os ganhos em comprimento, espessura e peso. Os embriões foram testados a cada 2 meses para avaliação da viabilidade.

Em coqueiro, os embriões nos meios de cultura MS(0) e Y₃(2) contendo 60 g/L de sacarose apresentaram melhor desenvolvimento, mostrando que a cultura *in vitro* de coqueiro necessita uma concentração de sacarose superior à maioria das culturas.

4.1.2 Utilização de reguladores vegetais

Para se verificar o efeito da adição de reguladores vegetais no crescimento e desenvolvimento dos embriões de coco, experimentos comparativos foram conduzidos usando concentrações crescentes de giberelina, auxinas e citocininas.

As giberelinas estão presentes em todas as plantas, podendo ser detectadas em folhas, caules, raízes, sementes, embriões e pólenes. Parece ser sintetizada nas mesmas regiões das plantas onde são sintetizadas as auxinas, isto é, ápice do caule, folha em crescimento, semente e embriões em desenvolvimento (Taiz, 1998).

O ácido giberélico tem sido utilizado na conversão de embriões somáticos em plantas. A presença de GA estimulou a formação de raiz em

embriões somáticos de nucelo de *Citrus* (Button & Borgnman, 1971). Verificou-se também o estímulo do enraizamento de embriões somáticos de *citrus* (Kochba et al., 1974).

As citocininas são substâncias reguladoras do crescimento que causam divisão celular nas plantas, estando envolvidas na diferenciação, alongamento celular, crescimento e senescência foliar, dominância apical, germinação, desenvolvimento de organelas, atividade enzimática, abertura estomática, desenvolvimento de frutos e hidrólise de reservas de sementes (Taiz, 1998).

De Gusman & Del Rosário (1964) mostraram que um explante de embrião de coqueiro era capaz de germinar quando cultivado em meio White sólido, e em pesquisas posteriores De Gusman (1970) conseguiu uma melhora na germinação e no desenvolvimento do embrião suplementando o meio MS com 15% de água de coco e giberelina.

Os tratamentos com concentrações crescentes de giberelina e BAP (MS(1) a MS(16)), mostraram-se com um bom desenvolvimento inicial, com brotação apical e primórdios radiculares, os quais foram mais intensos nos meios de cultura MS(0), MS(2) e MS(9). Em todos os tratamentos ocorreu intumescimento inicial fazendo com que os embriões dobrassem ou até mesmo triplicassem de tamanho nos primeiros 15 dias permanecendo com coloração clara até o início da germinação por volta de 30 dias, quando então iniciou-se um processo de escurecimento (Figura 9). Por volta de 60 dias ocorreu a paralisação do desenvolvimento dos brotos e posterior oxidação e morte dos mesmos (Figuras 7 e 8).

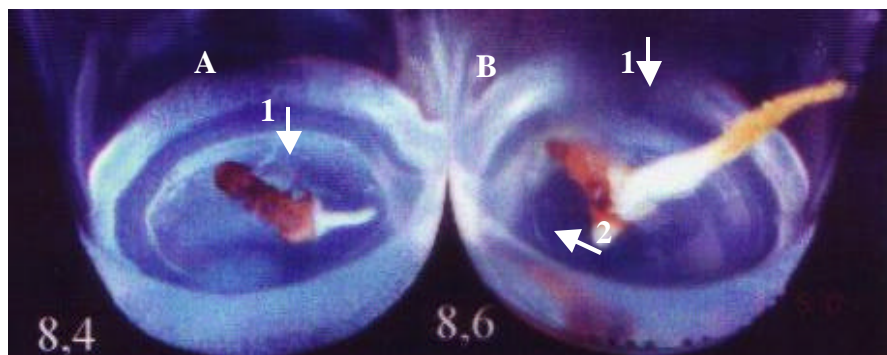


Figura 7 - Germinação de embrião em meio nutritivo. A: MS + 8mg/L de BAP + 4mg/L de GA. B: MS + 8mg/L de BAP + 6 mg/L de GA. 1: início do desenvolvimento da parte aérea. 2: Primórdios radiculares – 60 dias de cultivo. Seta 1, início da oxidação da parte aérea

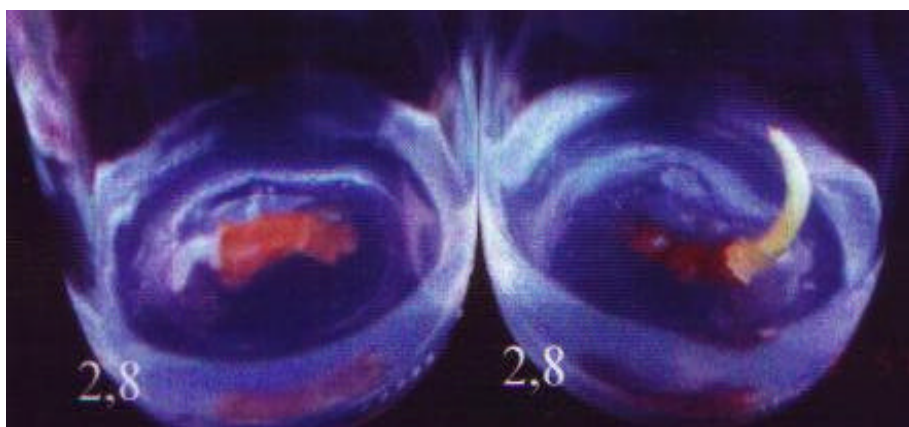


Figura 8. Germinação do embrião de coqueiro em meio nutritivo MS + 2mg/L de BAP + 8mg/L de GA, e aos 60 dias de cultivo.

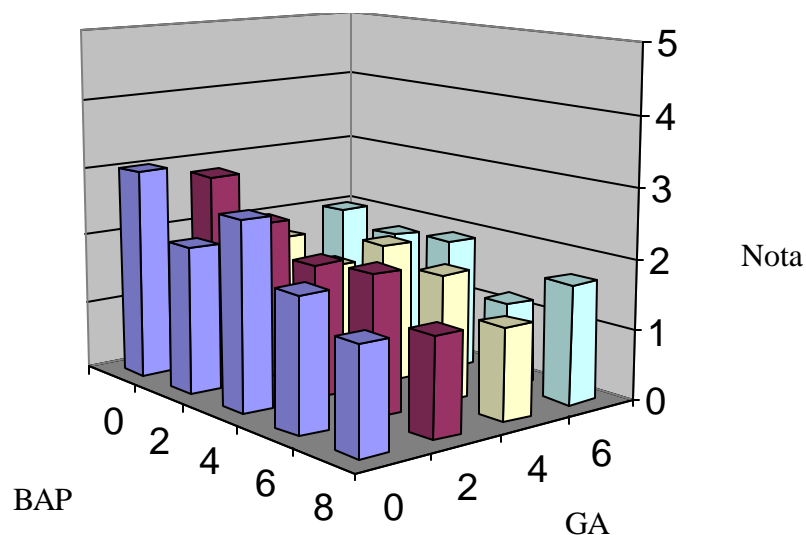


Figura 9 - Efeito de GA e do BAP e sua relação na regeneração de embriões. Avaliação através de nota (0 - ruim a 5 - ótimo) após 60 dias de cultivo.

A caseína hidrolisada é comumente utilizada para estimular o crescimento e o amadurecimento do embrião (Hu et al., 1998), porém a sua presença em concentrações crescentes de caseína hidrolisada (0, 100, 300 e 900 mg/L) nos tratamentos (MS(17) a MS(20)) apresentaram resultados sofríveis (Figura 10), mesmo nos estágios iniciais. Ocorreu início de emissão de brotação apical, apesar de pouco intumescimento (Figura 10 e 11). Em algumas amostras ocorreram sinais de formação de calosidade, porém estas não progrediram e o material oxidou e morreu entre 30 e 60 dias.

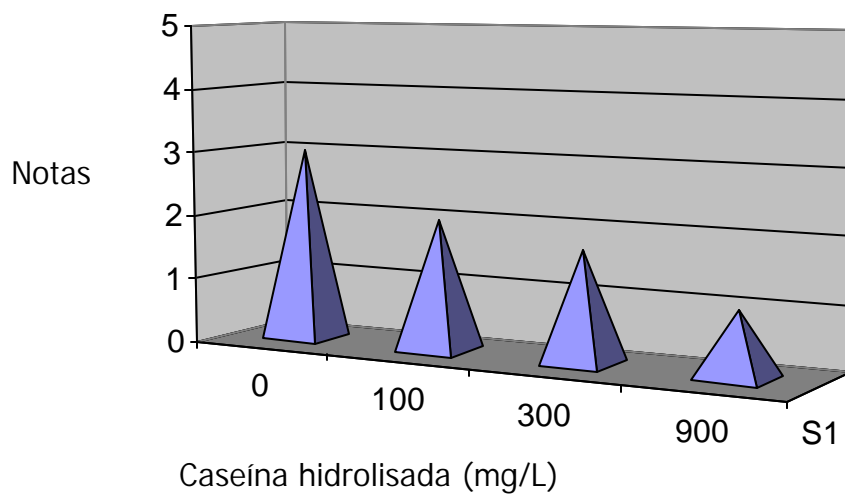


Figura 10 - Efeito da adição de caseína hidrolisada ao meio de cultura MS. Avaliação através de notas(zero a cinco) aos 60 dias de germinação.

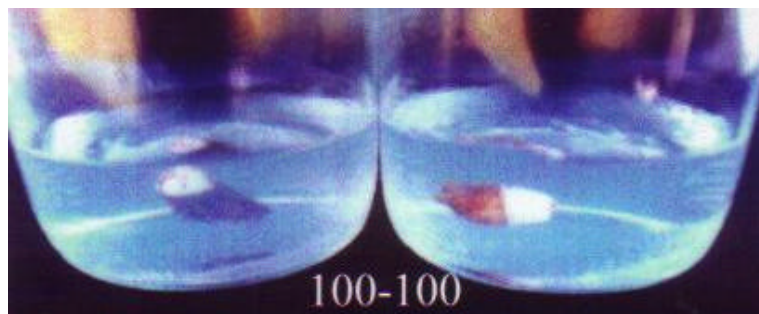


Figura 11 - Embriões em meio nutritivo MS + 100 mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada aos 45 dias de cultivo.

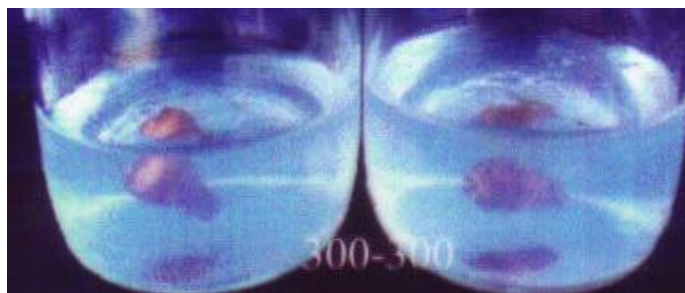


Figura 12 - Embriões em meio nutritivo MS + 300mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada aos 45 dias de cultivo.

A maioria dos eventos fisiológicos e dos mecanismos de expansão celular acontecem relacionados com a ação da auxina. Além disso, tanto a auxina como a citocinina se diferem dos outros reguladores vegetais e de agentes sinalizadores em um importante aspecto: elas são necessárias para a viabilidade do vegetal. Assim sendo, nenhum mutante que tenha perdido a capacidade de sintetizar algum destes reguladores foi encontrado até hoje, sugerindo que a eliminação destes seja letal. Considerando que todos os reguladores vegetais parecem atuar como uma chave de liga e desliga que regula processos específicos de desenvolvimento conforme a necessidade, a auxina e a citocinina parecem ser requeridas em vários níveis continuamente (Taiz, 1998).

Em *Euterpe edulis* (Jussara) foi obtida a germinação normal de embriões em concentrações de até 50mg/L de 2,4-D (Guerra & Handro, 1988).

Karun et al.(1998) utilizando meio Y₃ suplementado com 1 mg/L de BAP testou ANA em concentrações de 0,5; 1 e 1,5 mg/L, e IBA em concentrações de 1; 2 e 5 mg/L. A suplementação de IBA (5mg/L) e ANA (1 mg/L) resultou num melhor desenvolvimento do sistema radicular de embriões zigóticos.

Verdeil et al. (1998), testou ANA buscando a indução de neoformação de raízes em brotações de embrião somático com 6 meses de cultivo. O melhor tratamento obtido foi utilizando meio MS modificado (MI 502) complementado com 20 mg/L de ANA na presença de 2 g/L de carvão ativado.

Os tratamentos MS (21) a MS (32) com concentrações crescentes de AIA (0, 1 e 2 mg/l) e BAP (0, 1, 2 e 3 mg/l) apresentaram pequenas diferenças entre si, mostrando apenas um início de brotação. Isto ocorreu sem o intumescimento e o desenvolvimento do embrião. Este princípio de brotação não progrediu, porém manteve-se com coloração clara enquanto o restante do embrião paulatinamente escurecia e definhava; este quadro manteve-se por 180

dias quando iniciou a degeneração do embrião mostrando-se ineficaz na regeneração de embrião de coco (Figura 13).

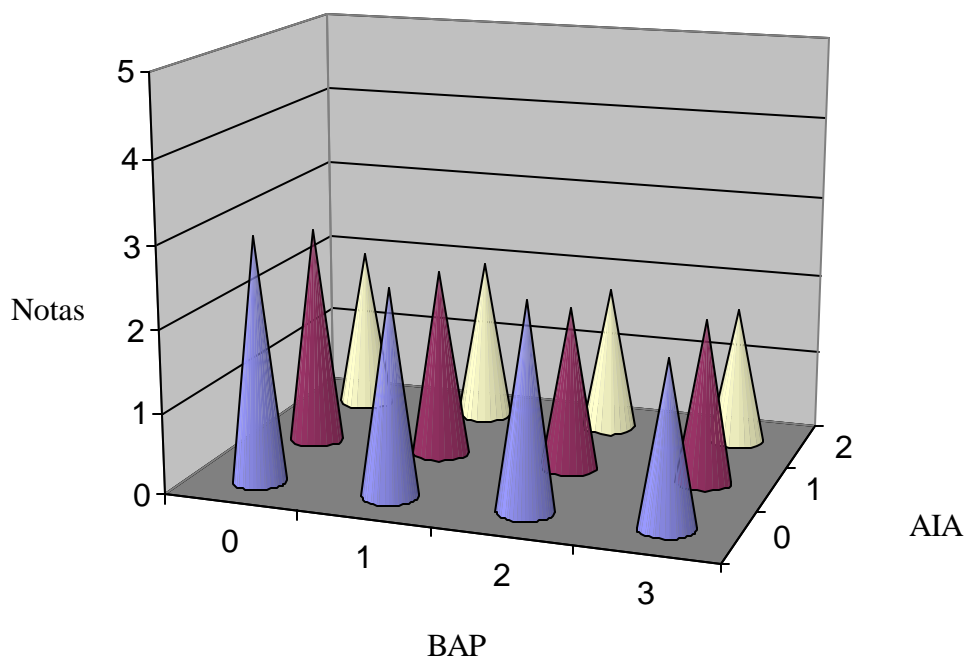


Figura 13 - Efeito do AIA e do BAP e sua relação na regeneração de embriões. Avaliação através de notas (zero a cinco) após 60 dias de cultivo.

O meio de cultura MS(0) teve uma taxa de germinação inferior à taxa do meio Y3(2) Porém, quando comparado com os outros tratamentos em que foram utilizados o meio MS juntamente com reguladores vegetais, o MS(0) apresentou formação de plântulas completas (Figura 14). Os tratamentos na presença de reguladores vegetais não apresentaram formações completas de plântulas, apenas em alguns casos ocorreu o início da formação da parte aérea, sem a formação do sistema radicular, sendo que o desenvolvimento da parte aérea não ultrapassou os primeiros estágios, morrendo por problemas de oxidação (Figura 15 e 16).

Entre os tratamentos que resultaram em plântulas, o meio de cultura Y3(1), foi o que apresentou o menor desempenho. Deve-se salientar que este meio de cultura, dentre os três testados, era o único que possuía reguladores vegetais (7mg/L de IBA) nos primeiros 20 dias de cultivo.



Figura 14 - Plântulas de coqueiro com 125 dias e 12 cm, desenvolvidas em meio nutritivo MS (0) na presença de carvão ativo.



Figura 15 - Embrião de coqueiro com 90 dias em MS + 3 mg/L de BAP.



Figura 16 - Embrião de coqueiro aos 60 dias em MS +2 mg/L de AIA+3 mg/L de BAP.

Mkumbo et al. (1997), utilizou meios MS e Y₃ em combinação com diferentes reguladores vegetais observando que os mesmos não tiveram influência significativa na germinação do embrião e na subsequente regeneração da plântula quando comparado com meio sem regulador vegetal.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na manipulação *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L. nas condições do presente trabalho, permitem as seguintes conclusões:

- A adição de reguladores vegetais em qualquer das concentrações estudadas não favoreceu o desenvolvimento dos embriões.
- A utilização de carvão ativado é indispensável no controle da oxidação.
- A sacarose na concentração de 60 g.L⁻¹ mostrou os melhores resultados, indicando que a cultura de embriões de *Cocos nucifera* requer uma quantidade de sacarose superior à maioria das culturas.
- A utilização de caseína hidrolisada mostrou-se prejudicial em qualquer das concentrações utilizadas.
- O meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) mostrou-se superior ao meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), para a germinação de embriões.
- Os explantes provenientes de coqueiros de variedade anã mostraram desenvolvimento *in vitro* muito superior aos provenientes de coqueiros de variedade gigante.

- A presença de glicina, a ausência de mio-inositol e elevada concentração de Fe-NaEDTA demonstrou os melhores resultados no desenvolvimento do embrião.
- O meio de cultura Y₃(2) determinou o melhor resultado para obtenção de plantas completas a partir de embrião, indicando ser o ideal para a manipulação de gemoplasmas de coqueiro *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS, A.; THOMAS, K. J. A note on the in vitro culture of excised coconut embryos. **Indian Coconut Journal**, v.15, p.84-87, 1962.

AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.), **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breeding**. New York: Academic Press, 1983. v.I, p.82-123.

ANIKUMAR, K.S; WAHIDE, P. A. La réposition des racines actives chez le cocotier. **Oléagineux**, v.49, n. 8/9, p 337-339, 1988.

ANZALDO, F.E.; KINTANAR, Q.L.; RECIO, P.M.; VELASCO, R.U.; CRUZ de la, F.; JACALNE, A.Coconut Water as intravenous fluid. **Philippine Journal of Pediatrics**, v.24, p.143-166, 1975.

ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E., A.; ÂNGELO, P. C. S.; RIBEIRO, F.E. **Seleção de cultivares de coqueiro para diferentes ecossistemas do Brasil**. <http://www.cpatsa.embrapa.br/livrorg/coco.doc>. (23 de maio de 2002).

- ASSY BAH, B. Culture in vitro d'embrions de cocutier (*Cocos nucifera*): méthode, révisée et simplifiée, d' obtention de plants de cocotieers transférables au champ. **Oléagineux**, v.44, n.11, p. 515-523, 1989.
- ASSY BAH, A.; Culture in vitro d'embryons zygotiques de cocotiers: **Oleagineux**, v. 41, n.7, p. 321-328, 1986.
- BEGG, U.; TURNER, N. Crop water déficitis. **Advances in Agronomy**, v. 28, p.161-207, 1976.
- BHALLA, S.N.; BAGGA, S.; SOPORY, S.K.; GUHA, M. S.: Induction and differentiation of callus from embryos of *Cocos nucifera* L. by IAA-conjugates. **Plant-Cell-Reports**, v.5, p. 322-324. 1986.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. Boston: M. Nyhoff / Dr. W. Junk, 1985. p.34-35.
- BRACKPOOL, A. L.; BRANTON, R. L.; BLAKE, J. Regeneration in palms. In: VASIL, I. A. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plant**. Orlando: Academic Press, 1986. v.3, p.207-222.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Alerta quarentenário**. <http://200.252.165.21/ddiv/quarentenaalerta01.htm>. (25 de maio 2002).
- BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. Development, of nuclear plants from unpollinated and unfertilized ovule of the Washington navel orange *in vitro*. **Journal of South African Botany**, v.37, p127-134, 1971.

BUTTON, J.; KOCHBA, J. Tissue culture in the citrus industry. In: REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977, v.90, p.70-92.

CALDAS, S.L.; HARIDASAN, P.FERREIRA, E.M. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, S.L.; BUSSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. v.2, p. 2, p.87-114.

CHOO, W.K. Palm tissue culture. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE, TECHNOLOGY AND UTILIZATION, Norway, 1984. **Leiciopropagation of selected rootcrops palm, citrus and ornamental species**: proceedings. Norway: FAO, 1984. p.39-48.

COELHO, A.F.S. Regeneração de plantas de espécies cítricas a partir do cultivo de óvulos in vitro. Viçosa, 1997. 67p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa.

COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Chemistry and physiology of the bound auxins. **Annual Review of Plant Physiology**, v.33, p.403-430, 1982.

CROCOMO, O. J.; CABRAL, J. B. Interspecific hybridization in Phaseolus: embryo axis culture. In: COCOMO, O. J.; TAVARES, F.C.A.; EVANS, W.R.; BRANO, J.E.; PADDOCK, E.F. **Biotechnology of plants and microorganisms**. Columbus: Ohio State Univ. Press, 1995. p.95-96.

- CUENCA, M. A. G. Importância econômica do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. cap. 1, p.17-18.
- CUTTER, V. M.; WILSON, K. S. Effect of coconut endosperm and other growth simuleants, upon the development in vitro of embryos of *Cocos nucifera*. **Botanical Gazzete**, v. 115, p. 234-240, 1954.
- DE GUSMAN, E. V. The growth and developmente of coconut "Macapuno" embryo in vitro: the inducion of rooting. **Philippine Agriculture**, v.53, p. 65-78, 1971.
- DE GUZMAN, E.V.; MA NOEL, G.C. Improved root growth in embryo and seedling culture of Makapuno coconut by incorporation of actived charcoal in the growth medium. **Philippine Journal of Coconut Studies**, v.2,n.1, p.35-39, 1977.
- DE GUZMAN, E.V.; DEL ROSARIO, A.G.; EUZEBIO, E.C. The growth and developmente of Makapuno coconut embryo *in vitro*. III. Resumption of root growth in high sugar media. 1971. **Philippine Agriculture**, v.53, p.566-579, 1971.
- DEL ROSARIO, A.G.; DE GUZMAN, E.V. The growth of Makapuno coconut embryos *in vitro* as affected by mineral composition and sugar level of the medium during the liquid and solid culture. **Philippine Journal of Science**, v.105, p.215-222, 1981a.

- DEL ROSÁRIO, A. G.; DE GUZMAN, E. V. The status of plant tissue culture in the Philippines. In: SYMPOSIUM ON TISSUE CULTURE OF ECONOMICALLY IMPORTANT PLANTS, Singapore, 1981. **Proceeding**. Singapore: COSTED, 1981b. p.293-294.
- DELBERGH, P.C. Effects of Agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.270-276, 1983.
- EEUWENS, C. J. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explant from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. **Plant Physiology**, v.42, p. 173-178, 1977.
- FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C.K.A.: Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis - **Plant-Science**, v.151, n.2, p. 193-198, 2000.
- FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F.; SANTANA, D. L. Q.; MOURA, J. I. L.; SOUZA, L. A.; Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. cap. 4, p.189-254.
- FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, A. L. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, CPATC, 1998. 292p.
- FLECHTMANN, C.H.N. **Ácaros de importância agrícola**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1979. 189 p.

- FONTE, R. H.; CINTRA, F. L. D.; CARVALHO FILHO, M. C. Implantação e manejo da cultura do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. cap. 5, p.99-110.
- FRÉMOND, Y.; ZILLER, R.; NUCÉ de LAMOTHE, M. de. **Le cocotier**. Paris: Maisonneuve & Larose, 1966.267 p.
- FRIDBORG, G.; ERIKSSON, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, v.34 p.308-310, 1975.
- FRISON, E.A., PUTTER, C. A. J.; DIEKMANN, M. **FAO/IBPGR**.technical guidelines for the safe movement of coconut germplasm. Rome: IBGR, 1994. 15p.
- GALLO, L. A. Atividade da enzima sintetase de glutamina em embriões de feijão cultivados in vitro.Piracicaba, 1994. 124p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GALLO, L.A., CROCOMO, O.J. Developmental control of Phaseolus vulgaris using embryo axys cultures, **Energia Nuclear na Agricultura**, v.1, p.55-58, 1979.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p. 151-158, 1968.

- GENTY, P.; REYES, E. Un nouvel acarieu du palmier à huile 1 'Eriophyidae Retracrus elaeis Keifer. **Oléagineux**, v.32, n.6, p.254-262, 1977.
- GRIFFIS, J.L. JR.; LITZ, R.E.; TOPPER, C.P.; CALIGARI, P.D.S.; KULLAYA, A.K.; SHOMARI, S.H.; KASUGA, L.J.; MASAWA, P.A.L.; MPUNAMI, A.A. In: INTERNATIONAL CASHEW AND COCONUT CONFERENCE: trees for life - the key to development, Tanzania, 1998. **Proceedings**. Tanzania: BioHybrids International, 1998. p.349-357.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo culture of *Euterpe edulis* Mart. (PALMAE). **Plant Cell Reports**, v.7, p.550-552, 1998.
- HELLER, R. Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue culture. In: WHITE, P.R.; GROVE, A.R., (Ed). **INTERNACIONAL CONFERENCE ON PLANT TISSUE CULTURE**, 11., Berkeley, 1965. **Proceedings**. Berkeley: McCutchan, 1965. P.1-17.
- HOCHER, V.; VERDEIL, J.L.; GROSDÉMANGE, F.; HUET, C.; BOURDEIX, R.; N'CHO, Y.; SANGARE, A.; HOMNUNG, R.; JACOBSEN, H.J.; RILLO, E.; OROPEZA, C.; HAMON, S. Ácido abscísico induzindo embriogênese somática em explantes de embriões imaturos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Cahiers-Agricultures**, v.7, n.6, p. 499-505, 1998.
- HU, C.Y.; FERREIRA A.G. Cultura de embriões. TORRES, A.C.; CALDAS, S.L.; BUSSO, J.A. In: TORRES, A.C.; CALDAS, S.L.; BUSSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. v.2. Pt. 2, p.371-382.

- JOLY, P. Le genre *Sphaerodothis*. **Bulletin Research Council of Israel**, v.10, p.187-193, 1961.
- JULIA, J.F.; MARIAN, D. Deux espèces de *Sogatella* vectrices (Homoptère Delphacidae) de la maladie de la pourriture sèche du couer de jeunes cocotiers en Côte d' Ivoire. **Oléagineux**, v.37, n.1, p.517-520, 1982.
- KARUN, A.; UPADHYAY, A.; PARTHASARATHY, V.A. Status of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in India. In: WORKSHOP ON EMBRYO CULTURE, 1., albay, 1998. **Coconut Embryo *In Vitro* Culture: Proceedings**. Albay: IPGRI; APO, 1998. p.29-30.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHBA, M. Simulation of rooting of *Citrus* embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, v.38, p.795-802, 1974.
- LEVER, R.J.A.W. **Pests of the coconut palm**. Rome: FAO,1969, 190 p.
- LIM-SYLIANCO, C.Y.; MALLORCA, R.; SERRAME, E.; WU,L.S.. A Comparison of Germ Cell Antigenotoxic Activity of Non-Dietary and Dietary Coconut Oil and Soybean Oil. **Philippine Journal of Coconut Studies**, v.17, n.2 p.1-5, 1992.
- LIMA, M.F. de; SANTANA, D.L.Q. Ocorrência da broca-da-ráquis-foliar, *Amerhínus ynca* Shaib. (Coleoptera: Curculionidae) em coqueiros no Estado de Sergipe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9, Recife, 1991. **Resumos**. Recife: SEB, 1991. p.135.

- LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.18, p.100-127, 1965.
- LLERAS, E. Acrocomia, um gênero com grande potencial. EMBRAPA, CENARGEN, Brasília, v1, p. 3-5, 1985.
- LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M.W. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v.34, p.137-161, 1983.
- LORDELLO, L.G.E.; ZAMITH, A.P.L. Constatação da moléstia do anel-vermelho do coqueiro no Estado do Rio de Janeiro: redescricao do agente causador. **Anais da ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUÍZ DE QUEIROZ**, v.1 1, p.125-132, 1954.
- MACALALAG JR., E.V.; MACALALAG, M.L.; MACALALAG, A.L.; PEREZ, E.B., CRUZ, L.V.; VALENSUELA, L.B.; BUSTAMANTE, M.M.; MACALALAG, M.E. Buko water of immature coconut is a universal urinary stone solvent. In: PACIFIC COCONUT COMMUNITY CONFERENCE, Albay, 1997. **Proceedings**. Albay: BioHybrids International, 1997. p. 34-48.
- MARKEY, K.S. Mbocayá of Paraguay cocopalms: an important source of oil. **Economic Botany**, v.10, p.3-32, 1956.

MKUMBO, K.E.; HOMNUNG, R.K.W.; TOPPER, C.P.; CALIGARI, P.D.S.; KULLAYA-
AK; SHOMARI, S.H.; KASUGA, L.J.; MASAWA, P.A.L.; MPUNAMI, A.A. Status
of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in
Tanzania. In: INTERNATIONAL CASHEW AND COCONUT CONFERENCE:
trees for life - the key to development, Dar es Salaam, 1998. **Proceedings**.
Tanzania: BioHybrids International, 1998. p. 358-361.

MOORE Jr., T.S. Phospholipid biosynthesis. **Annual Review of Plant
Physiology**, v.33, p.235-259, 1982.

MURASHIGE, T. SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bioassays
with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497,
1962.

OHLER, J.G. Disease. In: OHLER, J.G. **Coconut, tree of life**. Rome: FAO, 1984.
cap. 8, p.262-301.

PANNETIER, C.; BUFFARD-MOREL, J. First results for somatic embryo production
from leaf tissue of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Oléagineux**, v.37, n.6,
p.349-354, 1986.

PASSO, E. E. M. Ecofisiologia do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK,
D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília:
Embrapa, SPI, 1998. cap. 3, p.65-78.

PERSLEY, G. P. **Replanting the tree of life**: towards an international agenda
for coconut palm research. Wallingford: CAB; ACIAR, 1992, 156 p.

- RENARD, J. L. **Rapport de mission de defense de cultures au Brésil: le cocotier**. Brasília: Embrapa; CIRA; IRHO, 1998. 22p. (IRHO. Document, 2171).
- RENARD, J.L. Le Hartrot du cocotier caractérisation et moyens de lutte. **Oléagineux**, v.44, n.10, p.475-484, 1989.
- REYNOLDS, J.F. Vegetative propagation of palm tees. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed). **Tissue culture forestry**. Dortrecht: Martinus Nijhoff, 1982. p.182-207.
- RILLO, E.P.; PALOMA, M.B.F. Comparison of three media formulations for *in vitro* culture of coconut embryos. **Oléagineux**, v.45, p.319-323. 1990.
- ROBBS, C.F.; CHIACCHIO, F.P.; COSTA, J.M. da; SHARMA, R. D. **Relatório de grupo de pesquisa sobre a queima-das-folhas do coqueiro**. Aracaju: Embrapa, UEPAE, 1975. 8p.
- ROGNON, F. Biologie floral du cocotier, durée et succession des phases mâles et femelles chez divers types de cocotiers. **Oléagineux**, v.31, n.1, p.13-18, 1976.

- ROSAS, L.S.; ACEVEDO, J.L.R.; BARAJAS, R.B. Valoracion dei dano causado por Eriophyes (Aceria) guerreronis a una huerta de palma de coco (Cocos nucifera) donde se aplico Hirsutella thompsonii. In: TALLER INTERNACIONAL SOBRE LOS ACAROS Y OTRAS PLAGAS DEL COCOTERO Y SUS POSSIBLES METODOS DE LUCHA, I., Guantánamo, 1992. **Resumenes**. Habana: Centro de Informacion y Documentacion Agropecuario del Instituto de Investigaciones de Cítricos e otros Frutales, 1992. p.266.
- SAGARÉ, A.; ROGNON, F.; NUCÉ de LAMOTHE, M. De. Les phases mâles et femelles de l'inflorescence de cocotier: influence sur le mode de production. **Oléagineux**, v.33, n.12, p.609-617, 1978.
- SAMOSIR, Y.M.S.; GODWIN, I.D.; ADKINS, S.W.; DREW, R.A.: A report on the culture of embryos of dwarf coconut, Cocos nucifera L. var. nana in vitro. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY OF TROPICAL AND SUBTROPICAL SPECIES. **Proceedings, ActaHorticulturae**, n.30. p.467-474, 1998.
- SANGARÉ, A.; ROGNON, F.; NUCÉ de LAMOTHE, M. de. Lês phases mâles et femelles de l'inflorescence de cocotier: influence sur lê mode de production. **Oléagineux**, v.33, n.12, p.609-617, 1978.
- SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; SONDAHL, M.R. Application on somatic embryogenesis to crop improvement. In:INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE CULTURE, 5., Tokyo, 1982. **Proceedings**. Tokyo: Japan Assoc. for Plant Tissue Culture, 1982. p. 759-762.

- SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, v.2, p.269-310, 1980.
- SILVA, A.G. da; GONCALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONCALVES, A.J.L.; GOMES, J; SILVA, M. do N.; SIMONI, L. de. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitas e predadores. Rio de Janeiro: Serviço de Defesa Sanitária Vegetal, v.1, pt.2,. 622p. 1968.
- SIQUEIRA, E. R.; RIBEIRO, F. E.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. . Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. cap. 4, p.73-84.
- SLATYER, R. O. **Plant water relationships**. London: Academic Press, 1967, 366p.
- STREET, H.E.; MELHUIISH, F.M. Nitrogen nutrition of excised root. The release of amino acids by growing root cultures. In: INTERNATIONAL COFERENCE ON PLANT TISSUE CULTURE, Berkeley, 1965. **Proceedings**. Berkeley: Mc Cutchan, 1965. P. 25-43.
- SUBILEAU, C. Systématique et biologie du complexe parasitaire constitue du Phyllachora torrendiella (Bat.) nov. comb. et du Botryosphaeria cocogena nov. sp., agents fongiques du dessèchement foliaire du cocotier au Brésil. Paris, 1993. 121p. Thèse (Docteur) - Université Paris.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 792p.

- TISSERAT, B. Palms. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p.339-356.
- TISSERAT, B. Date palm. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant, cell culture**. New York: Mcmillan, 1994. V.2, p.505-545.
- TOMAZ, M.L. Embriogenese somática em Citrus spp. Piracicaba, 2000. 60p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- VASIL, V.; VASIL, I.K. Isolation and culture of cereal protoplasts II. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of Pennisetum Americanum. **Theoretical and Applied Genetics**, v.56, p.97-99, 1980.
- VERDEIL, J.L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD, M.J. Coconut Embryo *in vitro* culture. **Plant-Cell-Reports**, v. 13, p.218-221, 1994.
- VERDEIL, J.L.; HOCHER, K.; TRIQUES, K. LYAKURWA, A.; DURAND-GASSELIN, T.; EMGELMANN, A.; SANGARE, A.; HAMON, S. Status of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in India. In: WORKSHOP ON EMBRYO CULTURE, 1., albay, 1998. **Coconut Embryo In Vitro Culture: Proceedings**. Albay: IPGRI; APO, 1998. p.17-21.
- WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. 292p.

- WARWICK, D. A. N.; LEAL, E. C.; RAM, C.; Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S. F.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília: Embrapa, SPI, 1998. cap. 4, p.269-288.
- WARWICK, D.R.N.; RENARD, J.L.; BLAHA, G. La queima das folhas du cocotier. **Plantations, Recherche, Développement**, v. I, n.2, p.57-62, 1994.
- WHITE, P.R. Vitamin B₁ in the nutrition of excised tomato root. **Plant Physiology**, v.12, p.803-811, 1937.
- WHITE, P. R. Plant tissue culture. **Annual Review of Biochemistry**, v.11, p.615-628, 1942.
- WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: J. Cotter, 1943. N.p.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.
- WILLIAMS, E.G.; VERRY, I.M.; WILLIAMS, W.M. Use of embryo culture in interspecific hybridization. In: VASIL, I.K.; SCOWCROFT, W. R.; FREY, K.J., (Ed.) **Plant improvement and somatic cell genetics**. New York: Academic Press, 1982. p. 1 19-128.
- YEOMAN, M.M. Early development in callus cultures. **International Journal of Cytology**,v.29, p.283-409, 1970.