

VIABILIDADE DO USO DE DIFERENTES EXPLANTES
E VARIEDADES DE MANGA (*Mangifera indica* L.)
EM CULTURA DE TECIDO

ADRIANA PINHEIRO MARTINELLI RODRIGUEZ
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. SALIM SIMÃO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Fitotecnia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1989

VIABILIDADE DO USO DE DIFERENTES EXPLANTES
E VARIEDADES DE MANGA (*Mangifera indica* L.)
EM CULTURA DE TECIDO

ADRIANA PINHEIRO MARTINELLI RODRIGUEZ

Aprovada em:10/10/1989

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Salim Simão ESALQ/USP

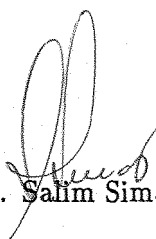
Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves ESALQ/USP

Prof. Dr. Célio Soares Moreira ESALQ/USP

Suplentes:

Prof. Dr. Vladimir Rodrigues Sampaio ESALQ/USP

Prof. Dr. Eduardo Castanho Ferraz ESALQ/USP


Prof. Dr. Salim Simão

Orientador

Aos meus pais, **Julieta e Dante**, e
irmãos, **Valeria e Dante**, ofereço;

ao meu marido, **Luiz**, e aos meus fi-
lhos, **Fernando e Eduardo**, dedico
este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Salim Simão** expresso meus maiores agradecimentos pela dedicada e segura orientação, e pela presença constante ao longo das diferentes fases, com apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. **Antonio Natal Gonçalves** pela amizade, colaboração e incentivo, colocando à disposição o Laboratório de Cultura de Tecidos, indispensável à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Célio Soares Moreira**, pelas valiosas sugestões e atenção constante, tanto de sua parte, como de sua família.

Ao Prof. **Marcilio de Almeida** pela realização dos cortes histológicos e por valiosas sugestões em diferentes ocasiões importantes.

Aos Professores Dr. **Hiroshi Kimati** e Dr. **Mario Tomazello Filho** pelo auxílio na realização das fotografias.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Castanho Ferraz** pela cessão de grande parte do material vegetal.

Ao Prof. Dr. **Décio Barbin** pelo apoio e incentivo constantes, colaborando sempre de forma prestativa.

Ao técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos do DCF/ESALQ, **José Roberto Romanini**, pelo auxílio na instalação e acompanhamento dos testes laboratoriais.

Aos amigos e colegas do curso de Pós-graduação, pela convivência e amizade, em especial a **Carmen Silvia Vieira Janeiro Neves**, pela revisão dos manuscritos e sugestões.

Ao Departamento de Horticultura da ESALQ/USP, professores e funcionários, pela prestatividade e atenção, sempre que se fez necessário.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP e do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF, pela acolhida e colaboração, e por permitir a realização deste trabalho em suas dependências.

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pelas incansáveis buscas de material bibliográfico.

Às funcionárias da Secretaria de Pós Graduação da ESALQ, pela atenção.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade de aprimoramento.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela concessão de 30 meses de bolsa de Mestrado I e II, e pelo auxílio à pesquisa, para aquisição de material de laboratório.

À **Elizabeth Zambello**, em seu nome e de suas funcionárias, pela dedicação e carinho dispensados aos meus filhos, sempre proporcionando tranquilidade.

Aos meus pais, **Julieta e Dante Martinelli**, a quem devo minha formação, agradeço toda a colaboração e sugestões durante a realização deste trabalho, e principalmente tanta atenção e carinho em todos os momentos.

Aos meus irmãos, **Valeria Martinelli Lourenzi e Dante Pinheiro Martinelli**, pela preocupação constante e tantos bons momentos de convivência.

Ao meu marido, **Luiz Carlos E. Rodriguez**, agradeço de modo especial pelo apoio carinhoso, sempre demonstrando confiança e segurança, indispensáveis em todos os momentos.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Aspectos Gerais da Cultura da Mangueira	7
2.1.1. Morfologia	7
2.1.2. Biologia	8
2.1.2.1. Crescimento Vegetativo	8
2.1.2.2. Florescimento	9
2.1.2.3. Frutificação	13
2.1.3. Métodos de Propagação	15
2.1.3.1. Alporquia e Estaquia	17
2.1.3.2. Enxertia	19
2.1.3.2.1. Encostia	21
2.1.3.2.2. Garfagem	22
2.1.3.2.3. Borbulhia	26
2.1.4. Problemas Fitossanitários	26
2.1.5. Melhoramento Genético e Conservação de Germoplasma	29
2.2. Histórico da Cultura de Tecidos em Manga	32
2.3. Aplicações da Cultura de Tecidos em Manga	39
2.3.1. Propagação	40
2.3.2. Melhoramento Genético	43
2.3.3. Conservação e Transporte de Germoplasma	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Antecedentes	47
3.2. Testes de cultivo <i>in vitro</i>	48
3.2.1. Testes \varnothing 1 e 2	48
3.2.2. Testes \varnothing 3 e 4	50
3.2.3. Teste \varnothing 5	51

3.2.4. Teste α 6	52
3.2.5. Teste α 7 e 8	52
3.2.6. Teste α 9	52
3.3. Material Vegetal	53
3.3.1. Origem	53
3.3.2. Tratamentos fitossanitários efetuados no campo	54
3.3.3. Coleta dos ramos e frutos e preparo dos explantes	55
3.4. Preparo, Esterilização e Inoculação dos Explantes	57
3.4.1. Meios de Cultura	57
3.4.2. Esterilização e Inoculação dos Explantes	60
3.5. Número de Explantes em cada Teste	61
3.6. Reinoculação dos Explantes	61
3.7. Condições Ambientais	63
3.8. Avaliação dos Testes	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1. Cultura de cotilédone e de eixo embrionário	65
4.2. Cultura de embrião imaturo	80
4.3. Cultura de limbo foliar	81
4.4. Cultura de segmentos nodais com gema axilar	81
4.5. Comentários finais e sugestões	85
5. CONCLUSÕES	87
6. LITERATURA CITADA	88

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Cultivo in vitro de eixo embrionário de manga, variedade Santa Alexandrina , mostrando seu desenvolvimento	68
2. Cultivo in vitro de eixo embrionário de manga, variedade Imperial, mostrando a formação de calo e organogênese indireta	71
3. Cultivo in vitro de eixo embrionário de manga, variedade Imperial, mostrando a formação de calo e organogênese indireta	72
4. Detalhe do explante de eixo embrionário de manga, variedade Imperial, apresentado na Figura 3 (escala 4:1)	73
5. Corte longitudinal de explante de manga variedade Imperial, mostrando parte do tecido cotiledonar, tecido de calo, embrião somático e estrutura de gema adventícea (aumento de 100 vezes)	75
6. Corte longitudinal de explante de manga variedade Imperial, mostrando a formação de estrutura de gema adventícea (aumento de 400 vezes)	76
7. Corte transversal de raiz obtida a partir de calo de manga variedade Imperial, cultivado in vitro (aumento de 100 vezes)	77
8. Embriogênese somática de manga variedade Oliveira Neto obtida a partir de calo proveniente de cultura de eixo embrionário	79
9. Cultura in vitro de limbo foliar de manga variedade Tommy Atkins (escala 4:1)	82
10. Detalhe de um explante de segmento nodal de manga variedade Tommy Atkins, mostrando a região de abscisão do pecíolo com formação de calo, e a abertura das estípulas com a gema axilar entumescida	84

LISTA DE QUADROS

	Pág.
1. Resumo dos testes de cultivo <i>in vitro</i> realizados com explantes de manga	49
2. Tratamentos fitossanitários realizados nas mangueiras variedade Tommy Atkins	55
3. Meios de cultura utilizados nos testes de cultivo <i>in vitro</i> de manga	59
4. Número de explantes utilizados em cada teste de cultivo <i>in vitro</i> de manga	62
5. Reinoculações realizadas nos testes de cultivo <i>in vitro</i> de manga	63
6. Resultados obtidos em cultura de cotilédone de três variedades de manga <i>in vitro</i> , em número de explantes (teste nº 1)	66
7. Resultados obtidos em cultura de eixo embrionário de três variedades de manga <i>in vitro</i> , em número de explantes (teste nº 2)	67

VIABILIDADE DO USO DE DIFERENTES EXPLANTES
E VARIEDADES DE MANGA (*Mangifera indica* L.)
EM CULTURA DE TECIDO

AUTORA: ADRIANA PINHEIRO MARTINELLI RODRIGUEZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. SALIM SIMÃO

RESUMO:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da cultura de tecidos para a propagação de variedades de manga.

Cotilédones e eixos embrionários de ‘Santa Alexandrina’, ‘Oliveira Neto’, ‘Família’, ‘Bourbon’ e ‘Imperial’; embriões imaturos de ‘Oliveira Neto’; segmentos nodais com gema axilar de ‘Manila’, ‘Joe Welch’, ‘Sensation’ e ‘Tommy Atkins’ e limbo foliar de ‘Tommy Atkins’ foram utilizados como explantes e cultivados em meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado e suplementado com 1 mg/l AIA e 0,5 mg/l 6BAP, ou MURASHIGE & SKOOG (1962) com 1 mg/l 2,4-D.

As variedades Santa Alexandrina, Oliveira Neto e Família apresentaram desenvolvimento de raízes nas culturas estabelecidas a partir de segmentos de cotilédones. Os eixos embrionários de ‘Santa Alexandrina’ e ‘Família’ deram origem a plântulas em

meio de cultura sem reguladores de crescimento.

Calo, embrião somático e estruturas de raiz e gema foram observados em cortes histológicos na variedade Imperial, e calos e embriões somáticos na variedade Oliveira Neto, a partir de eixo embrionário em meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado e suplementado com AIA e 6BAP.

A oxidação fenólica e a periodicidade do crescimento reprodutivo dificultaram a frequência de instalação de testes de explantes provenientes de sementes, limitando a obtenção de resultados.

Nos explantes de limbo foliar de 'Tommy Atkins', foi observado o entumescimento dos tecidos, porém a oxidação fenólica impediu qualquer desenvolvimento nos explantes.

A contaminação por fungos e bactérias foi limitante para o estabelecimento das culturas a partir de explantes nodais. Observou-se nesse material, entretanto, o entumescimento dos explantes, com rachaduras, formação de calo e desenvolvimento inicial da gema axilar.

Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, sendo necessário o desenvolvimento de alternativas para minimizar os efeitos prejudiciais da oxidação e da contaminação para continuidade do uso das técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos.

VIABILITY OF THE USE OF DIFFERENT EXPLANTS
AND VARIETIES IN MANGO (*Mangifera indica* L.)
TISSUE CULTURE

AUTHOR: ADRIANA PINHEIRO MARTINELLI RODRIGUEZ

ADVISOR: Prof. Dr. SALIM SIMÃO

SUMMARY:

The aim of this work was to evaluate the viability of tissue culture for propagation of mango varieties.

Cotyledons and embryo axis of 'Santa Alexandrina', 'Oliveira Neto', 'Família', 'Bourbon' and 'Imperial'; immature embryos of 'Oliveira Neto'; nodal segments of 'Manila', 'Joe Welch', 'Sensation' and 'Tommy Atkins' and leaf blade of 'Tommy Atkins' were utilized to establish culture in GONÇALVES (1980) modified medium, supplemented with 1 mg/l of AIA and 0,5 mg/l of 6BAP or MS (1962) with 1 mg/l of 2,4-D.

The varieties Santa Alexandrina, Oliveira Neto and Família showed root growth and development in cultures established from cotyledons segments. Embryo axis of 'Santa Alexandrina' and 'Família' gave rise to plantlets in medium without growth regulators.

Callus, somatic embryos and root and shoot structures were observed in histological cuts of 'Imperial', and callus and somatic embryos were observed in 'Oliveira Neto' cultures established from embryo axis in GONÇALVES (1980) medium modified and supplemented with AIA and 6BAP.

Phenolic oxidation and the periodicity of reproductive growth were limiting for frequency and culture establishment of reproductive growth structures.

In cultures established from leaf blade of 'Tommy Atkins', explant swelling was observed, but phenolic oxidation inhibited callus growth.

The contamination by endophytic fungus and bacteria restricted the establishment of nodal cultures. However, bud swelling, basal splitting and callus induction were observed in nodal cultures.

The results were considered satisfactory and showed the need for development of alternatives to minimize the losses by phenolic oxidation and contaminants, for the continuity of the use of tissue culture for mango yield improvement.

1. INTRODUÇÃO

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma espécie tropical perene cultivada por toda a região tropical da Ásia, África e América, em alguns casos ultrapassando os limites dos trópicos.

Dos 65 gêneros e 440 espécies da família *Anacardiaceae*, no Brasil encontram-se apenas sete gêneros, com cerca de 37 espécies. Considera-se que as mangueiras cultivadas pertençam a uma única espécie, *Mangifera indica* L., porém acredita-se ser possível que algumas raças ou grupos horticulturalmente distintos representem outras espécies que não *Mangifera indica*, ou híbridos. Uma espécie provavelmente ancestral às formas cultivadas seria *Mangifera laurina*, muito semelhante a *Mangifera indica* (POPE-NOE, 1974). Além da mangueira, outras espécies frutíferas desta família mais conhecidas no Brasil são: *Anacardium occidentale* L. (cajú), *Spondia tuberosa* (imbú), *Spondia dulcis* (cajá-manga), *Spondia lutea* (cajá-mirim) e *Pistacia vera* (pistache).

DE CANDOLLE (1959) acredita que a mangueira seja cultivada pelo

homem há cerca de 4.000 anos. Entretanto, a localização exata do seu centro de origem parece ser de difícil definição. Segundo POPENOE (1974), quando introduzida em local com condições climáticas favoráveis, a mangueira apresenta uma adaptação muito rápida, adquirindo aparência de planta nativa. Por este motivo, e pelo fato de ser cultivada por toda a Índia há tantos anos, torna-se difícil determinar o local de origem desta espécie.

Segundo POPENOE (1959), a maioria das espécies do gênero *Mangifera* são nativas da região Malaia; particularmente Sumatra seria o local de origem de muitas delas. Apesar de ser cultivada há muitos anos no oeste da Índia, o autor acredita ser provável que seu local de origem seja mesmo a região leste da Índia, Assam, Burma, ou, possivelmente, a região Malaia.

Backer & Bakhuizen Van den Brink¹, citados por KNIGHT (1980) acreditam que *Mangifera indica* não seja espécie nativa da Malásia, onde ocorriam outras espécies de *Mangifera*, melhor adaptadas ao trópico úmido. Sua introdução na Malásia teria ocorrido entre 300 e 500 a.C. pelo sul da Índia, e posteriormente, no século X d.C. levada para a costa leste da África por comerciantes árabes (PURSEGLOVE, 1968).

O Brasil foi o primeiro país das Américas a cultivar a mangueira, recebendo dos portugueses as primeiras plantas provenientes da África no século XVI, sendo levada para as Antilhas em 1742, e posteriormente para o México (SIMÃO, 1971). Nos Estados Unidos, sua introdução, na Flórida, ocorreu por volta de 1861 (KNIGHT, 1980).

Atualmente a produção mundial de mangas é superada apenas pela uva, frutos cítricos, banana e maçã. A Índia é responsável por 62,86% da produção mundial de

¹ BACKER, C.A. & BAKHUIZEN VAN DEN BRINK, R.C.Jr. *Flora of Java*, v.2. N.V.P. Noordhoff, Groningen, 641p., 1965.

mangas, enquanto o Brasil, quarto produtor mundial, soma apenas 3,14% do total mundial, depois do México (5,68%) e Paquistão (5,13%) (FAO, 1987).

A mangueira se desenvolve bem em diferentes condições climáticas, porém só frutifica dentro de determinados limites de temperatura e precipitação . Temperaturas abaixo de 2°C causam sérios danos às plantas. Durante o florescimento, baixas temperaturas causam diminuição na taxa de polinização, causando injúrias nas estruturas reprodutivas. Temperaturas elevadas são prejudiciais na frutificação se acompanhadas de ventos e baixa umidade relativa, provocando elevada transpiração da planta e perda de água pelo solo (SIMÃO, 1971).

É importante a existência de um período seco anterior, e que se prolongue durante o florescimento. Segundo SILVA (1982), a diferenciação floral se processa logo após o final da estação chuvosa e o florescimento ocorre durante os meses secos. Para o pegamento dos frutos, entretanto, é indispensável a ocorrência de umidade, seja através de chuvas ou irrigação.

No Brasil a mangueira encontra condições adequadas para cultivo comercial em praticamente todo o território, com exceção da região sul, onde ocorre frequentemente queda brusca de temperatura, e faixas litorâneas de São Paulo ao Rio Grande do Sul, onde precipitação e umidade relativa são elevadas durante todo o ano.

Os frutos da mangueira, além de excelentes para consumo *in natura*, têm também boas perspectivas para industrialização, o que, além de ser uma alternativa de apresentação do produto, é uma forma de aproveitamento do excesso de produção que ocorre devido à época de produção ser concentrada em 4 a 5 meses do ano. O mercado

de suco, pickles e chutnei é ainda pequeno, porém vem aumentando à taxa de 5% ao ano (CADILLAT, 1976a e b). MEDCALF (1980) diz que há demanda de mangas brasileiras nos EUA e na Europa principalmente durante o inverno no hemisfério norte, quando há falta de mangas provenientes de outras áreas. MEDINA *et alii* (1981) citam a possibilidade de exportação da fruta *in natura* para diversos países como: Inglaterra, França, Holanda, Alemanha Ocidental e Itália, entre outros, além de compotas, néctar, geléias, aguardente e mangada.

Apesar de todo esse potencial de produção, e amplas possibilidades de exportação, são ainda, no Brasil, poucos os pomares planejados e conduzidos adequadamente para produção de frutos de qualidade elevada, dentro dos padrões internacionais. No Brasil, a falta de frutas de alta qualidade, livre de doenças, tem dificultado o desenvolvimento desse comércio (MEDCALF, 1980). DONI (1975) diz que apesar de não ter tradição na exportação de mangas, nos últimos anos o total exportado vem aumentando, sendo toda essa produção proveniente de pomares do estado de São Paulo. SIMÃO (1980) cita a existência de novos pomares implantados em Minas Gerais e projetos de instalação em Goiás. Nos outros estados, porém, a produção de mangas se restringe a quintais, pequenos pomares e plantas esparsas, a maioria das vezes de pés francos, sem caráter comercial.

SIMÃO (1980) dá ênfase à necessidade de maior dedicação ao estudo da mangueira, que apesar de ocupar o quinto lugar em área cultivada por frutíferas no país, não tem recebido a devida atenção pelos pesquisadores e fruticultores.

A mangueira apresenta uma série de problemas horticulturais que necessitam de maiores estudos e dedicação, para que se incentive o seu plantio comercial em

diversas regiões do país. Dentre eles podem ser citados: a alternância de produção, a pequena taxa de fixação de frutos e a concentração da colheita em um pequeno período do ano. Além disso, a mangueira apresenta problemas fitossanitários importantes, como a suscetibilidade à Seca da Mangueira (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted e *Hypocryphalus mangiferae* Stebbing), à Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) e ao Oídio (*Oidium mangiferae* Bert).

O melhoramento genético é uma técnica muito dificultada pelo longo período juvenil que esta espécie apresenta, entre 7 e 10 anos. Trabalhos de hibridação são perdidos pela grande porcentagem de queda de frutos após a polinização e também por ataque de insetos e doenças fúngicas. Segundo MUKHERJEE (1949), a queda de frutos jovens chega a 99%. SIMÃO (1971) afirma que somente 0,67% a 0,70% dos frutos fixados inicialmente chegam à maturação. Além disso, em variedades poliembriônicas, o embrião sexuado tem seu desenvolvimento retardado pela competição com os embriões somáticos (SIMÃO, 1971), podendo, em algumas variedades degenerar completamente (LITZ, 1986a). O estudo de técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos de manga pode ser de grande importância no auxílio aos melhoristas de plantas. Através da polinização *in vitro*, da recuperação de embriões híbridos e também pela possibilidade de obtenção de variações somaclonais que podem ser induzidas ou ocorrer naturalmente nas culturas *in vitro*, podem ser obtidas variedades melhoradas. Na conservação de germoplasma, a cultura de tecidos possibilita o armazenamento e transporte de plântulas saudáveis em pequeno espaço, com facilidade de multiplicação rápida e eliminando a necessidade da “quarentena” exigida na troca de material genético com outros países.

Além disso, o cultivo *in vitro* da mangueira pode ser importante como

método de propagação vegetativa, garantindo a produção rápida e contínua de clones com boas qualidades fitossanitárias.

Pode ser útil também no estudo da fisiologia da planta, para a compreensão dos fatores relacionados à embriogênese, à iniciação radicular e ao desenvolvimento de gemas.

A cultura de tecidos de manga é, porém, uma atividade recente, com poucos trabalhos publicados, sendo que a maioria destes se restringe à cultura de embrião e de cotilédone. No Brasil, encontrou-se apenas um trabalho inicial, realizado no CNPMF-EMBRAPA, utilizando gemas de material de campo e casa de vegetação (RELATÓRIO, 1985).

Assim, o presente trabalho foi iniciado com o objetivo de observar a viabilidade da cultura de tecidos e órgãos de manga. Para este fim realizaram-se alguns testes com diferentes tipos de explantes e variedades monoembriônicas e poliembriônicas de manga.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da cultura da mangueira

2.1.1. Morfologia

A mangueira é uma planta perene, de grande porte, com consideráveis diferenças de altura e forma da copa, entre as plantas enxertadas e as de pé franco. O tronco possui casca grossa e rugosa, com inúmeros pequenos sulcos longitudinais, de coloração escura. Os ramos primários são grossos, numerosos e o crescimento vegetativo ocorre em fluxos uniformes durante a primavera e o verão. As folhas novas apresentam diversos tons entre marron-avermelhado, bronzeado e verde claro, sendo característica de variedades. Quando maduras as folhas apresentam uma coloração verde escura, sendo inteiras, alternadas, espessas e coriáceas, variáveis em tamanho (10 a 30 cm) e geralmente lanceoladas, com pecíolo curto e grosso. As panículas são terminais e às vezes laterais, em forma piramidal, com flores hermafroditas ou estaminadas distribuídas ao longo da ráquis. Seu número varia de 400 a 17.000 flores (SIMÃO, 1971). O comprimento e a coloração das

panículas varia conforme a variedade, de 20 a 35 cm entre tonalidades avermelhadas e amarelo-esverdeadas. As flores hermafroditas possuem cálice com cinco sépalas e corola com cinco pétalas. O carpelo é apoiado em um nectário pentalobado, apresentando um estilete curto, com pequena superfície estigmática. Estão presentes cinco estames, sendo um fértil e quatro pequenos estaminódios não férteis. A única antera possui quatro lóbos com deiscência longitudinal. Os estaminódios consistem de uma massa lobada de tecido com um pequeno filamento. As flores estaminadas são iguais às hermafroditas, exceto pelo carpelo abortado (SCHOLEFIELD, 1982). Os frutos são densas drupas de forma, tamanho e coloração variáveis, com polpa espessa, podendo ser rija, sucosa ou amanteigada, com ou sem fibras, que podem ser longas ou curtas, duras ou macias, conforme a variedade. O caroço apresenta um endocarpo lenhoso, com ou sem sulcos e fibras, testa e tegma papiráceos, podendo ser monoembriônico ou poliembriônico, com cotilédones em forma e tamanho desiguais.

2.1.2. Biologia

2.1.2.1. Crescimento Vegetativo

A mangueira se diferencia da maioria das espécies por apresentar um hábito vegetativo distribuído em surtos periódicos. Esses surtos variam em número, geralmente ocorrendo entre o fim do inverno e o início do outono, sendo influenciado pelas condições climáticas, tratos culturais e variedades (BUELL, 1954 e SIMÃO, 1960a). O primeiro surto vegetativo, que geralmente ocorre em agosto nas condições de clima tropical de São Paulo, é o mais intenso (SIMÃO, 1960a e 1980), sendo seguido por outros em outubro, dezembro e fevereiro, em ordem decrescente de intensidade. Esses surtos vegetativos são diretamente responsáveis pelo florescimento da mangueira, pois a diferenciação

de gemas floríferas ocorre somente em ramos novos.

Vários autores como BUELL (1954), NAKASONE *et alii* (1955) e PRASAD & PATAK (1970), citam a necessidade de um período de maturação dos ramos vegetativos para que a diferenciação floral possa ocorrer. SIMÃO (1971) afirma que o florescimento somente ocorre em ramos com idade entre 4 e 18 meses. O mesmo autor (SIMÃO, 1982) observa ainda que os ramos com idade inferior a 4 meses não apresentam gemas floríferas diferenciadas e que os ramos com mais de 18 meses ou já frutificaram, ou se encontram dominados pelos ramos mais novos.

2.1.2.2. Florescimento

Assim como a vegetação, o florescimento da mangueira também se dá em fluxos. Na região de Piracicaba ocorrem geralmente três fluxos principais: em junho, outro mais intenso em agosto e um terceiro de menor intensidade em setembro, ocorrendo nos meses intermediários a formação de panículas em algumas plantas (SIMÃO, 1960a).

O início do florescimento, porém, varia conforme as condições climáticas e variedade (NAIK & RAO, 1943; RUEHLE & LEDIN, 1955; SIMÃO, 1960a e RODRIGUES *et alii*, 1977). Um período seco ou de baixa temperatura anterior ao florescimento pre-dispõe a planta a uma dormência temporária, evitando o crescimento vegetativo excessivo, favorecendo assim o florescimento (MANICA, 1981 e SIMÃO, 1982). A disponibilidade de água (MANICA, 1981) e o excesso de nitrogênio em condições de umidade adequada para absorção (BUELL, 1954) são prejudiciais ao florescimento, pois estimulam o crescimento vegetativo.

Diversos autores estudaram a relação entre o conteúdo de nitrogênio, relação C/N (carbono/nitrogênio), reservas de carboidratos e a iniciação de gemas florais. Os diferentes trabalhos mostram haver evidências de que valores elevados de nitrogênio, carboidratos e alta relação C/N, possivelmente não estão diretamente ligados ao florescimento, porém, podem criar condições favoráveis para a síntese e ação de substâncias responsáveis pela indução floral em manga (CHADHA & PAI, 1985 e SINGH, 1987).

O papel dos reguladores de crescimento no florescimento da mangueira vem sendo estudado há muitos anos. REECE *et alii* (1946 e 1949) foram os primeiros a propor o movimento de hormônios indutores de florescimento das folhas para as gemas axilares, induzindo a iniciação floral em mangueiras. Substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento podem também se mover dos frutos para as gemas laterais, inibindo seu desenvolvimento (SINGH & SINGH, 1972).

Acredita-se que as auxinas desempenhem um papel indutor do florescimento da mangueira, porém este não é o único fator, pois a aplicação exógena de auxina não induz o florescimento de manga (SINGH, 1987).

AGRAWAL *et alii* (1980) observaram em 'Dashehari' maiores quantidades de citocininas endógenas em ramos em época de florescimento, sugerindo que o balanço dessas substâncias possa estar relacionado ao florescimento, porém, o verdadeiro papel na diferenciação de gemas florais, segundo os autores, necessita maiores investigações.

A inibição do florescimento provocada pelo ácido giberélico em diversas frutíferas como pera, maçã e citros foi relatada por diversos autores (JONKERS, 1973 e SINGH, 1987). Em manga, KACHRU *et alii* (1971) inibiram parte do florescimento ou

atrasaram a emergência de panículas, através da aplicação de diferentes doses de ácido giberélico. A ação da giberelina na iniciação do florescimento, provavelmente se dá através de um bloqueio nas principais fases desse processo e sua distribuição na planta pode, mesmo parcialmente, ser responsável pela época de florescimento (JONKERS, 1973). PAL & RAM (1978) concluíram que a falha no florescimento de manga pode estar relacionada a elevados níveis de giberelinas nos ramos.

TOMER (1984) utilizou diferentes concentrações de ácido giberélico, em diferentes épocas, com o objetivo de inibir o florescimento de mangueiras nos quatro primeiros anos após o plantio. A inibição ocorreu praticamente sem variação entre as concentrações de ácido giberélico, porém, diferindo entre as variedades utilizadas.

CHADHA & PAI (1985) citam ainda a possibilidade de atraso e inibição do florescimento em manga com a aplicação de ácido giberélico, relatados por Shawky *et alii*² e Bakr *et alii*³.

Inibidores, semelhantes ao ácido abscísico também foram encontrados em ramos de mangueiras na época do florescimento (CHADHA & PAI, 1985 e SINGH, 1987), assim como teor de etileno 3 a 5 vezes maior em ramos com inflorescências do que em ramos vegetativos (SAIDHA *et alii*, 1983), sugerindo uma relação entre essas substâncias e o florescimento da mangueira.

Esses resultados demonstram que ocorre variação nos teores desses regu-

² SHAWKY, I.; ZIDAN, Z.; EL-TOMI, A. & DAHSHAN, D.I.. Effect of GA sprays on time of blooming and flowering malformation in Taimour mango. *Egyptian Journal of Horticulture*, 5(2):123-32, 1978.

³ BAKR, E.I.; ABDALLA, K.M.; MELIGI, M.A. & ISMAIL, I.A.. Floral differentiation in mango as affected by growth regulators, ringing and defoliation. *Egyptian Journal of Horticulture*, 8(2):161-6, 1981.

ladores de crescimento nos ramos, conforme seu estágio de desenvolvimento, porém, ainda não se conhece totalmente o sistema de regulação desses hormônios e sua inter-relação no caso do florescimento de mangueiras.

Para a maioria dos processos fisiológicos, como dormência, enraizamento e iniciação floral, o balanço entre determinados reguladores de crescimento é mais importante do que o nível absoluto de cada substância. Em frutíferas, as correlações de crescimento entre gemas e brotações são o resultado de um balanço hormonal delicado e os fatores que determinam se uma gema lateral vai permanecer dormente, iniciar crescimento vegetativo ou florescimento, ainda não são totalmente compreendidos (JONKERS, 1973).

Além dos fatores nutricionais e hormonais, outro item que pode afetar o florescimento em um determinado ano é a produção de frutos no ano anterior. Em geral, quando a mangueira produz uma elevada carga de frutos em um ano, o florescimento no ano seguinte é diminuído. Isto pode ocorrer pela diminuição da reserva de metabólitos nos órgãos vegetativos, provocada pela utilização dessas reservas na formação dos frutos nos anos de grande produção (CHACKO *et alii*, 1982). Na literatura, o ano de grande produção é denominado ano “on”, enquanto que o de baixa ou nenhuma produção é denominado ano “off”. Este efeito inibitório da produção de frutos sobre o florescimento no ano seguinte é de caráter varietal, pois existem variedades que florescem no ano seguinte, independentemente da carga anterior (SINGH, 1959 e 1987). Essas variedades são chamadas regulares, enquanto as que apresentam anos “on” e “off” são conhecidas como alternantes, irregulares ou bienais.

2.1.2.3. Frutificação

O sucesso na produção de frutos de manga não depende apenas de um bom florescimento. Uma mangueira produz centenas de panículas, cada uma com milhares de flores, porém, menos de 1% dos frutos inicialmente fixados se desenvolvem até a maturação (SIMÃO, 1971 e 1980).

A polinização eficiente é essencial para uma boa fixação de frutos (SINGH, 1968), porém, a queda de frutos em todos os estágios de desenvolvimento é característica da mangueira (SIMÃO, 1980 e SAMSON, 1986). Esta queda pode ocorrer tanto por problemas na polinização, como por exaustão nutricional da planta, fatores climáticos inadequados, ou problemas fitossanitários que podem ocorrer tanto no florescimento, como na fase de fixação e desenvolvimento dos frutos.

A mangueira produz inflorescências com dois tipos de flores: hermafroditas e estaminadas (MEDINA *et alii*, 1981), variando em número conforme a variedade e condições climáticas. Acredita-se que na mangueira ocorra principalmente polinização cruzada, porém alguns autores afirmam também que a auto-polinização ocorre em menor grau. SINGH *et alii* (1962), afirmam que há indícios de que as flores auto-polinizadas não produzam frutos, sendo estes abortados no período pós-fertilização. MUKHERJEE (1953) diz que, invariavelmente, nas flores auto-polinizadas ocorre degeneração do embrião nos estágios iniciais de seu desenvolvimento.

SIMÃO (1960a) observou diversas situações que criam dificuldades tanto para a auto-fecundação, como para a fecundação cruzada. Entre eles, a disposição dos órgãos florais, o período curto de deiscência das anteras, grãos de pólen pesados e agregados,

com baixa porcentagem de germinação e perda rápida da viabilidade.

O agente polinizador varia conforme as condições locais. São citados insetos como moscas, trips, vespas e formigas, sem se saber ao certo qual a real importância desses insetos para a polinização (MEDINA *et alii*, 1981 e SAMSON, 1986). A presença de nectários, como nas flores de manga, indica que os insetos são vetores da polinização cruzada; por outro lado, a polinização pelo vento é descartada, pela pequena área estigmática observada nas flores de manga (SCHOLEFIELD, 1982). Bijhouwer⁴, citado por SAMSON (1986), observou que as abelhas voavam regularmente para algumas variedades como 'Alphonso', porém raramente para outras. POPENOE (1974) considera a abelha importante na polinização, não acreditando na polinização pelo vento. SIMÃO (1980), porém, diz que apesar de ser um inseto eficiente para polinização, a abelha não visita a mangueira. O vento parece também não ser eficiente pela conformação e tamanho dos órgãos florais, restando apenas a polinização pela queda do grão de pólen por gravidade.

Os ataques de fungos, principalmente *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz. e *Oidium mangiferae*, Bert., causadores da antracnose e oídio, respectivamente, além do ácaro *Eriophyes mangiferae*, que pode provocar o embonecamento das panículas (YAMASHIRO, 1979), também são fatores que podem prejudicar tanto a polinização, como a fixação de frutos.

Entre os fatores climáticos que afetam a fixação de frutos, SIMÃO (1980) cita a luminosidade, pois a mangueira pode florescer, porém não frutifica à sombra; a temperatura, que não deve ser inferior a 15°C, para que haja germinação do grão de

⁴ BIJHOUWER, A.P.C. *En bijdrage tot de kennis omtrent bet bloeion en het vrucht dragende vermogen van den mangga (Mangifera indica)*, Wageningen. 1937.

pólen e formação do tubo polínico; e chuvas e ventos que podem danificar e derrubar flores e frutos. Os ventos fortes, chuvas pesadas e excesso de umidade são desfavoráveis à polinização, carregando os grãos de pólen, ou deixando-os pesados. A falta d'água na fase de pegamento dos frutos, porém, é fatal, provocando uma queda na produção. Além dos fatores externos como clima e problemas fitossanitários, MUKHERJEE (1953) considera o aspecto nutricional o mais importante fator interno relacionado com a queda na fase de pós-fertilização. Isto, segundo o autor, ocorre devido à concorrência entre os numerosos frutinhas formados na panícula.

2.1.3. Métodos de Propagação

A mangueira pode ser propagada por sementes, ou através de métodos de propagação vegetativa. As sementes de manga podem ser monoembriônicas ou poliembriônicas; algumas variedades apresentam os dois tipos de sementes. A monoembriônica possui apenas um embrião, sexuado, enquanto que a poliembriônica além do embrião sexuado, desenvolve vários embriões nucelares. Estes embriões dão origem a plantas idênticas à planta matriz, sendo, portanto, um tipo de propagação vegetativa.

A propagação da mangueira por sementes é ainda prática comum nos países que a cultivam. Apesar de ser um método fácil e de baixo custo, somente deve ser indicado no caso de variedades poliembriônicas, para evitar a segregação que ocorre devido aos cruzamentos e à recombinação genética nas variedades monoembriônicas, além do excessivo vigor que estas plantas apresentam, dificultando tratamentos culturais e colheita (DONADIO, 1980). MEDINA *et alii* (1981) dizem que além disso, a multiplicação da mangueira por sementes é útil para a obtenção de porta-enxertos uniformes para variedades

monoembriônicas ou matrizes selecionadas, neste caso padronizando o desempenho das plantas enxertadas.

Na Índia o tipo de propagação comercialmente utilizado é a encostia (SINGH, 1951; SOULE, 1971; KANWAR & BAJWA, 1974 e PATEL & AMIN, 1976), com exceção de West Bengal, onde o governo adotou o método de borbulhia para a propagação da mangueira (BHAN *et alii*, 1969). Os porta-enxertos geralmente são provenientes de sementes heterogêneas e desconhecidas, causando variações dentro de um mesmo clone (BASU *et alii*, 1967).

Segundo SOULE (1971), em outras regiões produtoras utilizam-se principalmente borbulhia e garfagem como métodos de propagação vegetativa da mangueira. Na Flórida, EUA, BHAN *et alii* (1969) citam a borbulhia como método mais comum. No Brasil, apesar de ser comum a existência de pomares com plantas provenientes de sementes, atualmente tem-se dado preferência a mudas enxertadas através de borbulhia ou garfagem, para a implantação de pomares comerciais.

A mangueira é conhecida como planta de difícil propagação vegetativa, quando comparada a outras espécies frutíferas como *Citrus* e abacate (SOULE, 1971). Por essas dificuldades, cuidados especiais devem ser tomados quando se pretende propagá-la vegetativamente (SIMÃO, 1971).

Para a propagação vegetativa da mangueira, diferentes métodos de alporquia, estaquia e enxertia foram testados. Segundo BHAN *et alii* (1969) a escolha de um método de propagação deve visar a produção de material uniforme, vigoroso, livre de doenças, idêntico à planta matriz. Por sua vez, o método deve ser simples, rápido e barato,

sem depender de fatores além do controle do viveirista.

2.1.3.1. Alporquia e Estaquia

A mangueira é uma espécie que apresenta dificuldades para enraizamento (BASU *et alii*, 1969; SADHU *et alii*, 1978; SADHU, 1979; SADHU & BOSE, 1980), porém, alporquia e estaquia são considerados métodos úteis para a produção de porta-enxertos clonais, com o objetivo de evitar variações no comportamento das variedades (SINGH, 1954 e MUKHERJEE *et alii*, 1965 e 1967).

SINGH (1954) acredita ser possível a indução de raízes na maioria das variedades de manga, desde que os ramos sejam novos e devidamente tratados.

MUKHERJEE & BID (1965) dizem que a alporquia não é utilizada comercialmente para a propagação da mangueira, pela baixa porcentagem de sobrevivência que o material apresenta após o plantio, mesmo que o enraizamento na planta seja elevado.

O uso de auxinas associado a um pré-tratamento como anelamento, estiolamento ou poda para forçar o desenvolvimento de ramos foi testado por diversos autores, com bons resultados para o enraizamento de estacas e alporques de manga. MUKHERJEE & BID (1965) testaram o estiolamento em alporquia de manga, variedade Langra, observando que este tratamento promoveu enraizamento (50%) mesmo sem aplicação de reguladores de crescimento. A aplicação de AIB (10.000 ppm) e ANA (5.000 ppm) em lanolina induziu 100% de enraizamento em alporquia de ramos estiolados, com sobrevivência de 95% e 90% respectivamente.

O efeito do estiolamento também foi testado em estaquia de manga por

MUKHERJEE *et alii* (1965 e 1967). Os melhores resultados foram obtidos com estiolamento em ramos novos, seguido por aplicação de AIB (5.000 ppm - lanolina), forçados a brotar através de poda. Isoladamente, o efeito da poda na porcentagem de enraizamento e na indução de maior número de raízes primárias foi mais pronunciado do que o do estiolamento. A sobrevivência das estacas foi influenciada da mesma forma, com um máximo de 82,35% de estacas enraizadas estabelecidas no tratamento de poda seguida de estiolamento. A idade da planta também exerceu influência, sendo que em todos os tratamentos, maior porcentagem de enraizamento foi obtida com ramos de plantas de quatro anos (35% a 85%) do que naqueles de plantas de dez anos (30% a 50%).

O anelamento foi utilizado por SEN *et alii* (1968) como pré-tratamento de ramos de 1, 2 e 3 anos de uma só planta de 'Himsagar' com 35 anos. Parte das estacas foram tratadas com AIB (2.000 ppm líquido e 5.000 ppm pó) e todas mantidas sob nebulização intermitente. Os melhores resultados foram com as estacas tratadas com AIB (50% a 80%), porém sem muita diferença em relação às não tratadas (40% a 70%). As estacas de ramos mais velhos apresentaram a maior porcentagem de enraizamento, segundo os autores, possivelmente pelo maior tamanho das estacas e maior número de folhas.

Diversos compostos não relacionados química e fisiologicamente com auxinas são conhecidos por influenciar a regeneração de raízes em estacas (GORTER, 1958 e 1969 e BASU *et alii*, 1969). O modo de ação dessas substâncias não é ainda completamente conhecido, porém, em manga, SADHU *et alii* (1978) obtiveram resultados que mostram que algumas substâncias como ácido hidroxibenzóico, ácido cumárico e etrel provocam um sinergismo com auxinas (AIB e ANA) na promoção de enraizamento de estacas. SADHU & BOSE (1980) observaram promoção de enraizamento significativa por

ethrel em estaquia e alporquia de manga em presença de AIB. Na ausência de AIB, o ethrel promoveu enraizamento somente em alporquia, tão efetivamente quanto o AIB sozinho.

SADHU (1979) cita autores que obtiveram um aumento no enraizamento de plantas que enraizam facilmente, através de manipulações culturais que provocam a inibição do crescimento vegetativo da planta, como carência nutricional, anelamento de ramos e pulverização com produtos retardantes de crescimento. Em manga, observou que o pré-tratamento de plantas com ethrel aumentou de 10% (testemunha) para 30% o enraizamento de estacas e de 40% para 60% em alporquia, em presença de AIB. Este aumento foi consideravelmente maior quando o autor utilizou cicocel, elevando o enraizamento para 50% e 90% em estacas e alporques, respectivamente. A qualidade do sistema radicular também foi maior quando as plantas receberam o pré-tratamento.

MUKHERJEE (1953) diz que a alporquia é um processo lento, difícil e incerto, não sendo de interesse comercial. Apesar de ter sido provada a possibilidade da estaquia como método de propagação para a mangueira, este não é utilizado comercialmente, principalmente pela lentidão no enraizamento e dificuldade de transplante das estacas enraizadas (MEDINA *et alii*, 1981).

2.1.3.2. Enxertia

Qualquer que seja o método de enxertia, um bom porta-enxerto é indispensável para a formação de um pomar comercial. Sabe-se, porém, que poucos estudos foram realizados, especialmente no Brasil, em relação à conveniência das diferentes variedades como porta-enxertos nas diferentes regiões.

No Brasil tem-se utilizado principalmente as variedades Espadinha, Rosa, Rosinha e Coquinho, disseminadas por todo o país, portanto de mais fácil aquisição (SIMÃO, 1971). Uma vantagem do uso dessas variedades é o fato de serem poliembriônicas (MEDINA *et alii*, 1981), conferindo certa uniformidade ao pomar.

MUKHERJEE (1953) diz ser razoável imaginar que determinados porta-enxertos possam exercer influência no vigor, produtividade ou outras características do enxerto, porém o assunto não foi ainda propriamente investigado, necessitando merecer maior atenção.

Os poucos dados existentes, segundo Sturrock⁵, indicam que as variedades filipinas não devem ser recomendadas para porta-enxertos, por possuírem raízes fracas. Burns & Prayag⁶ dizem que alguns tipos selvagens nas colinas Pachmari, Índia, são resistentes a geadas, qualidade que pode ser transmitida aos enxertos (citados por MUKHERJEE, 1953).

KADMAN *et alii* (1976) e GAZIT & KADMAN (1980) realizaram diversos experimentos em diferentes regiões de Israel com mais de 80 variedades, selecionando o porta-enxerto 13-1, poliembriônico, como o melhor para solos calcáreos ou irrigados com água salina.

MORAES *et alii* (1980) dão preferência à variedade Espada para porta-enxerto, pelo seu vigor, duração e, principalmente, por apresentar resistência à seca-da-mangueira.

⁵ STURROCK, D., 1944. *Notes on the mango*. Atkins Institution of the Arnold Arboretum, Cienfuegos, Cuba. 122 p.

⁶ BURNS, W. & PRAYAG, S.H., 1921. *The book of the mango*. Dep. Agr. of Bombay, Bull. 103. 98 p.

OHASHI (1984) avaliou experimento instalado em 1965 na ESALQ, Piracicaba, com sete porta-enxertos e seis variedades copa, concluindo que 'Oliveira Neto' e 'Carlota' como porta-enxertos, influenciaram maior produção. O uso da variedade Bourbon como porta-enxerto, por sua vez, coincidiu com elevada mortalidade de plantas.

SINGH *et alii* (1986) observaram o comportamento de 10 porta-enxertos poliembriônicos e 14 monoembriônicos em relação ao porte da planta, considerando 'Taimuria', 'Olour', 'Rumani', 'Nakkare' e 'Kurukkan' como porta-enxertos ananizantes.

Buscando-se alternativas para produção de mudas de manga por enxertia, é possível encontrar várias denominações para os diferentes tipos de enxertia, conforme a idade e tamanho do enxerto e porta-enxerto, e o tipo de inserção do enxerto no porta-enxerto. Todos esses tipos, porém, podem ser classificados em um dos métodos citados por MEDINA *et alii* (1981), como os mais importantes para a mangueira: encostia, garfagem e borbulhia.

2.1.3.2.1. Encostia

É o método mais comum na Índia onde vem sendo praticado há séculos. É, porém, trabalhoso, caro e lento, com muitas desvantagens e limitações, incluindo o desperdício de ramos da planta-matriz, limitada capacidade de produção de mudas a partir de uma planta, e época favorável restrita a dois ou três meses durante a estação chuvosa (BHAN *et alii*, 1969). Apesar disso, é utilizado pelos viveiristas pela sua elevada porcentagem de pegamento, simplicidade da técnica e curto período necessário para a manutenção das mudas prontas (PATEL & AMIN, 1976).

SINGH (1951) diz que através deste método leva-se dois a três anos desde a semeadura do porta-enxerto até que a muda seja levada para o campo. Visando diminuir este período, utilizou como porta-enxerto plântulas com aproximadamente um mês após início da germinação. A união completa entre partes foi observada em um mês, com 80% de sucesso. O método dispensou regas, pois foi realizado na época das chuvas (julho a setembro, na Índia), além do aproveitamento dos nutrientes da semente para a nutrição do porta-enxerto, trocando-se o torrão de terra por esfagno para manter a umidade.

Apesar das dificuldades que a encostia apresenta, envolvendo operações dispendiosas que elevam o preço da muda, MUKHERJEE (1953) acredita que para que qualquer outro método de propagação vegetativa seja aceito pelos viveiristas na Índia, terá que apresentar sucesso comprovado.

2.1.3.2.2. Garfagem

Os tipos mais comuns são os de entalhe lateral, de fenda ou cunha terminal, e de bisel ou à inglesa. No Brasil, os dois últimos são os mais comuns em garfagem de manga, por serem mais simples e de maior rendimento (MEDINA *et alii*, 1981).

PINHEIRO *et alii* (1970) obtiveram 97,1% de enxertos brotados da variedade Ubá através do método de fenda terminal e 88,9% e 88,8%, respectivamente, à ingles simples e à ingles complicado.

DURIGAN (1976), com 11 variedades obteve em média 70% em fenda terminal e 60% à ingles, ressaltando a importância da irrigação das mudas e proteção do local de enxertia até que a união se complete, evitando-se ressecamento e quebra,

principalmente pelo vento.

MOREIRA (1980) diz que, apesar de ser ainda frequente no Brasil o uso da garfagem de topo para a propagação da mangueira, com este processo leva-se dois anos ou mais até que a muda possa ser plantada.

Segundo AMIN (1978), diversos pesquisadores realizaram garfagem em ramos maduros, porém, mesmo obtendo elevada porcentagem de pegamento, o estabelecimento no campo somente é bom em condições altamente favoráveis. Visando melhorar este estabelecimento, o autor realizou garfagem de fenda terminal com garfos de 3 a 6 meses de idade, previamente desfolhados, em brotação nova de porta-enxerto de um ano. Obteve 100% de pegamento no tratamento em que deixou todas as folhas do porta-enxerto até que a união se completasse.

Posteriormente, outros trabalhos realizados na Índia estudaram a melhor época para a garfagem por este método (“softwood grafting”). PATEL & AMIN (1981) obtiveram 95% a 100% de pegamento entre maio e agosto e SINGH *et alii* (1984 e 1986), 100% em junho.

Estudos foram também realizados utilizando garfagem lateral (“vener grafting” e “side grafting”), principalmente na Índia. No Brasil, PINHEIRO *et alii* (1970) realizaram enxertia lateral com a variedade Ubá e obtiveram em média 65,5% de enxertos brotados.

KANWAR & BAJWA (1974) citam diversos autores que utilizaram a enxertia lateral, com resultados em torno de 85% de sucesso. Em seu trabalho estudaram diversos aspectos relacionados à enxertia lateral (“side grafting”) como: método de produção

de porta-enxertos, época para enxertia, tamanho e desfolhamento do garfo. Concluíram que o tamanho do garfo apresenta pequena influência no pegamento ou no tamanho da muda, porém os menores produzem união mais firme. Em relação à época, é possível realizar a garfagem lateral entre fevereiro e outubro (na Índia) com 66,67% a 90,22% de sucesso em diferentes meses. O desfolhamento prévio dos ramos da planta-matriz é dispensável caso a enxertia seja realizada na época em que as gemas estão entumecidas, ou seja, após junho.

Mais recentemente, diversos experimentos foram realizados na Índia estudando os fatores que podem influenciar o sucesso da garfagem lateral (SINGH & SRIVASTAVA, 1979a e b; KHLON & MISHRA, 1979; RAM & BIST, 1982 e DHAKAL & HODA, 1986). SINGH, *et alii* (1984 e 1986) compararam a garfagem lateral (“veneer grafting”) com garfagem em brotação nova (“softwood grafting”), e obtiveram 100% de sucesso em ambos os métodos no mês de junho, sendo a média entre abril e setembro de 81% e 70%, respectivamente.

Uma variação dos métodos tradicionais de garfagem é a enxertia precoce, ou enxertia em plântula, método que vem sendo estudado nos últimos anos para a propagação da mangueira. Neste método são utilizados porta-enxertos recém germinados, enxertados com garfos com aproximadamente o mesmo diâmetro.

BHAN *et alii* (1969) foram os primeiros a utilizar este método em manga, obtendo 75% a 85% de pegamento. Consideraram o método simples, com elevada taxa de pegamento, custo de produção sensivelmente inferior à encostia, garfagem lateral (“veneer grafting”) e borbulhia, além de obtenção da muda em menos de um ano. Segundo os autores, elevada atividade meristemática e armazenagem de nutrientes na semente promovem

rápida cicatrização dos tecidos e o enxerto se desenvolve rapidamente.

PATEL & AMIN (1976) compararam os métodos de fenda terminal, inglês e inglês complicado em enxertia precoce, durante os meses de julho a outubro em Anand (Índia). Obtiveram em média 54,29%, 51,43% e 57,86% de sucesso, respectivamente.

A importância do desfolhamento prévio do ramo da planta matriz foi estudada por MAITI & BISWAS (1980) em 14 variedades de manga. Independente da variedade, os melhores resultados foram sempre obtidos com os garfos provenientes de ramos desfolhados. As variedades Fazli, Rane Pasand e Kohinoor apresentaram as maiores porcentagens de pegamento: 96%, 94% e 90% com ramos desfolhados, e 84%, 84% e 85% com ramos sem desfolhamento prévio.

Na Nigéria, THOMAS (1981) testou o método “saddle grafting”, uma variação do método de fenda terminal onde a cunha é feita no porta-enxerto e a fenda na base do garfo. Obteve 80% a 95% de pegamento conforme a variedade, e as mudas ficaram prontas para o plantio em seis meses.

Em relação à idade do enxerto e porta-enxerto, CHAKRABARTI & SADHU (1984) observaram que porta-enxertos cinco dias após a germinação e ramos de um mês, formaram a melhor combinação, assim como garfos de 10 cm de comprimento enxertados 5 cm acima da região do colo. Não foi observada diferença entre variedades ou época de enxertia (junho a agosto). Os autores acreditam que a técnica seja promissora para a propagação vegetativa da mangueira.

2.1.3.2.3. Borbulhia

Assim como a garfagem, é um dos métodos de propagação de manga utilizados no Brasil. Na Flórida é o mais utilizado e, segundo BHAN *et alii* (1969), é seguido pelos viveiros de mudas do governo de West Bengal (Índia).

BHAN *et alii* (1969) dizem que o método apresenta 75% a 80% de sucesso, com custo de produção muito reduzido em relação à encostia. Em relação à garfagem lateral (“veneer grafting”), apresenta maior porcentagem de sucesso, principalmente em condições adversas, com ligação mais forte no local de enxertia, economia de material-copa, maior vigor das mudas e facilidade de reenxertia quando não ocorre pegamento.

No Brasil, SOARES & VEIGA (1979) obtiveram pegamento satisfatório em todos os meses do ano, com média de 87%, exceto nos meses de maio, junho e outubro, quando caiu para 30%, 32% e 60%, respectivamente.

MOREIRA (1980) também testou a borbulhia com sucesso e afirma ser interessante por reduzir o tempo de preparo da muda pela metade em relação à garfagem, além da economia de ramos da variedade a ser enxertada, de espaço, e da facilidade de manuseio da muda.

2.1.4. Problemas Fitossanitários

A mangueira, no Brasil, está sujeita a um número relativamente pequeno de pragas e doenças, porém a antracnose, o oídio, a malformação de panículas e a seca-da-mangueira são de grande importância econômica, provocando sérios prejuízos à produção.

Antracnose, oídio e malformação de panículas acarretam os maiores danos

na época do florescimento e frutificação. SIMÃO (1960b) diz que além dos fatores climáticos, as doenças são os principais fatores que reduzem a frutificação, inicialmente reduzindo a atividade da inflorescência e, finalmente, derrubando ou estragando os frutos.

A antracnose, provocada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, é tida como uma doença que provoca os maiores prejuízos à mangueira. O fungo ataca folhas, ramos, flores e frutos, porém, seus sintomas são mais notados e sentidos nos frutos (SIMÃO, 1971 e MEDINA *et alii*, 1981), sendo sem dúvida a maior causadora de podridões em pós-colheita (SAMPAIO, 1980).

A infecção inicial do fungo pode ocorrer tanto nas folhas como nas inflorescências. Na época de desenvolvimento e maturação dos frutos, quando as condições climáticas tornam-se ideais, com chuvas e temperatura elevada, os esporos do fungo escorrem das folhas ou ráquis das inflorescências para os frutos, podendo causar estrangulamento do pedúnculo, enegrecimento ou mumificação dos frutos ainda pequenos, ou as “manchas de lágrimas” em frutos desenvolvidos ou maduros (YAMASHIRO, 1979 e 1980), podendo as perdas chegar a 100% (MEDCALF, 1980).

O oídio, *Oidium mangiferae* Bert, geralmente é problema somente na floração, porém se presente desde o início da formação da inflorescência provoca queda de flores e conseqüente redução na produção. Suas lesões também facilitam a penetração de outros fungos como o da antracnose (SIMÃO, 1960b). Segundo SIMÃO (1971), sua maior incidência se dá nos meses frios, secos ou úmidos, porém as chuvas pesadas são desfavoráveis ao seu desenvolvimento (GALLI *et alii*, 1968).

A malformação ou embonecamento das panículas é uma anomalia que

ocorre na inflorescência, provocando um encurtamento irregular dos pedúnculos florais ao longo do eixo da panícula (YAMASHIRO, 1980). Khan & Khan⁷ dizem que a porcentagem de flores hermafroditas nas panículas malformadas é muito baixa, não havendo, portanto, fixação de frutos (citados por MEDINA *et alii*, 1981). YAMASHIRO (1980) diz que no Estado de São Paulo diversos autores acreditam que o problema esteja ligado à ação do ácaro das gemas *Eriophyes mangiferae* Sayed, durante o desenvolvimento da inflorescência. A causa desta anomalia, porém, não é ainda bem definida, sendo considerada por alguns autores como uma desordem fisiológica, ou causada por vírus, ou ácaro (*Eriophyes mangiferae* Sayed), ou mesmo por um fungo (*Fusarium moliniforme* Sheld) (MEDINA *et alii*, 1981).

A seca-da-mangueira é causada por uma associação entre o fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted e o coleóptero *Hypocryphalus mangiferae* Stebbing. Discute-se ainda se a responsabilidade inicial cabe ao fungo ou ao inseto. Alguns autores atribuem ao inseto o papel de vetores do fungo, enquanto outros acreditam que o inseto só perfura os ramos já atacados pelo fungo (SIMÃO, 1971 e MEDINA *et alii*, 1981). É certo, porém, que tanto o fungo, como o inseto são encontrados na planta afetada pela seca-da-mangueira, e que uma vez instalado, o fungo vai se alastrando pelos ramos, produzindo a morte dos mesmos, atingindo aos poucos toda a planta, até a morte.

SIMÃO (1971), YAMASHIRO (1979 e 1980), SAMPAIO (1980), MEDCALF (1980), RIBEIRO (1980), GRAVENA & ZACCARO (1980), OLIVEIRA (1980) e MEDINA *et alii* (1981), entre outros, apresentam medidas de controle para os problemas fitossanitários da mangueira. MEDCALF (1980), entretanto, afirma que o controle eficiente das doenças da mangueira requer a aplicação de produtos em intervalos e doses.

⁷ KHAN, M.D. & KHAN, A.H. Relation of growth on malformation of inflorescence in mangoes. *West Pakistan J. Agric. Res.*, 1(1):51-63, 1962.

apropriadas durante cerca de seis meses, entre o início do florescimento e a colheita dos frutos, sendo um tratamento bastante dispendioso e difícil para o agricultor brasileiro.

2.1.5. Melhoramento Genético e Conservação de Germoplasma

A mangueira é uma espécie que apresenta elevado grau de heterozigose, por ser de polinização cruzada. Segundo MUKHERJEE (1950), é, possivelmente, uma fruteira de origem aloploplóide, ou seja, resultado de uma hibridação interespecífica seguida pela duplicação do número de cromossomos (ALLARD, 1971).

Os estudos sobre o padrão hereditário desta fruteira são dificultados pela própria natureza da planta. Exceto por alguns híbridos F_1 , pouco se conhece sobre a herança dos caracteres. Majumder *et alii*⁸, citados por MEDINA *et alii* (1981) relatam observações feitas sobre a herança de algumas dessas características.

Na prática, além da falta de informações sobre as características citogenéticas da mangueira, os geneticistas esbarram ainda em outras dificuldades inerentes à espécie, como: longo período entre gerações, número limitado de híbridos F_1 e F_2 , reduzindo e dificultando a obtenção de informações (SINGH, 1968 e SIMÃO, 1971). SIMÃO (1971) cita ainda a poliembrião como uma dificuldade para a hibridação, pela ocorrência de morte do embrião gamético, com desenvolvimento de embriões somáticos na maioria das sementes poliembriônicas. Independente das incertezas envolvidas, a hibridação foi realizada na Flórida, à procura de novas formas de valor comercial, porém geralmente o número de plantas obtido foi pequeno (SINGH, 1968).

⁸ MAJUMDER, P.K.; SHARMA, D.K.; SINGH, R.N. & MUKHERJEE, S.K. Preliminary studies on inheritance in *Mangifera indica* L. *Acta Horticulturae*, 24:120-25, 1972.

RUEHLE & LEDIN (1955), MUKHERJEE *et alii* (1968) e MANICA *et alii* (1981) citam alguns trabalhos de hibridação realizados com a mangueira. SINGH *et alii* (1972) selecionaram dois híbridos obtidos entre milhares de flores polinizadas que combinam a excelente qualidade de fruto das variedades Dashehari e Chausa e a regularidade de produção de 'Neelum'.

A hibridação natural entre variedades, porém, é ainda responsável pela evolução varietal da manga (SIMÃO, 1971). Este processo de seleção de variedades de manga foi consideravelmente estimulado com a introdução da encostia como método de propagação vegetativa, durante o período mongólico (1650-1820), fase áurea do melhoramento da mangueira na Índia (MUKHERJEE *et alii*, 1968).

Alguns casos de mutações espontâneas têm sido detectados, como a variedade Davis-Haden que surgiu de uma mutação de gema da 'Haden' na Flórida. Roy & Sharma⁹, citados por MEDINA *et alii* (1981) também citam uma mutação de gema na variedade Hirasonia.

Diversos autores (RUEHLE & LEDIN, 1955; SINGH, 1968; SIMÃO, 1971; PURSEGLOVE, 1972 e MEDINA *et alii*, 1981) relatam os principais caracteres, nos quais a seleção e a hibridação devem se basear, para a obtenção de variedades superiores:

- produção regular, com boa produtividade;
- elevada porcentagem de flores perfeitas;
- frutos de boa qualidade, inclusive durante armazenamento;
- resistência a pragas e doenças;

⁹ ROY, R.S. & SHARMA, C. Mutation in mango (*Mangifera indica* L.). *Indian Journal of Horticulture*, 17:142-3, 1960.

- tolerância a baixas temperaturas;
- tendência a porte anão;
- produção precoce ou tardia, em relação à época de colheita.

Deve-se lembrar, porém, que o melhoramento, ou a seleção de variedades, devem ser desenvolvidos regionalmente, pois as exigências climáticas são características de cada espécie, ou mesmo de variedades, limitando a sua dispersão (SALIBE, 1971). Os problemas fitossanitários podem também variar conforme a região, ou país, como no caso da seca-da-mangueira, que vem causando grandes prejuízos no Brasil, porém, aparentemente sem importância em outros países produtores de manga.

A grande maioria das variedades de manga atualmente cultivadas são provenientes de seleções realizadas em plantas provenientes de cruzamentos ao acaso. Este tipo de melhoramento, segundo SINGH (1968) já atingiu seu limite, sendo importante que outros métodos como a hibridação e mutação de gemas sejam explorados. A indução artificial de mutação por irradiação é também um campo interessante para algumas pesquisas fundamentais.

Singh & Singh¹⁰, citados por MEDINA *et alii* (1981), alertam para a importância da variabilidade existente em outras espécies do gênero *Mangifera*, para a obtenção de novas variedades através de hibridação interespecífica, que parece ser possível pela uniformidade morfológica entre os cromossomos.

Para a implantação de um programa de melhoramento, é indispensável a existência de uma coleção de estoque genético, ou banco de germoplasma. É importante

¹⁰ SINGH, L.B. & SINGH, R.N. Variability in the mango and its significance to the production of new varieties. *Indian Journal of Horticulture*, 15:168-72, 1958.

que sejam incorporadas à coleção possíveis variações observadas, tanto no próprio local, como em outros pomares, além de outras espécies selvagens de *Mangifera*, para avaliar suas potencialidades genéticas em hibridações intervarietais e interespecíficas.

A própria introdução de material genético proveniente de outras regiões pode fornecer material de interesse para a hibridação da mangueira. Em uma introdução de variedades, estas ficam sujeitas à ação seletiva do meio ambiente, podendo alguns genes mascarados em determinada região, se manifestarem em outra; mutações também podem ocorrer em novos locais (PURSEGLOVE, 1972).

2.2. Histórico da cultura de tecidos¹¹ em manga

O estudo do cultivo *in vitro* de explantes de manga é uma técnica recente, cujos primeiros trabalhos práticos foram publicados no início da década de 80. LITZ (1987) cita a manga como uma entre muitas das frutíferas tropicais que, por serem recalcitrantes *in vitro*, receberam pouca atenção até recentemente.

MAHESHWARY & RANGASWAMY (1958) relatam a importância da cultura de embriões para o estudo da poliembrionia em *Citrus* e *Mangifera*. Os autores realizaram cultura de embriões adventíceos e de nucelos de *Citrus microcarpa*. Em relação à manga, citam um trabalho realizado por Chopra & Sachar com o objetivo de induzir embriões adventíceos em variedades monoembriônicas, através da aplicação de lanolina em óvulos fertilizados e pulverização de panículas com AIB. Observou-se uma dilatação em

¹¹ O termo cultura de tecidos vem sendo utilizado para se referir à cultura de protoplastos, células, tecidos e órgãos, sob condições assépticas (BHOJWANI & RAZDAN, 1983).

algumas células da camada inferior da epiderme da semente, porém estas não apresentavam semelhança com embriões adventícios.

A cultura de embriões de manga é novamente abordada por IVER & SUBRAMANYAM (1972). Os autores discorrem sobre as dificuldades encontradas em pesquisas visando o melhoramento genético da mangueira, especialmente trabalhos de hibridação, cujo maior obstáculo é a excessiva queda de frutos que ocorre no período pós-fertilização. O estudo de condições adequadas para o cultivo de embriões em diversos estágios de desenvolvimento possibilitará, segundo os autores, um grande aproveitamento de embriões híbridos, estimulando a realização de trabalhos de hibridação da mangueira.

RAO *et alii* (1981) realizaram cultura de tecidos cotiledonares de 11 fruteiras tropicais, entre elas a manga. Depois de preparados, os explantes foram esterilizados (10% Clorox - 1 minuto) e inoculados em meio MS básico (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com água de coco (15%), sacarose (4%), vitaminas, ANA (5 mg/l) e cinetina (2,5 a 5 mg/l). As culturas foram mantidas parte no escuro e parte no claro, sob intensidade de luz de 1,2 a 1,6 x 200 fcs e fotoperíodo de 12 horas, na mesma câmara de cultivo, à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os autores não comentam a ocorrência ou não de contaminação dos explantes. Em relação à oxidação, observou-se o escurecimento do tecido cotiledonar uma semana após a inoculação. Entre os tratamentos realizados, os autores obtiveram formação de calo e raízes com a utilização de cinetina (2,5 mg/l) e ANA (5 mg/l) no meio de cultura, sendo considerado o melhor resultado, já que com a adição de ANA (5 mg/l) somente, não houve nenhum desenvolvimento dos explantes e com cinetina (5 mg/l) houve somente formação de calo, em menor quantidade que a observada no primeiro tratamento. A ausência de luz favoreceu tanto a formação de calo quanto

de raízes. A indução de gemas foliares não foi conseguida. Com o objetivo de obtenção de melhores resultados, os autores sugeriram que sejam testadas outras combinações e concentrações de reguladores de crescimento, e o uso de BA para indução de gemas.

LITZ *et alii* publicaram em 1982 e 1984 dois artigos sobre a obtenção de embriogênese somática a partir de sementes imaturas de variedades poliembriônicas de manga.

No primeiro (LITZ *et alii*, 1982), foram utilizadas sementes imaturas de 9 variedades poliembriônicas e 1 variedade monoembriônica, removidas de frutos com dois meses após polinização. Depois de esterilizados os frutos, as sementes foram retiradas assepticamente e inoculadas em meio MS modificado da seguinte forma: metade da concentração de macronutrientes e Fe-EDTA, 400 mg/l de glutamina, 100 mg/l de ácido ascórbico, 6% de sacarose e 0,8% de agar, com ou sem água de coco (20% v/v) ou BA (1 a 2 mg/l).

Observou-se oxidação de explantes onde não havia contato com o meio de cultura, e pequena contaminação por fungos e bactérias. Embriogênese somática foi obtida a partir da massa de tecido nucelar retirada da semente e transferida para meio de cultura novo. O meio de cultura que proporcionou os melhores resultados foi o meio líquido, adicionado de água de coco (20% v/v), no qual o tecido nucelar diferenciado foi mantido, através de sub-cultura, com proliferação contínua de embriões somáticos. Não foi obtido desenvolvimento de plântulas normais a partir de embriões somáticos transferidos para meio sem água de coco. Entre as dez, apenas cinco variedades apresentaram embriogênese somática, sendo todas variedades poliembriônicas. O grau de poliembrionia parece ter influência na ocorrência da embriogênese somática, sendo esta tanto maior quanto maior

o grau de poliembrionia da variedade.

Dando continuidade a esse trabalho, os mesmos autores (LITZ *et alii*, 1984) utilizaram duas entre essas cinco variedades, 'Ono' e 'Chino', e, seguindo o mesmo procedimento de LITZ *et alii* (1982) inocularam as sementes de frutos imaturos em meio MS modificado como o anterior, acrescido de água de coco (20% v/v). Após uma a duas semanas, o nucele e os pró-embriões adventíneos foram transferidos para o mesmo meio MS modificado líquido acrescido de 2 mg/l de 2,4-D em vez de água de coco. Posteriormente, os calos nucleares foram transferidos para meio MS líquido sem reguladores de crescimento e com ou sem carvão ativado (0,5%), para indução de embriogênese somática, o que ocorreu em 6 a 8 semanas. O carvão ativado, porém, apresentou efeito prejudicial à embriogênese subsequente, observando-se a morte de vários embriões somáticos neste tratamento.

Apesar de ter sido observada alta mortalidade dos embriões somáticos (45%), estes apresentaram um elevado grau de uniformidade e, em meio MS sólido com 1-2 mg/l BA, iniciaram o processo de germinação. Houve desenvolvimento de raízes normais juntamente com alongação do hipocótilo. Entretanto, na maioria dos embriões somáticos que germinaram ocorreu desenvolvimento de embriões somáticos secundários, a partir do hipocótilo e cotilédone.

Os autores acreditam que o insucesso na regeneração dessas plântulas tenha sido motivado pela formulação inadequada do meio de crescimento e também pela exposição prolongada ao 2,4-D.

Tendo sido obtida a embriogênese somática em variedades poliembriônicas de manga, LITZ (1984b) realizou uma tentativa de indução de embriogênese somática a

partir de explantes nucelares, também nas variedades monoembriônicas. Isto porque todas as variedades horticulturalmente importantes tanto nos Estados Unidos, como na Índia, são naturalmente monoembriônicas.

Neste estudo LITZ (1984b) utilizou sementes imaturas de variedades monoembriônicas. As sementes foram abertas e retirado o nucelo para inoculação em meio MS com metade da concentração de macronutrientes, glutamina (400 mg/l), sacarose (60 g/l), ácido ascórbico (100 mg/l), agar (8 g/l) e 0 a 10 mg/l de uma das seguintes substâncias: 2,4-D, ANA, BA ou 2iP.

Em 3 a 4 semanas observou-se a formação de calo nos meios contendo auxina, em todas as variedades. Os melhores resultados foram obtidos com 'Irwin' e 'Ruby', em meio com 1 a 3 mg/l de 2,4-D. Os calos foram transferidos para o mesmo meio, sem reguladores de crescimento, para maturação dos embriões somáticos. A embriogênese somática foi observada 3 a 4 semanas após a formação do calo, somente em meio contendo 1 - 2 mg/l de 2,4-D. A eficiência na regeneração de calo diferiu conforme a variedade, mas não em relação ao estágio de desenvolvimento da semente. Os embriões somáticos foram transferidos para meio MS modificado líquido, sem regulador de crescimento, e adicionado de água de coco (20 % v/v) ou extrato de malte (400 mg/l), porém a maturação destes foi frequentemente acompanhada por necrose gradual dos cotilédones e hipocótilo, observando-se germinação limitada dos embriões somáticos.

Com esses três trabalhos, LITZ *et alii* (1982 e 1984) e LITZ (1984b), os autores obtiveram condições para obtenção de embriogênese somática a partir de explantes nucelares, porém com dificuldades na formação de plântulas.

O processo de regeneração de embriões somáticos a partir de tecido nucelar obtido em variedades poliembrionicas, parece assemelhar-se àquele obtido por RANGAN *et alii* (1969) e KOCHBA *et alii* (1972) em variedades poliembrionicas de *Citrus*.

A embriogênese somática de variedades monoembrionicas de *Citrus*, porém, ocorre diretamente no nucelo, sem passar pela fase de calo (RANGAN *et alii*, 1968), como ocorreu com explantes nucleares de variedade monoembrionica de manga (LITZ, 1984b). Por outro lado, a diferença entre variedades foi observada tanto em *Citrus* como em manga.

A partir dos resultados obtidos, LITZ (1986b) apresenta um protocolo para indução de embriogênese somática a partir de sementes imaturas de mangas poliembrionicas ou monoembrionicas. Em relação ao tipo de explante, o autor atenta para a importância da determinação do estágio ótimo para retirada do nucelo. Nas variedades poliembrionicas, o uso de embriões adventíceos como explantes pode resultar na obtenção de plantas de origem zigótica ou nucelar, exceto em variedades nas quais ocorre o aborto do embrião zigótico logo após a fertilização, como 'Carabao', 'Pico', 'Cambodiana', 'Olour' e 'Strawberry' (SINGH, 1968).

Segundo LITZ (1986b), concentrações reduzidas de macronutrientes e elevada concentração de sacarose são importantes para a embriogênese somática da mangueira, sendo o 2,4-D o regulador de crescimento mais eficiente para a indução de calo embriogênico, e o meio líquido mais eficiente do que o sólido para crescimento do calo e embriogênese somática. O uso de algum agente redutor, como ácido ascórbico, é necessário para conter a oxidação.

DEWALD *et alii* (1986) estudaram a resposta morfogênica de calo de manga com ênfase nos fatores que influenciam a produção de calo, embriogênese somática, maturação e germinação de embrião. Observaram um aumento na taxa de embriogênese somática em meio B-5, quando comparado aos meios Lloyd e Mc Cown ou MS. A adição de glutamina no meio de manutenção de calo também foi benéfica para a embriogênese somática. Houve germinação limitada de embriões somáticos em meio suplementado com água de coco (20% v/v), porém, segundo os autores, apesar da embriogênese somática ter sido obtida, a dificuldade em induzir maturação e germinação de embriões continua a limitar a regeneração desta espécie recalcitrante.

Com o objetivo de elucidar a embriogênese somática e adventícia, DEWALD & LITZ (1987) realizaram estudos histológicos e observaram que não há formação de calo verdadeiro, indiferenciado e subculturável. O “calo nucelar” se proliferou em suspensão como um agregado de embriões somáticos (“budding”) no estágio globular tardio.

No Brasil, pesquisadores do CNPMF-EMBRAPA iniciaram um trabalho de micropropagação da mangueira (RELATÓRIO, 1985), utilizando como explante gemas de material de campo e casa de vegetação. Os autores observaram elevados índices de contaminação no material proveniente do campo após esterilização com álcool, “ki-boa” e tween. Entre algumas combinações de reguladores de crescimento no meio, os melhores resultados foram observados em meio MS, com ANA (0,1 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) e ANA (0,25 mg/l) + BAP (0,5 mg/l), para desenvolvimento de plântulas; o enraizamento, porém, não foi obtido. Neste teste, o índice de contaminação foi de 0,5%, havendo liberação de compostos fenólicos dos explantes para o meio de cultura.

Apesar dos benefícios diretos e indiretos que o desenvolvimento de

técnicas de cultura de tecidos pode proporcionar à cultura da mangueira, pouco se tem feito nesse sentido. É importante que sejam planejados estudos para que, especialmente no Brasil, seja possível um melhor aproveitamento de todo o potencial que esta frutífera apresenta.

2.3. Aplicações da cultura de tecidos em mangueira

Nos últimos anos, diversos pesquisadores vêm se dedicando à cultura de tecidos de espécies frutíferas. O desenvolvimento das diferentes técnicas de cultura de tecidos deve se basear nas necessidades de cada cultura, levando-se em conta seus fatores limitantes. Alguns autores, como BHOJWANI & RAZDAN (1983), ZIMMERMAN (1983), BAJAJ (1986), HUTCHINSON & ZIMMERMAN (1987) e LITZ (1987), apresentam uma relação dos trabalhos realizados com diferentes espécies frutíferas. Várias são as aplicações da cultura de tecidos de plantas, porém, basicamente, segundo MULLINS (1983), podem ser classificadas em quatro principais categorias: propagação, melhoramento genético, conservação de germoplasma e aplicações industriais e farmacêuticas. Além disso, especialmente para a horticultura, o autor cita ainda a possibilidade de eliminação de viroses, e o cultivo de órgãos isolados como sistemas experimentais para o estudo de processos fisiológicos como dormência de sementes, regulação do florescimento, e outros.

A cultura de tecidos de manga encontra-se ainda em fase de desenvolvimento, conforme exposto no item 2.2., tendo-se realizado principalmente trabalhos visando a obtenção de embriogênese somática através da cultura de nucelo.

Outras técnicas, porém, devem ser desenvolvidas para que haja um maior aproveitamento das vantagens que a cultura de tecidos pode oferecer à cultura da

mangueira, especialmente nas áreas de propagação, melhoramento genético e conservação e transporte de germoplasma.

2.3.1. Propagação

O uso da cultura de tecidos como método de propagação da mangueira, além de ser um método alternativo para produção de mudas, poderá proporcionar uma série de vantagens em relação aos métodos tradicionais de enxertia. Através da micropropagação, é possível diminuir o tempo de formação da muda, utilizando-se menor espaço físico e obtendo-se no final mudas de elevada qualidade fitossanitária.

As mudas obtidas podem ser utilizadas diretamente para plantio, ou como porta-enxertos. Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar horticulturalmente as plantas que se desenvolvem em suas próprias raízes. É um estudo demorado, porém as plantas micropropagadas têm sido bem aceitas (MULLINS, 1987). Em espécies lenhosas ornamentais, como a rosa, DEBERGH (1987) diz que as plantas micropropagadas apresentam resultados comparáveis aos de plantas enxertadas.

Uma das maiores vantagens da cultura de tecidos na propagação de plantas, é o seu rendimento elevado, sendo possível a produção de milhares de mudas a partir de um único explante, reduzindo inclusive o custo unitário da muda. DONATO (1981) cita o caso da tamareira, que durante sua vida útil quase centenária, produz apenas 10 a 40 rebentos úteis à propagação. Através de cultura de tecidos, hoje é possível a obtenção de 50 a 100.000 plântulas a partir de um só rebento, em apenas dois anos.

MULLINS (1983 e 1987) alerta para a importância da micropropagação

de frutíferas para a utilização de mudas em plantio adensado, pelo baixo custo em relação ao de mudas enxertadas.

Ainda no caso da propagação, a cultura de tecidos possibilita uma maior compreensão da fisiologia da formação de raízes adventícias em genótipos de difícil propagação, como é o caso da mangueira.

A técnica da embriogênese somática consiste na produção de calo no explante inicial, seguida por indução de formação de embriões a partir deste calo. Os embriões formados podem então ser levados até o desenvolvimento completo da planta. É um método bastante produtivo, pois cada célula da massa de calo pode se transformar em um embrião. A indução da formação dos embriões está relacionada à presença de auxinas no meio de cultura. DONATO (1981) e BHOJWANI & RAZDAN (1983) citam o 2,4-D como a auxina mais utilizada para este fim.

A indução de gemas adventícias ocorre de maneira semelhante à da embriogênese somática, onde são obtidas gemas a partir da massa de calo formada no explante inicial. Desta forma, a partir de um pequeno explante pode-se dar início a uma sequência de sub-culturas capazes de fornecer em pouco tempo, milhares de plântulas. Segundo DONATO (1981) é um método menos eficiente do que a embriogênese somática, porém sua produtividade é ainda extraordinariamente elevada.

A intensidade e o tipo de organogênese é regulada através da relação entre auxinas e citocininas existente no meio de cultura. Uma elevada relação citocinina:auxina tende a promover o alongamento das gemas, enquanto que elevada relação auxina:citocinina favorece o enraizamento.

A formação de plântulas a partir de um tecido de calo deve, porém, ser considerada com certo cuidado no caso da micropropagação, especialmente em espécies frutíferas. A mais séria objeção ao uso de cultura de calos para produção de plantas se baseia na instabilidade genética de suas células (MURASHIGE, 1974; DONATO, 1981; BHOJWANI & RAZDAN, 1983; ZIMMERMAN, 1983; BOULAY, 1987). LITZ & CONOVER (1983) e NAVARRO *et alii* (1985) obtiveram problemas de instabilidade genética em embriogênese somática de mamão e citros, respectivamente.

A cultura de gemas axilares, ou meristemas, por sua vez, consiste na multiplicação de gemas através de meristemas axilares. Este fenômeno é promovido pela adição de citocinina no meio de cultura (DONATO, 1981). BHOJWANI & RAZDAN (1983) dizem que as exigências exógenas de reguladores de crescimento dependem dos níveis endógenos da planta, variando conforme o tecido, tipo de planta e fase de crescimento da planta.

Entre as técnicas aqui citadas para a micropropagação, uma característica em comum é a capacidade de multiplicação muito intensa a partir de quantidades reduzidas de material inicial. As culturas de gemas ou de meristemas, porém, são consideradas as mais adequadas para a conservação dos caracteres genéticos do material em cultura (DONATO, 1981).

Além disso, a cultura de meristemas é utilizada para a produção de plantas livres de vírus e patógenos, pela ausência de conexões vasculares entre o tecido meristemático e outros tecidos da planta matriz. Uma alternativa para a produção de plantas livres de patógenos e vírus é a microenxertia, que consiste na enxertia do ápice meristemático em uma plântula *in vitro* (HUANG & MILLIKAN, 1980 e JONARD *et alii*,

1983).

A cultura da mangueira não apresenta atualmente doenças viróticas, eliminando-se a necessidade de sistemas *in vitro* para recuperação de plantas livres de vírus. Por outro lado, patógenos fúngicos e bacterianos causam consideráveis danos aos frutos, panículas e crescimentos vegetativos jovens (LITZ et alii, 1985). A seca-da-mangueira, já disseminada em diferentes locais no Brasil, é uma doença sistêmica, que tende a se alastrar através do uso de ramos de plantas que possuem o fungo (*Ceratocistis fimbriata*), para a produção de mudas. Neste caso, as técnicas de cultura de tecidos podem ser de grande valor, possibilitando a obtenção de plantas saudáveis.

2.3.2. Melhoramento Genético

A cultura de tecidos tem grande utilidade como técnica auxiliar para o melhoramento genético da mangueira, contribuindo tanto na obtenção de novas variedades, como também, facilitando a realização de algumas etapas do melhoramento. Através da associação de diversas técnicas de cultura de tecidos, pode-se, por exemplo, abreviar o longo ciclo entre gerações, aproveitar um maior número de embriões híbridos, produzindo grande número de plantas para testes.

A variação somática, altamente indesejável em termos de propagação de plantas, é de grande interesse para o melhoramento (MULLINS, 1987). Desta forma, a instabilidade genética que se observa na organogênese e embriogênese somática é importante em um processo de seleção.

Em programas de hibridação controlada, a cultura de embriões possibilita

um maior aproveitamento dos embriões híbridos, além de ser possível realizar a cultura de embriões imaturos, diminuindo o tempo para avaliação dos híbridos. No caso das variedades poliembriônicas de manga, a cultura de embriões é especialmente útil, permitindo a retirada e desenvolvimento do embrião sexual *in vitro*, o qual normalmente não se desenvolve, em virtude do maior vigor dos embriões nucleares.

A obtenção de variedades resistentes ou tolerantes a determinados fatores fitossanitários ou climáticos limitantes pode ser favorecida pela variação somaclonal, ou mesmo pela hibridação controlada entre variedades, ou outras espécies do gênero *Mangifera* que apresentem características desejadas.

EVERS *et alii* (1988) trabalhando na produção de clones de olmo (*Ulmus* spp.) resistentes à “Dutch elm disease”, uma doença muito semelhante à seca-da-mangueira, afirmam que a micropropagação reduz o tempo necessário para teste e introdução de novas variedades e para a produção de gametas. A produção de gametas pode ser antecipada através da indução de florescimento precoce *in vitro*. MULLINS (1983) cita o trabalho desenvolvido na Universidade de Sydney com uva, onde foi obtido florescimento em plântulas apenas quatro semanas após a germinação.

A fusão de protoplastos é também uma alternativa interessante para o melhoramento de frutíferas. Por serem totipotentes, e portanto capazes de regenerar uma planta completa, os protoplastos, através da hibridação somática, abrem caminho para a transferência de genes, incorporação de características específicas, como resistência a doenças, ou cruzamentos sexualmente incompatíveis (BAJAJ, 1986). Protoplastos de plantas lenhosas já foram obtidos em grandes quantidades a partir de partes juvenis e cultura de calos, porém a regeneração completa de plantas foi obtida somente em *Citrus* (VARDI

et alii, 1975). Apesar de preliminares, são encorajadores os resultados já obtidos com a fusão de protoplastos em espécies lenhosas (BAJAJ, 1986).

2.3.3. Conservação e Transporte de Germoplasma

A conservação de germoplasma é geralmente realizada através de sementes, por ocuparem pouco espaço e pela possibilidade de armazenamento por vários anos em condições de baixa temperatura e baixo teor de água, além de serem facilmente transportáveis para outros centros, ou distribuição a produtores. Este método, porém, não é aplicável a espécies propagadas vegetativamente ou àquelas que possuem sementes recalcitrantes, ou seja, sementes sensíveis à baixa temperatura e à perda de água, perdendo rapidamente a viabilidade (BAJAJ, 1986; BHOJWANI & RAZDAN, 1983 e FARRANT *et alii*, 1988).

Além de possuir sementes recalcitrantes (KING & ROBERTS, 1979; CHIN & ROBERTS, 1980; e CORBINEAU & CÔME, 1988), perdendo sua viabilidade em um máximo de 60 dias (SIMÃO, 1959), as variedades de manga são propagadas vegetativamente, portanto, a instalação de um banco de germoplasma de *Mangifera indica* L. e espécies afins, atualmente só é possível através do plantio de mudas, sendo necessário para isto a disponibilidade de grandes áreas.

A cultura de tecidos é mais uma vez uma excelente alternativa, possibilitando a conservação de material genético em pequeno espaço. O material genético pode ser mantido através de sub-culturas periódicas (4 a 8 semanas), porém este procedimento traz o risco de perda do material vegetal por contaminação microbiana, ou mesmo por alguma falha humana, além de possivelmente se tornar uma alternativa antieconômica

(BHOJWANI & RAZDAN, 1983). Um requisito básico para que um método de cultura de tecidos seja viável na preservação de recursos genéticos, segundo BHOJWANI & RAZDAN (1983), é a diminuição da frequência de sub-culturas, que é possível através da diminuição ou inativação da atividade celular. Atualmente, isto é realizado através de armazenamento a frio, entre 1°C e 9°C, ou por criopreservação em nitrogênio líquido, a -196°C.

BAJAJ (1986) diz que diversos estudos foram realizados, principalmente com plantas herbáceas, comprovando a viabilidade de células e tecidos vegetais criopreservados. Cita algumas espécies frutíferas lenhosas, como *Malus* spp., *Malus domestica*, *Phoenix dactilyfera*, *Citrus* spp. e *Cocos nucifera*, criopreservadas com sucesso, através de órgãos, ou tecidos de calo. Segundo BHOJWANI & RAZDAN (1983), ápices caulinares e embriões são os explantes mais promissores para esta técnica.

Além da conservação do material genético, a criopreservação permite a troca internacional de germoplasma, evitando qualquer formalidade relacionada à quarentena (BAJAJ, 1986).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Ciências Florestais (LCF), na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, em Piracicaba, São Paulo.

O material vegetal utilizado, ramos e frutos de mangueira, foram obtidos no Pomar do Departamento de Horticultura da ESALQ; na residência do Prof. Dr. Salim Simão, também na ESALQ, e na Fazenda Santa Maria, de propriedade do Prof. Dr. Eduardo Castanho Ferraz, em Santa Maria, a 40 km de Piracicaba, SP.

3.1. Antecedentes

Em princípios de 1985, acompanhando alguns trabalhos de micropropagação de *Eucalyptus* e *Pinus* no Laboratório de Cultura de Tecidos do LCF, observou-se pelos trabalhos de MAHESHWARI & RANGASWAMY (1958), IVER & SUBRAMANYAM (1972), RAO *et alii* (1985) e resumos de LITZ *et alii* (1982 e 1984) e LITZ

(1984), a preocupação por parte desses autores em desenvolver pesquisas visando a obtenção de plântulas de manga *in vitro*.

Consciente da importância que a cultura da mangueira apresenta para a fruticultura brasileira, e observando-se as vantagens que o desenvolvimento desta técnica de cultura de células e tecidos pode trazer para esta frutífera, planejou-se um estudo inicial sobre as possibilidades dessa nova linha de pesquisa, a fim de buscar novas alternativas que pudessem auxiliar o desenvolvimento de pesquisas com a mangueira.

3.2. Testes de cultivo *in vitro*

No período entre março de 1985 e maio de 1988 foram instalados nove testes de cultivo *in vitro* com explantes de manga. No Quadro 1 estes testes são apresentados sumariamente, em ordem cronológica, citando-se tipo de explante, variedades e meios de cultura utilizados em cada teste, e a esterilização realizada nos explantes.

3.2.1. Testes nº 1 e 2: em março de 1985, no final da época de produção de frutos de manga, decidiu-se aproveitar os últimos frutos existentes em algumas mangueiras da residência do Prof. Dr. Salim Simão, na ESALQ, para instalar um pequeno teste a fim de observar os resultados de cultura de eixo embrionário e de cotilédones de manga.

As variedades escolhidas foram Santa Alexandrina, Oliveira Neto e Família, a primeira monoembriônica e as outras duas poliembriônicas, por serem as variedades que ainda possuíam frutos no mês de março. Os frutos colhidos encontravam-se em estado de maturação completa.

Quadro 1: Resumo dos testes de cultivo 'in vitro' realizados com explantes de manga

TESTE Nº	ÉPOCA (DATA)	TIPO DE EXPLANTE	VARIEDADES	MEIO DE CULTURA	PRÉ-TRATAMENTO DAS PLANTAS NO CAMPO E NO LABORATÓRIO	PRÉ ESTERILIZAÇÃO DOS EXPLANTES	ESTERILIZAÇÃO DOS EXPLANTES EM CÂMARA ASSÉPTICA
1	MARÇO 1985	COTILÉDONE	S. ALEXANDRINA OLIVEIRA NETO FAMÍLIA	MC*	—	—	HIPOCLORITO DE SÓDIO (20 Minutos) (2,36% Cl ATIVO)
2	MARÇO 1985	EMBRIÃO MADURO	S. ALEXANDRINA OLIVEIRA NETO FAMÍLIA	MZ**	—	—	HIPOCLORITO DE SÓDIO (20 Minutos) (2,36% Cl ATIVO)
3	JULHO 1987	LIMBO FOLIAR	TOMMY ATKINS	MC	CAMPO KARATHANE (1g/l) CERCONIL (1,5g/l) KASUMIN (3ml/l) LABORATÓRIO BENLATE (300mg/l)	BENLATE (300mg/l) NEANTINA (100mg/l) CLAFORAM (100mg/l) 3h30min sob agitação	HgCl ₂ (100mg/l) (10 Minutos)
4	JULHO 1987	SEGMENTO NODAL COM GEMA AXILAR	TOMMY ATKINS	MC	CAMPO KARATHANE (1g/l) CERCONIL (1,5g/l) KASUMIN (3ml/l) LABORATÓRIO BENLATE (300mg/l)	BENLATE (300mg/l) NEANTINA (100mg/l) CLAFORAM (100mg/l) 3h30min sob agitação	HgCl ₂ (100mg/l) (10 Minutos)
5	OUTUBRO 1987	EMBRIÃO IMATURO	OLIVEIRA NETO	MS** LÍQUIDO MODIFICADO	—	—	HIPOCLORITO DE SÓDIO (2,36% Cl ATIVO) (20 Minutos)
6	NOVEMBRO 1987	SEGMENTO NODAL COM GEMA AXILAR	TOMMY ATKINS	MC	CAMPO KARATHANE (1g/l) CERCONIL (1,5g/l) KASUMIN (3ml/l) LABORATÓRIO BENLATE (300mg/l)	BENLATE (300mg/l) NEANTINA (100mg/l) KASUMIN (2ml/l) 4h sob agitação	HIPOCLORITO DE SÓDIO (2,36% de Cl ATIVO) (20 Minutos)
7	DEZEMBRO 1987	EMBRIÃO MADURO	BOURBON OLIVEIRA NETO IMPERIAL	MC	—	—	HIPOCLORITO DE SÓDIO (2,36% Cl ATIVO) (20 Minutos) HIPOCLORITO DE SÓDIO (2,36% Cl ATIVO) (20 Minutos)
8	DEZEMBRO 1987	COTILÉDONE	BOURBON OLIVEIRA NETO IMPERIAL	MC	—	—	DE SÓDIO (2,36% Cl ATIVO) (20 Minutos) HIPOCLORITO DE SÓDIO (2,36% Cl ATIVO) (20 Minutos)
9	MAIO 1988	SEGMENTO NODAL COM GEMA AXILAR	MANILA JOE WELCH SENSATION TOMMY ATKINS	MC e MC+ BENLATE (100mg/l) NEANTINA (30mg/l) KASUMIN (0,5ml/l)	LABORATÓRIO BENLATE (300mg/l)	BENLATE (300 mg/l) NEANTINA (100 mg/l) KASUMIN (2ml/l) 4h sob agitação	HIPOCLORITO DE SÓDIO (2,36% Cl ATIVO) (20 Minutos)

* MC = meio para indução de calo

** MZ = meio zero

*** MS = MARASHIGE & SKOOG (1962)

Pelo estágio adiantado de maturação dos frutos, algumas sementes encontravam-se brotando, ou contaminadas por fungos. Os explantes foram retirados de partes aparentemente sadias das sementes.

Os explantes foram preparados e esterilizados no laboratório e inoculados em câmara asséptica. O detalhamento dessas atividades será descrito no ítem “3.4. Preparo, esterilização e inoculação dos explantes”.

Como meio de cultura para este teste optou-se pelo meio de GONÇALVES (1980), largamente utilizado no laboratório do LCF para diferentes espécies, com excelentes resultados, especialmente para *Eucalyptus*, meio para o qual foi adaptado.

Para a inoculação dos cotilédones utilizou-se o que se denomina no laboratório do LCF de “meio para indução de calo”, que se constitui dos sais minerais de GONÇALVES (1980) acrescido de vitaminas, sacarose, agar e os reguladores de crescimento AIB (ácido indol butírico) e 6 BAP (6 benzilaminopurina).

Os eixos embrionários foram inoculados no “meio zero”, constituído somente pelos sais minerais com sacarose e agar. A composição dos meios de cultura é dada no ítem “3.4.1. Meios de cultura”.

3.2.2. Testes nº 3 e 4 (20 de julho de 1987): neste ano planejou-se a instalação de testes utilizando outras fontes de explante além de cotilédone e eixo embrionário. Na literatura pesquisada não se encontrou nenhum artigo relatando o uso de outros tipos de explante de manga, portanto decidiu-se testar segmentos nodais com gema axilar, e limbo foliar, adaptando-se os métodos utilizados para outras espécies, como *Eucalyptus* e *Pinus*.

Para obtenção dos ramos, optou-se pelo pomar de mangas da Fazenda Santa Maria, em Santa Maria, SP. As mangueiras, da variedade Tommy Atkins, apresentavam-se sadias, sem sintomas de ataque de doenças. Por se utilizar material coletado no campo, o qual geralmente apresenta elevadas taxas de contaminação quando inoculados os explantes, e como o porte das plantas era pequeno, realizou-se tratamento preventivo das plantas através de pulverização com fungicida e bactericida (item 3.3.2.), procurando minimizar essa contaminação.

Após o preparo (item 3.4.), os explantes de segmento nodal com gema axilar e limbo foliar foram esterilizados e inoculados em “meio para indução de calo”.

Em 20.08.87 os explantes não contaminados até então foram transferidos, conforme item 3.6..

3.2.3. Teste nº 5 (13 de outubro de 1987): em agosto de 1987 iniciou-se o acompanhamento de algumas panículas de mangueiras da variedade Oliveira Neto, no pomar do Departamento de Horticultura, ESALQ, com o objetivo de utilizar embriões imaturos como fonte de explante para o próximo teste, conforme protocolo publicado no trabalho de LITZ (1986b).

Procurou-se seguir, na medida do possível, o protocolo citado neste artigo. Os frutos foram colhidos aproximadamente 60 dias após o florescimento e deles retirados os embriões, os quais depois de esterilizados foram inoculados em meio MS modificado líquido (item 3.4). Segundo o protocolo de LITZ (1986b), os explantes deveriam ser transferidos diariamente para meio novo, até que a oxidação dos explantes cessasse, porém, devido à impossibilidade de material e pessoal para realizar esta prática, decidiu-se utilizar o meio

líquido e manter os tubos sob agitação e no escuro, visando diminuir a oxidação.

3.2.4. Teste nº 6 (18 de novembro de 1987): trata-se de uma repetição do teste nº 4, realizado em julho de 1987, alterando-se somente parte dos tratamentos fitossanitários realizados no campo e da esterilização dos explantes no laboratório, com o objetivo de obter um controle mais efetivo da contaminação.

Os explantes de segmento nodal com gema axilar preparados no laboratório foram esterilizados e inoculados em “meio para indução de calo” (item 3.4).

3.2.5. Testes nº 7 e 8 (16 de dezembro de 1987): o mesmo procedimento dos testes nº 1 e 2 foi seguido, porém foram utilizados frutos das variedades Bourbon, Oliveira Neto e Imperial para retirada dos eixos embrionários e cotilédones. Os frutos apresentavam-se em início de estágio de maturação e as sementes em boas condições fitossanitárias.

Os explantes foram preparados, esterilizados e inoculados em “meio para indução de calo”. Parte dos explantes foi colocada no claro e parte no escuro. Este procedimento visou comparar os resultados em relação à oxidação dos explantes, que geralmente ocorre com menor intensidade no escuro.

Em 05.04.88 os explantes foram transferidos para meio de cultura novo. Foram utilizados quatro meios de cultura diferentes, conforme item 3.4..

3.2.6. Teste nº 9 (19 de maio de 1988): mais uma vez repetiu-se o teste de inoculação de segmentos nodais com gema axilar, utilizando-se explantes de plantas das variedades Manila, Joe Welch, Sensation e Tommy Atkins do pomar de Departamento de Horticultura da ESALQ. As plantas não receberam tratamento fitossanitário, como nos outros testes.

anteriores de inoculação de segmentos nodais com gema axilar e limbo foliar.

Os explantes foram esterilizados no laboratório e inoculados em “meio para indução de calo”. Parte do meio de cultura foi acrescida de uma solução de Benlate, Neantina e Kasumin, para observação dos resultados em relação à contaminação e desenvolvimento dos explantes na presença desses produtos.

3.3. Material Vegetal

3.3.1. Origem

Os ramos e frutos utilizados nos testes foram coletados em quatro locais diferentes:

- a) Residência do Prof. Dr. Salim Simão, ESALQ: foram coletados frutos de três mangueiras de aproximadamente 30 anos de idade, 8 a 10 metros de altura, das variedades Santa Alexandrina, Oliveira Neto e Família.
- b) Pomar da Fazenda Santa Maria: Propriedade do Prof. Dr. Eduardo Castanho Ferraz, localizada no município de Santa Maria, a 40 km de Piracicaba, SP. O pomar possui plantas enxertadas com a variedade Tommy Atkins, plantadas em 1984, portanto com 3 anos de idade na época em que foram retirados os ramos para os testes de inoculação de segmentos nodais com gema axilar e limbo foliar (julho e novembro de 1987). O porte das plantas, entre 2 e 3 metros de altura, facilitou a realização de um tratamento prévio das plantas com fungicidas e bactericidas, visando diminuir a contaminação dos explantes no laboratório.
- c) Pomar do Departamento de Horticultura, ESALQ (A): foi implantado em 1965 para estudo de porta-enxertos de manga com 210 plantas, sendo seis variedades enxertadas

sobre sete diferentes porta-enxertos, em blocos ao acaso, com 5 repetições. As plantas possuem entre seis e oito metros de altura e 8 a 11 metros de diâmetro de copa.

Neste pomar foram retirados frutos imaturos da variedade Oliveira Neto (outubro 1987) para inoculação de embriões imaturos, e também frutos maduros (dezembro de 1987) para inoculação de eixos embrionários e cotilédones.

d) Pomar do Departamento de Horticultura, ESALQ (B): pomar com 51 plantas, implantado em maio de 1980, com plantas enxertadas de 17 variedades, e 3 árvores de cada variedade. As plantas apresentavam-se com 3 a 4 metros de altura, sendo utilizadas plantas das variedades Manila, Joe Welch, Sensation e Tommy Atkins.

3.3.2. Tratamentos fitossanitários efetuados no campo

O tratamento fitossanitário das plantas foi efetuado como medida preventiva, com o objetivo de diminuir a contaminação dos explantes de limbo foliar e segmento nodal com gema axilar quando inoculados.

Este tratamento foi realizado no pomar da Fazenda Santa Maria, em plantas da variedade Tommy Atkins, onde se coletou material para testes de limbo foliar e segmento nodal com gema axilar (testes nº 3, 4 e 6).

No Quadro 2 apresentam-se os produtos utilizados, dosagem, número de plantas pulverizadas e quantidade de calda. Foram escolhidas dez plantas por tratamento e utilizados dois fungicidas (Karathane e Cerconil) associados a um bactericida (Kasumin).

Quadro 2: Tratamentos fitossanitários realizados nas mangueiras variedade Tommy Atkins.

PRODUTO COMERCIAL	DOSAGEM	Quantidade de calda/planta	Plantas tratadas
Karathane + Kasumin	1,0g/l + 2,0ml/l	300 ml	10
Cerconil + Kasumin	1,5g/l + 2,0ml/l	300 ml	10

Nos testes nº 3 e 4 foram realizadas duas aplicações, a cada cinco dias, iniciando-se quinze dias antes da coleta do material. No teste nº 6 iniciaram-se as aplicações cerca de 30 dias antes da coleta do material, realizando-se quatro pulverizações com intervalos semanais, cobrindo totalmente a carga.

3.3.3. Coleta dos ramos e frutos e preparo dos explantes

a) **Ramos:** para instalar os testes nº 3 e 4, em julho de 1987, foram coletados os ramos do fluxo de abril, portanto, com três meses de idade. Para os testes nº 6 e 9, instalados em novembro de 1987 e maio de 1988, foram coletados ramos de três meses de idade, dos fluxos vegetativos de agosto de 1987 e fevereiro de 1988, respectivamente.

Os ramos foram sempre coletados no final da tarde do dia anterior ao da inoculação, levados ao laboratório, lavados e colocados em um balde contendo uma solução de Benlate (300 mg/l), ficando até a manhã seguinte, durante 13 horas.

Em seguida os ramos foram desfolhados com tesoura de poda, deixando-se apenas a base do pecíolo das folhas.

Algumas folhas foram lavadas com detergente e delas cortados pequenos

pedaços de limbo foliar, medindo 0,5x0,5 cm, e em seguida mergulhados em água destilada e deionizada.

Dos ramos desfolhados, também lavados com detergente, foram cortados os segmentos nodais com aproximadamente 2 cm de comprimento, contendo a gema axilar e a base do pecíolo das folhas.

b) Frutos imaturos: foram colhidos frutos em desenvolvimento aproximadamente 60 dias após polinização, com 1,5 a 2 cm de comprimento.

Os frutos foram lavados com detergente e abertos com bisturi, retirando-se o eixo embrionário e mergulhando-os em água destilada e deionizada.

c) Frutos maduros: para os testes n. 1 e 2, em março de 1985, foram colhidos frutos em fase adiantada de maturação.

Em dezembro de 1987 (teste n^o 7) foram coletados frutos em fase inicial de maturação. Os frutos colhidos foram levados ao laboratório, lavados com detergente, e deles retirada toda a polpa e a casca da semente.

Utilizaram-se nesses testes uma variedade monoembriônica (Santa Alexandrina) e duas poliembriônicas (Família e Oliveira Neto).

Das sementes monoembriônicas retirou-se o eixo embrionário com uma parte do cotilédone, ficando o explante com aproximadamente 0,5x0,5x0,5 cm. Retirados os eixos embrionários, os cotilédones também foram cortados em explantes do mesmo tamanho, sendo todos mergulhados em água destilada e deionizada.

Os embriões das sementes poliembriônicas foram separados uns dos outros

e os explantes preparados da mesma forma relatada para as sementes monoembriônicas.

3.4. Preparo, esterilização e inoculação dos explantes

3.4.1. Meios de cultura

Nos nove testes instalados foram utilizados basicamente os sais minerais de GONÇALVES (1980) e MURASHIGE & SKOOG (1962) modificado.

Nos testes 1, 3, 4, 6, 7 e 8 (Quadro 1) utilizou-se o “meio para indução de calo” (MC), o qual contém os sais minerais de GONÇALVES (1980), acrescido de vitaminas, reguladores de crescimento (AIB e 6-BAP), sacarose e agar.

No teste nº 2 utilizou-se o “meio zero” (MZ), o qual possui somente os sais minerais de GONÇALVES (1980), sacarose e agar.

O teste nº 5 foi instalado em meio MURASHIGE & SKOOG (1962) modificado líquido, com metade dos sais minerais, acrescido de 60 g/l de sacarose, 400 mg/l glutamina e 1 mg/l de 2,4-D (LITZ 1986b).

No Quadro 3 são apresentadas as composições dos meios de cultura utilizados nos testes.

No laboratório foram preparadas soluções estoque, que são soluções concentradas dos sais minerais utilizadas no preparo dos meios de cultura. Essas soluções foram colocadas em frascos escuros e mantidas sob refrigeração.

Para o preparo do meio de cultura utilizou-se uma proveta de 1 litro onde foi colocado um pouco de água destilada e deionizada. Em seguida pipetou-se 20 ml de

solução estoque de cada frasco e adicionou-se à proveta.

Os reguladores de crescimento foram pesados em balança analítica e dissolvidos em algumas gotas de KOH antes de serem misturados na solução. As vitaminas foram pesadas e misturadas diretamente na solução.

Misturados todos os ingredientes, completou-se o volume da proveta com água destilada e deionizada e acrescentou-se a sacarose, retirando-se então uma porção para medir o pH da solução. Havendo necessidade de ajuste do pH para os valores adequados, entre 5,6 e 5,8, foram utilizadas soluções tampão.

Depois da medição do pH, adicionou-se o agar, previamente pesado e a solução foi levada ao fogo para dissolver o agar. No preparo de meio de cultura líquido, não há necessidade de aquecimento, pois a este não é adicionado agar.

Em seguida, ainda quente, o meio de cultura foi distribuído nos frascos para a posterior inoculação dos explantes.

Para meio sólido utilizou-se neste trabalho tubo de ensaio de 18x150 mm, com 10 e 15 ml de meio de cultura em cada tubo, respectivamente. Para o meio líquido utilizou-se erlenmeyer de 125 ml, com 50 ml de meio por frasco. Tanto os tubos de ensaio como os erlenmeyers foram tampados com algodão envolto em gaze.

Os tubos de ensaio ou os erlenmeyers foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos e retirados ainda quentes da autoclave para evitar o cozimento do meio de cultura.

Quadro 3: Meios de cultura utilizados nos testes de cultivo *in vitro* de manga

	Meio de Cultura		
	MC ¹	MZ ²	MS(1962) ³
Sais Minerais	mg/l	mg/l	mg/l
NH ₄ NO ₃	800,0	800,0	1650,0
KNO ₃	1000,0	1000,0	1900,0
KH ₂ PO ₄	170,0	170,0	170,0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,0	236,0	—
CaCl ₂ .2H ₂ O	—	—	440,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,0	250,0	370,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25	0,25	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	—
MnSO ₄ .H ₂ O	1,7	1,7	—
MnSO ₄ .4H ₂ O	—	—	22,3
MoO ₃	0,144	0,144	—
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	—	—	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,0	3,0	—
ZnSO ₄ .4H ₂ O	—	—	8,6
KI	0,75	0,75	0,83
Vitaminas	mg/l	mg/l	mg/l
Meso inositol	100,0	—	—
Tiamina	5,0	—	—
Piridoxina	0,5	—	—
Ácido nicotínico	0,5	—	—
Pantot. de Cálcio	1,0	—	—
Reguladores de crescimento	mg/l	mg/l	mg/l
AIA	1,0	—	—
6-BAP	0,5	—	—
	g/l	g/l	g/l
Sacarose	30,0	30,0	—
Agar	5,5	5,5	—

(1) Meio para indução de Calo, modificado de GONÇALVES (1980).

(2) Meio Zero, modificado de GONÇALVES (1980).

(3) Sais Minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962).

No teste nº 9, o meio de cultura depois de aquecido para dissolução do agar, foi colocado em beakers de 600 ml e autoclavados. Em seguida os beakers foram levados para câmara asséptica e ao meio ainda quente adicionou-se a solução de Benlate, Neantina e Kasumin preparada em água esterilizada. Só então o meio de cultura foi colocado nos tubos de ensaio, os quais haviam sido previamente tampados e autoclavados.

3.4.2. Esterilização e inoculação dos explantes

Como se pode observar no Quadro 1 (item 3.2.), realizaram-se dois tipos de esterilização:

- a) Pré-esterilização
- b) Esterilização em câmara asséptica.

Os explantes de limbo foliar e de segmento nodal com gema axilar receberam os dois tipos de tratamento, pois geralmente apresentam elevadas taxas de contaminação. Já os explantes provenientes da semente, que geralmente apresentam pequena contaminação por estarem protegidos dentro do fruto, receberam somente a esterilização em câmara asséptica.

a) **Pré-esterilização:** realizada somente nos explantes de limbo foliar e segmento nodal com gema axilar. Nos testes nº 3 e 4 utilizou-se uma solução de Benlate (300 mg/l) + Neantina (100 mg/l) + Claforan (100 mg/l), onde os explantes foram mergulhados e mantidos sob agitação durante 3,5 horas.

Os explantes dos testes nº 6 e 9 receberam o tratamento da mesma forma, porém na solução o Claforan foi substituído por Kasumin (2 ml/l) e a agitação foi mantida

durante 4 horas. Em seguida a solução foi escorrida e o becker com os explantes levado para a câmara asséptica.

b) Esterilização na câmara asséptica: o material utilizado na câmara asséptica como: beckers, placas de Petri, pinças, bisturis e água para lavagem dos explantes, foi previamente autoclavado durante 20 minutos a 120°C.

Todos os explantes receberam este tratamento na câmara asséptica. Em geral utilizou-se hipoclorito de sódio (2,36 % de cloro ativo) durante 20 minutos. Somente nos testes nº 3 e 4 os explantes foram esterilizados com bicloreto de mercúrio durante 10 minutos.

Depois de mergulhados na solução esterilizante os explantes receberam cinco lavagens com água esterilizada e foram colocados em placas de Petri.

Em seguida os explantes foram inoculados no meio de cultura já preparado.

3.5. Número de explantes em cada teste

No Quadro 4 apresenta-se o número de explantes utilizado em cada teste, conforme a variedade, ou o tratamento realizado.

3.6. Reinoculação dos explantes

A reinoculação foi realizada somente nos testes nº 3, 4, 7 e 8, com o objetivo de trocar o meio de cultura já oxidado, ressecado e pobre em nutrientes, e também para retirar as partes oxidadas dos explantes.

Quadro 4: Explantes utilizados em cada teste de cultivo *in vitro* de manga.

Teste nº	Tipo de Explante	Explantes/Tratamento	
1	Cotilédone	Santa Alexandrina	30
		Família	35
		Oliveira Neto	30
2	Eixo Embrionário	Santa Alexandrina	15
		Família	12
		Oliveira Neto	15
3	Limbo Foliar	Karathane	50
		Cerconil	50
4	Segmento Nodal	Karathane	50
		Cerconil	50
5	Embrião Imaturo	Oliveira Neto	75
6	Segmento Nodal	Karathane	100
		Cerconil	100
7	Eixo Embrionário	Bourbon	55
		Oliveira Neto	20
		Imperial	23
8	Cotilédone	Bourbon (claro)	50
		Bourbon (escuro)	50
		O. Neto (claro)	50
		O. Neto (escuro)	50
		Imperial (claro)	50
		Imperial (escuro)	50
9	Segmento Nodal	Manila (MC)	80
		Manila (MC+BNK)	26
		Joe Welch (MC)	103
		Joe Welch (MC+BNK)	33
		Sensation (MC)	92
		Sensation (MC+BNK)	32
		T. Atkins (MC)	101
		T. Atkins (MC+BNK)	33

Em câmara asséptica com material esterilizado, cada explante foi retirado do tubo de ensaio, colocado em placa de Petri para limpeza, retirando-se as partes oxidadas, e imediatamente inoculado em tubo de ensaio com meio novo.

No Quadro 5 tem-se uma visão geral das reinoculações realizadas.

Quadro 5: Reinoculações realizadas nos testes de cultivo *in vitro*

Teste no	Tipo de Explante	Data	Variedade	Meio de Cultura	Nº de Explantes
3 (K)	Limbo Foliar	20.08.87	T. Atkins	MC	35
3 (C)	Limbo Foliar	20.08.87	T. Atkins	MC	24
4 (K)	Segm. Nodal	20.08.87	T. Atkins	MC	8
4 (C)	Segm. Nodal	20.08.87	T. Atkins	MC	10
7	Eixo Embrionario	05.05.88	Bourbon Imperial O. Neto	MC	50 22 20
8	Cotilédone	05.05.88	Imperial	MC	1

3.7. Condições ambientais

Na época em que este trabalho foi realizado, o Laboratório de Cultura de Tecidos do LCF/ESALQ possuía somente controle parcial das condições ambientais. Na câmara de crescimento era possível controlar o fotoperíodo, que foi regulado para 16/8 horas, claro/escuro, respectivamente. Não foi possível realizar controle de temperatura, ficando a câmara sob condições ambientais. Em geral a temperatura era mantida entre 25°

e 30°C, utilizando-se nos dias mais quentes um circulador de ar para abaixar a temperatura.

3.8. Avaliação dos testes

Os testes foram avaliados em relação à contaminação e oxidação dos explantes, formação de calo e desenvolvimento dos explantes. As avaliações foram feitas semanalmente, variando-se os intervalos conforme o andamento de cada teste.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão e discussão, os resultados obtidos nos nove testes instalados são apresentados neste ítem agrupados conforme o tipo de explante.

4.1. Cultura de cotilédone e de eixo embrionário

Os testes instalados com segmentos de cotilédone e eixo embrionário foram os que apresentaram os melhores resultados em termos de desenvolvimento e controle da contaminação por fungos e bactérias. Nos Quadros 6 e 7 apresenta-se o resultado final dos testes nº 1 e 2, nos quais foram utilizados como explantes cotilédones e eixos embrionários, respectivamente, retirados de frutos maduros das variedades Santa Alexandrina, Família e Oliveira Neto.

O Quadro 6 apresenta os resultados obtidos em cultura de cotilédone (teste nº 1). Logo nas primeiras semanas observou-se intensa oxidação nas três variedades, tornando-os escuros, iniciando-se, ao mesmo tempo o entumescimento dos explantes.

A contaminação foi diferenciada entre as variedades, sendo zero em ‘Santa Alexandrina’, 8,6% em ‘Família’ e 26,7% em ‘Oliveira Neto’. Em geral, a contaminação de explantes retirados de sementes tende a ser nula, por estas não estarem em contato direto com o ambiente. Neste caso, porém, é possível que a contaminação tenha ocorrido pelo estágio de maturação avançado em que se encontravam os frutos.

Quadro 6: Resultados obtidos em cultura de cotilédone de três variedades de manga *in vitro*, em número de explantes (teste nº 1)

	Santa Alexandrina	Família	Oliveira Neto
Sistema radicular	8	5	6
Plântula	-	-	-
Inativo	22	27	16
Contaminação	-	3	8
Total	30	35	30

Oito semanas após a inoculação, observou-se um início de desenvolvimento de sistema radicular em alguns explantes. Levando-se em conta somente os explantes que não foram contaminados, o desenvolvimento de raízes ocorreu em 26,7% dos explantes de ‘Santa Alexandrina’, 14,3% de ‘Família’ e 20,0% de ‘Oliveira Neto’. O desenvolvimento do sistema radicular foi lento, cessando em cerca de seis semanas, quando o material se apresentava intensamente oxidado. Não ocorreu formação de parte aérea em nenhum explante.

Uma avaliação final foi realizada 16 semanas após a inoculação, retirando-se alguns explantes para observação . Internamente os tecidos apresentavam-se totalmente escuros, aparentemente sem células vivas, inclusive nos explantes com desenvolvimento de sistema radicular. Nesta ocasião, o material foi descartado.

No Quadro 7 têm-se os resultados de cultura de eixo embrionário das mesmas três variedades (teste nº 2). A contaminação foi semelhante à do teste anterior para as variedades Santa Alexandrina (zero) e Família (8,3%), porém a contaminação dos explantes de 'Oliveira Neto' foi de 100%.

Quadro 7: Resultados obtidos em cultura de eixo embrionário de três variedades de manga *in vitro*, em número de explantes (teste nº 2)

	Santa Alexandrina	Família	Oliveira Neto
Sistema radicular	-	3	-
Plântula	15	6	-
Inativo	-	2	-
Contaminação	-	1	15
Total	15	12	15

Durante as avaliações, o comportamento dos explantes foi semelhante ao do teste anterior (teste nº 1), inicialmente com excessiva oxidação e entumescimento, porém observou-se em grande parte dos explantes, além da formação de raízes, o desenvolvimento parcial da parte aérea (Figura 1).

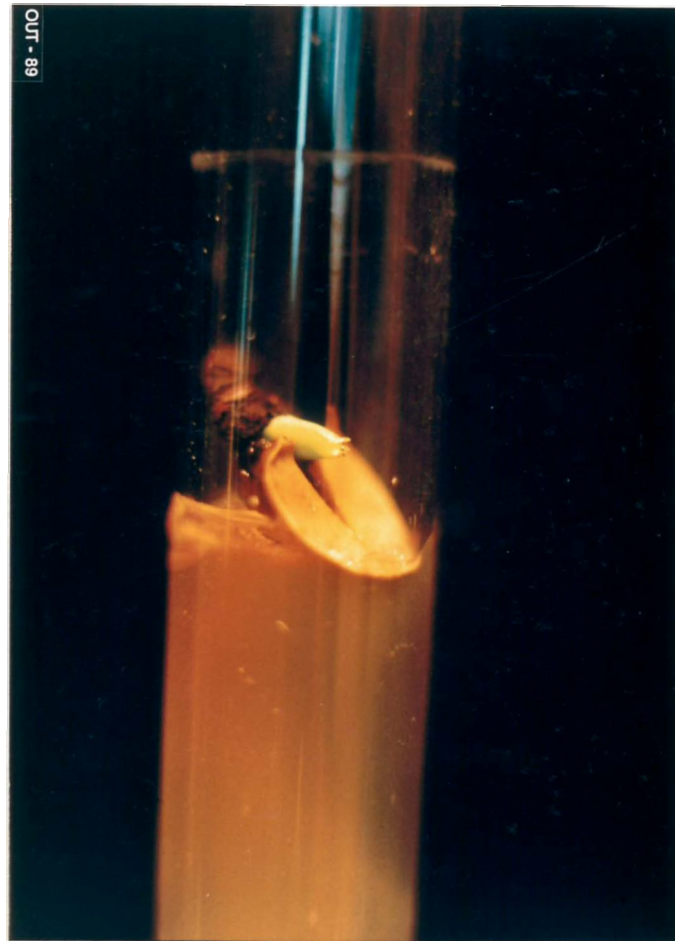


Figura 1: Cultura *in vitro* de eixo embrionário de manga variedade Santa Alexandrina, mostrando seu desenvolvimento.

Levando-se em conta somente os explantes não contaminados, na variedade Santa Alexandrina 100% apresentou desenvolvimento de sistema radicular e parte aérea. Na variedade Família, 27,3% apresentou somente sistema radicular e em 54,5% houve desenvolvimento de sistema radicular e parte aérea.

Nos testes nº 7 e 8, instalados respectivamente com eixos embrionários e cotilédones das variedades Bourbon, Oliveira Neto e Imperial, todos os explantes de eixo embrionário e metade dos explantes de cotilédone foram mantidos no escuro durante todo o tempo de cultura, visando diminuir a oxidação.

Nos explantes de eixo embrionário (teste nº 7) observou-se inicialmente ligeira oxidação seguida de entumescimento, com rachaduras nos explantes. Cerca de 85 dias após a inoculação, iniciou-se o desenvolvimento do eixo embrionário, seguido de formação de calo. Na 19ª semana em cultura, os explantes foram reinoculados em meio novo. Nesta ocasião, os calos estavam escuros, porém a parte interna dos explantes apresentava-se somente com ligeira oxidação. A partir daí foram realizadas avaliações periódicas, porém não houve continuidade no desenvolvimento de calo. Durante este período houve alguma contaminação, porém inexpressiva.

Cerca de cinco meses após a reinoculação, observou-se o início de desenvolvimento de estruturas organizadas em três explantes da variedade Imperial e formação de calo de coloração clara em um explante de 'Oliveira Neto'. Os explantes de 'Bourbon', juntamente com os outros de 'Imperial' e 'Oliveira Neto' foram ainda mantidos no escuro por algumas semanas, porém permaneceram inativos, sendo então descartados.

a) **variedade Imperial:** nas Figuras 2 e 3 tem-se uma visão dos explantes em cultura, podendo-se observar o calo, intensamente oxidado, e o crescimento de protuberâncias de coloração clara a partir do calo, possivelmente indicando a ocorrência de organogênese indireta. Os explantes da Figura 2 não puderam ser acompanhados, pois apresentaram contaminação por bactérias alguns dias depois. Acredita-se que tenha ocorrido contaminação endógena pelo aspecto observado.

A Figura 4 apresenta um maior detalhe do material da Figura 3, onde se vê o segmento cotiledonar à esquerda, a massa de calo totalmente oxidada e as protuberâncias que se formaram no calo.

Este material foi selecionado para a realização de cortes histológicos, sendo para isto fixado em FAA (formaldeído, ácido acético e álcool) e montado em blocos de parafina. Posteriormente foi cortado em micrótomo com 12 micra de espessura, distendido em lâminas de vidro, coloridos com “fastgreen” e safranina e preparados com bálsamo do Canadá em lâmina permanente. A região oxidada apresentou grande dificuldade na adesão dos cortes na lâmina, possivelmente pela perda de união entre as células provocada pela própria oxidação, tornando o calo altamente friável. Apesar das dificuldades, as lâminas obtidas permitiram visualizar as seguintes estruturas: embrião somático, gema e raiz adventícia, apresentadas nas Figuras 5, 6 e 7.

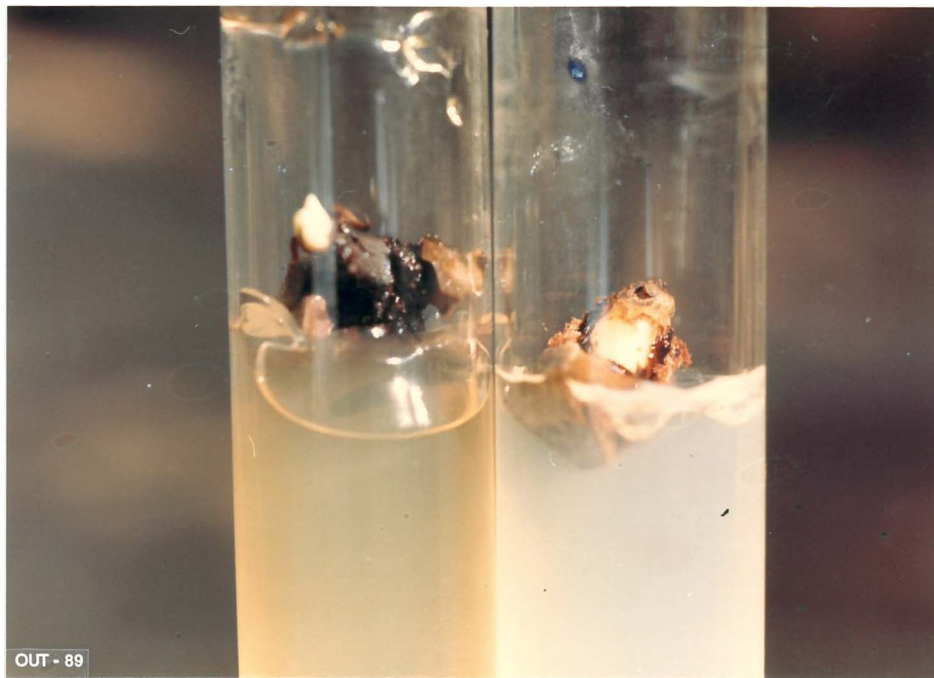


Figura 2: Cultura *in vitro* de eixo embrionário de manga variedade Imperial, mostrando a formação de calo e organogênese indireta.

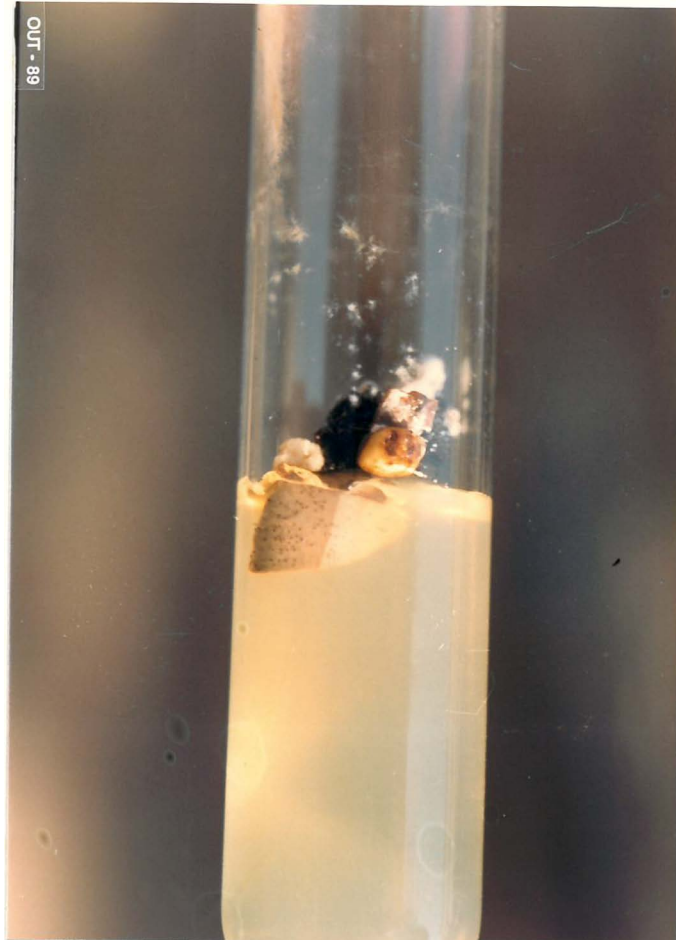


Figura 3: Cultura *in vitro* de eixo embrionário de manga variedade Imperial, mostrando a formação de calo e organogênese indireta.



Figura 4: Detalhe do explante de eixo embrionário de manga, variedade Imperial, apresentado na Fig. 3 (escala 4:1).

Na Figura 5 observam-se células de coloração avermelhada, relativamente grandes e irregulares, características de tecido de calo. No lado inferior direito, observa-se estrutura organizada de coloração esverdeada, com células pequenas, isodiamétricas, com formação típica de embrião em estágio de “torpedo”, com dois cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e o suspensor (apesar do corte ter sofrido dobra, é possível a identificação do embrião). Um pouco acima observa-se outra estrutura de coloração esverdeada, em fase inicial de organização dos tecidos. Esta estrutura pode ser melhor visualizada na Figura 6.

A Figura 6 apresenta uma formação organogenética indireta, com células de coloração avermelhada, onde se distingue uma camada externa de células menores, correspondendo à protoderme (epiderme), outra camada com células ligeiramente maiores, correspondente ao tecido fundamental (córtex), e, no centro um conjunto de células mais indiferenciadas formando o procâmbio, que dará origem aos feixes vasculares. Em volta desta formação meristemática partem duas estruturas com organização de células de forma seriada, indicando a diferenciação de tecido vascular em primórdios foliares. Em outros cortes desta estrutura pode-se observar uma abertura dos primórdios foliares, indicando o futuro desenvolvimento do meristema apical nesta direção. Este tipo de estrutura assemelha-se em muito a uma gema adventícia, com dois primórdios foliares.

Na Figura 7 vê-se uma formação típica de corte transversal de raiz, onde se distingue uma camada externa de células epidérmicas, de coloração escura, seguida mais internamente pela região do córtex, com células de coloração avermelhada, e no centro, células de coloração esverdeada, formando o cilindro central.

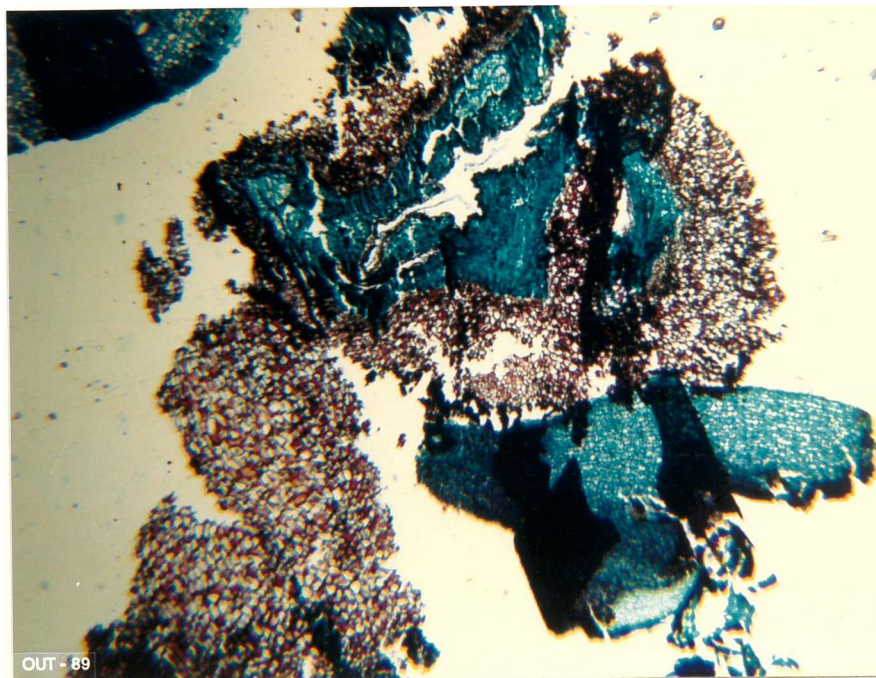


Figura 5: Corte longitudinal de explante de manga variedade Imperial, mostrando parte do tecido cotiledonar, tecido de calo, embrião somático e estrutura de gema adventícea (aumento de 100 vezes).

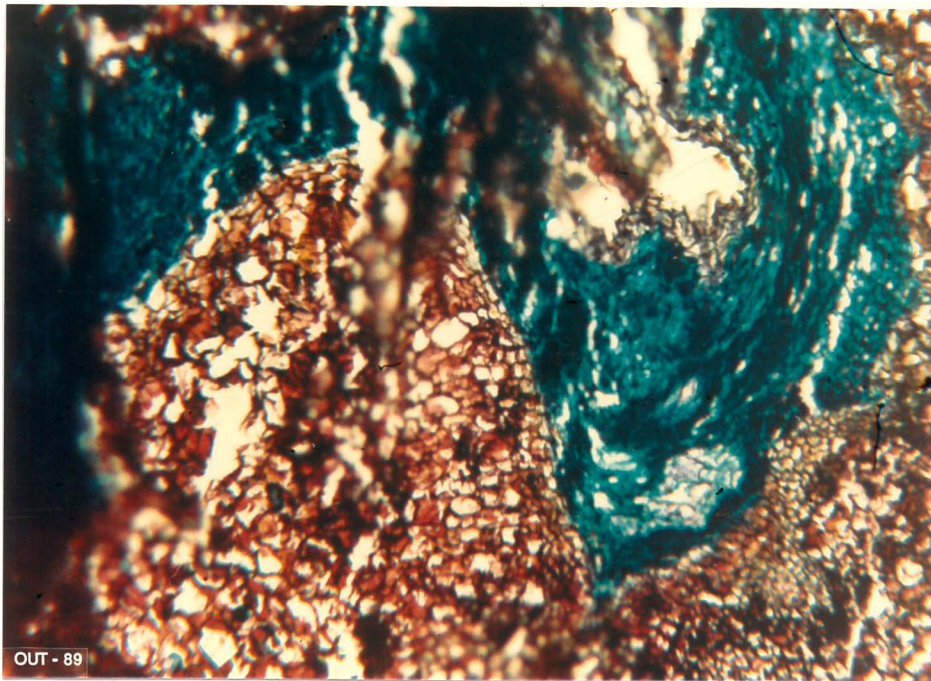


Figura 6: Corte longitudinal de explante de manga variedade Imperial, mostrando a formação de estrutura de gema adventícea (aumento de 400 vezes).

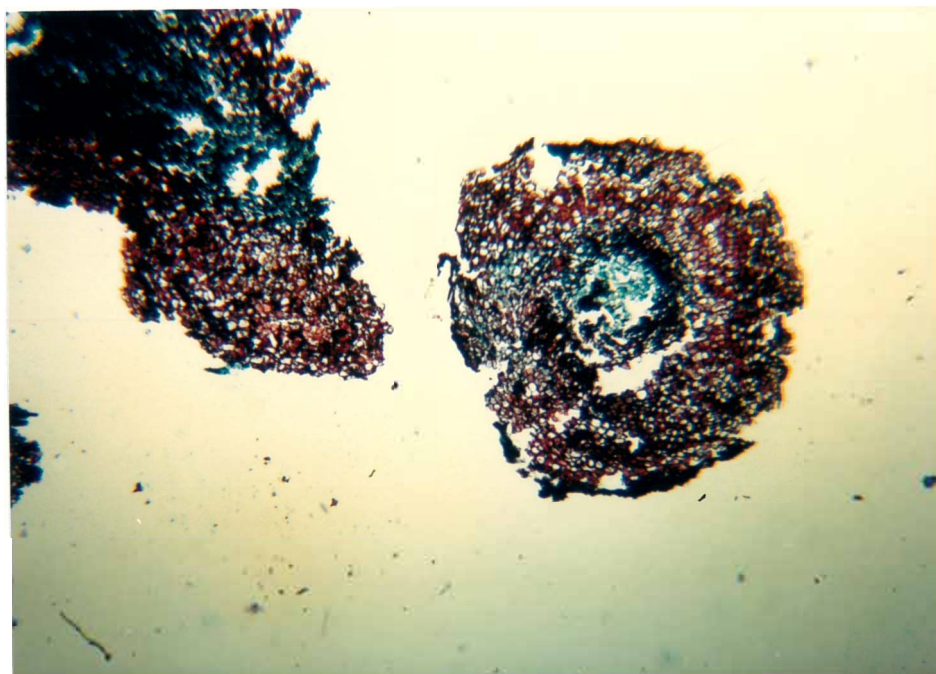


Figura 7: Corte transversal de raiz obtida a partir de calo de manga variedade Imperial, cultivado *in vitro* (aumento de 100 vezes).

b) **variedade Oliveira Neto:** o calo em desenvolvimento foi transferido para o mesmo meio, alterando-se a concentração de reguladores de crescimento, ou seja, adicionando-se apenas 1,0mg/l de 6BAP. Durante várias semanas o calo foi observado, notando-se um pequeno crescimento. Cerca de cinco meses após esta transferência observou-se um início de diferenciação das células, com a formação de inúmeros embriões, formando um agregado (“cluster”), como pode ser visto na Figura 8. Nesta ocasião realizou-se a transferência do material para meio de cultura composto por sais MS (1962), acrescido de 100 mg/l de meso inositol, 30g/l de sacarose e 6 g/l de agar. Depois da transferência o material foi mantido sob condições fotoperiódicas de 16/8h (claro/escuro), com observação diária de seu desenvolvimento. Em poucas semanas a massa de calo e embriões duplicou em tamanho, porém apresentou contaminação por fungos no meio de cultura. Imediatamente realizou-se a transferência do material para dois tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura anterior, acrescido de tiamina (0,4 mg/l). Alguns dias depois um dos tubos estava contaminado, sendo descartado. O outro tubo de ensaio foi mantido, porém não houve desenvolvimento dos embriões, mas somente um aumento em volume.

Embriogênese somática e organogênese foram obtidas e comprovadas pelos testes anatômicos, porém torna-se necessária maior quantidade de material para a realização de novos testes, utilizando-se diferentes condições de cultura para o estabelecimento da metodologia, visando a otimização do processo.



Figura 8: Embriogênese somática de manga variedade Oliveira Neto, obtida a partir de calo proveniente de cultura de eixo embrionário (escala 4:1).

Nos explantes de segmentos de cotilédones (teste nº 8), foi possível constatar claramente o efeito da luminosidade na oxidação dos explantes. Todos os explantes mantidos no claro apresentaram oxidação precoce e muito elevada, com escurecimento total dos explantes e do meio de cultura nas duas primeiras semanas. Esses explantes apresentaram ligeiro entumescimento nos primeiros dias, porém após oito semanas os explantes encontravam-se totalmente necrosados, externa e internamente, sendo todos descartados.

Os explantes mantidos no escuro apresentaram leve oxidação, com apenas alguns pontos escurecidos. Ocorreu entumescimento, observando-se desenvolvimento inicial de calo em apenas um explante, o qual foi reinoculado em meio novo. Em avaliação realizada vinte dias após a reinoculação, o explante apresentava-se contaminado por fungo. Nenhum outro explante apresentou qualquer desenvolvimento ou contaminação, sendo então descartados.

4.2. Cultura de embrião imaturo

Neste teste (nº 5) procurou-se seguir o protocolo para cultura de embriões de manga de LITZ (1986b), utilizando-se embriões imaturos de 'Oliveira Neto', porém a falta de condições para a realização de transferência diária dos explantes, recomendada pelo autor para diminuir a oxidação, impediu a obtenção de qualquer resultado positivo. Mesmo mantidos no escuro, os embriões se oxidaram totalmente em cerca de 4 semanas, sendo então descartados.

4.3. Cultura de limbo foliar

Neste teste (nº 3), os segmentos de limbo foliar de 'Tommy Atkins' inoculados foram obtidos de plantas que receberam um tratamento fitossanitário prévio. Os explantes foram separados em dois grupos, o primeiro das plantas pulverizadas com Karathane e o segundo com Cerconil, ambos fungicidas, misturados ao Kasumin, um bactericida. Esta medida visou um controle da contaminação, por se tratar de explantes obtidos em material de campo. Inicialmente os explantes apresentaram um bom entumescimento dos tecidos. A contaminação ocorreu somente por fungos em 28% dos explantes do primeiro grupo e 52% dos explantes do segundo grupo. A oxidação, porém, foi mais uma vez fator limitante, iniciando-se pelas extremidades e nervuras, e em poucas semanas atingindo todo o explante. Trinta dias após os explantes foram transferidos para meio novo com o objetivo de diminuir a oxidação, porém em mais trinta dias os explantes apresentavam-se totalmente oxidados, sendo descartados. Na Figura 9 pode-se observar um explante de limbo foliar, com as extremidades oxidadas, com a oxidação caminhando em direção ao centro do explante.

4.4. Cultura de segmentos nodais com gema axilar

Foram instalados três testes com este tipo de explante (4, 6 e 9). No primeiro (teste nº 4) foram coletados ramos das mesmas plantas de 'Tommy Atkins' de onde foram retirados os explantes de limbo foliar, as quais receberam tratamento fitossanitário prévio no pomar. Nas primeiras quatro semanas, 82% dos explantes foram contaminados, sendo 49% por fungos, 24% por bactérias e 9% por fungos e bactérias. O material restante, 18%, apresentava-se com a base bastante entumescida com rachaduras e entumescimento das

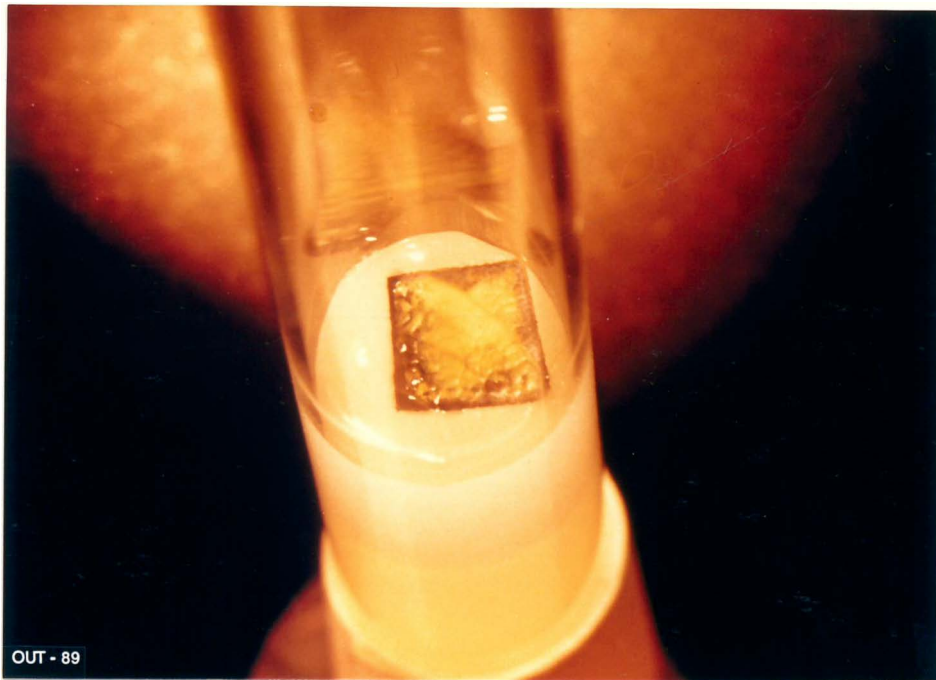


Figura 9: Cultura *in vitro* de limbo foliar de manga variedade Tommy Atkins (escala 4:1).

gemas axilares, porém bastante oxidados. Em cerca de três semanas observou-se um início de formação de calo na região do pecíolo, ocorrendo a abscisão deste.

Na Figura 10 pode-se observar um explante de segmento nodal com a formação de calo na região de abscisão do pecíolo, e o entumescimento da gema axilar. Aos trinta dias os explantes foram reinoculados, retirando-se as partes oxidadas. Em mais trinta dias, porém, o material foi descartado, por contaminação e necrose.

O teste nº 6 foi instalado com o mesmo material de 'Tommy Atkins', porém em apenas 21 dias todos os explantes haviam sido contaminados, sendo 74% por fungos, 23,5% por bactérias e 2,5% por fungos e bactérias.

No teste nº 9 foram utilizadas as variedades 'Manila', 'Joe Welch', 'Sensation' e 'Tommy Atkins' sendo o teste dividido em duas partes. A primeira foi instalada normalmente e na segunda acrescentou-se ao meio de cultura Benlate, Neantina e Kasumin, a fim de eliminar a contaminação dos explantes.

Da mesma forma que nos outros testes, ocorreu inicialmente o entumescimento da base dos explantes, com rachaduras, entumescimento da gema axilar, e formação de calo na região de abscisão do pecíolo. A contaminação inicial foi bastante diferenciada entre os dois tratamentos, porém observou-se um escurecimento excessivo nos explantes inoculados em meio de cultura acrescido de produtos esterilizantes. Posteriormente também esses explantes foram contaminados, porém observou-se que os microorganismos não se desenvolviam no meio de cultura, surgindo somente na parte do explante externa ao meio. Os microorganismos geralmente apareciam em fermentos, ou na zona de abscisão do pecíolo, ou na gema, se desenvolvendo e tomando totalmente o explante.



Figura 10: Detalhe de um explante de segmento nodal de manga variedade Tommy Atkins, mostrando a região de abscisão do pecíolo com formação de calo, e a abertura das estípulas com a gema axilar entumescida (escala 5:1).

4.5. Comentários finais e sugestões

Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios em vista das dificuldades obtidas no transcorrer do trabalho. Os maiores problemas observados foram contaminação e oxidação dos explantes, ambos provocando perda de grande parte do material. De certa forma essas dificuldades já eram esperadas, porém não com tamanha intensidade e impossibilidade de controle.

Considera-se atualmente impossível o controle total da contaminação, especialmente em material adulto, proveniente do campo, porém é importante que se busquem alternativas que permitam uma diminuição dos agentes contaminantes.

O cultivo de plantas enxertadas em casa de vegetação, para fornecimento de explantes, mantidas sob controle fitossanitário periódico tem sido utilizado para algumas espécies florestais com este objetivo.

Outro fator que pode colaborar indiretamente para a diminuição das taxas de contaminação é o estado nutricional da planta. Se mantida sob condições adequadas de nutrientes a planta pode apresentar maior resistência às infecções, além de apresentar um desenvolvimento mais rápido e vigoroso.

A manutenção dos explantes no escuro e a realização de constantes re inoculações parecem indispensáveis para o controle, mesmo que parcial, da oxidação. O uso de anti-oxidantes também pode ser eficiente, porém há indícios de que estes produtos possam provocar variações indesejáveis no comportamento das culturas *in vitro*.

Apesar de terem sido poucos os explantes com resultados positivos, estes

mostraram a viabilidade do desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos de manga. Maiores estudos devem ser realizados no sentido de minimizar os efeitos prejudiciais, para que seja possível a otimização do processo e futura aplicação prática para a cultura da mangueira.

5. CONCLUSOES

1. A oxidação fenólica foi fator limitante ao estabelecimento da cultura, em todas as variedades e em todos os tipos de explante testados, causando morte destes.
2. A contaminação por fungos e bactérias impediu o desenvolvimento de explantes de segmentos nodais com gema axilar, sendo considerada limitante em cultura de tecidos de material vegetal proveniente de plantas do campo.
3. A variedade Tommy Atkins apresentou início de desenvolvimento da gema axilar em cultura de segmentos nodais mais rápido e mais vigoroso do que as outras variedades.
4. A variedade Santa Alexandrina apresentou maior competência para desenvolvimento de plantas a partir de eixos embrionários.
5. As variedades Oliveira Neto e Imperial apresentaram maior capacidade de formação de calo e embriogênese somática a partir de eixos embrionários.

6. LITERATURA CITADA

AGRAWAL, A.; RAM, S. & GARG, G.K. Endogenous cytokinins of mango (*Mangifera indica* L.) shoot tips and their significance in flowering. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, **18**:504-9, 1980.

ALLARD, R.W. Princípios do Melhoramento Genético das Plantas. São Paulo, Ed. Edgard Blucher, 1971. 381p.

AMIN, R.S. Softwood grafting of mango *in situ*. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, **35** (2): 105-8, 1978.

BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*; Trees I. Berlin, Springer-Verlag, 1986. v.1, p 1-23.

BASU, R.N.; LAHIRI, B. & SEN, P.K. Biochemical changes during regeneration of roots in air layers of mango (*Mangifera indica* L.). *Current Science*, Bangalore, **36**(15):413-5, 1967.

BA SU, R.N.; BOSE, T.K.; ROY, B.N. & MUKHOPADHYAY, A. Auxin synergists in rooting of cuttings. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **22**:649-52, 1969.

- BHAN, K.C.; SAMADDAR, H.N. & YADAV, P.S. Chip budding and stone-grafting of mangoes in India. *Tropical Agriculture*, Trinidad, 46(3):247-53, 1969.
- BHOJWANI, S.S. & RAZDAN, M.K. *Plant tissue culture: theory and practice*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1983. 502 p. (Developments in Crop Science: 5).
- BOULAY, M. *In vitro* propagation of tree species. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; & BIESBOER, D.D., eds. *Plant tissue and cell culture*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1987. p.367-82.
- BUELL, E.P. Flowering and fruiting habits of the mango in the wet zone. *Tropical Agriculturist*, Peradeniya, 110(4):280-4, 1954.
- CADILLAT, R.M. Importations de fruits tropicaux dans la CEE. *Fruits*, Paris, 31(6):407-8, 1976a.
- CADILLAT, R.M. Chronique économique: mangues. *Fruits*, Paris, 31(11):717, 1976b.
- CHACKO, E.K.; REDDY, Y.T.N. & ANANTHANARAYANAN, T.V. Studies on the relationship between leaf number and area and fruit development in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Horticultural Science*, London, 57:483-92, 1982.
- CHADHA, K.L. & PAI, R.N. *Mangifera indica*. In: HALEVY, A.H., ed. *CRC Handbook of flowering*, Boca Raton, CRC Press, 1985. v.5, p.211-30.
- CHAKRABARTI, V. & SADHU, M.K. Effects of age and length of rootstock and scion on the success of epicotyl grafting in mango. *Indian Journal of Agricultural Science*, New Delhi, 54(12):1066-72, 1984.
- CHIN, H.F. & ROBERTS, E.H. *Recalcitrant crop seeds*. Kuala Lumpur, Tropical Press, 1980. 152 p.
- CORBINEAU, F. & CÔME, D. Storage of recalcitrant seeds of four tropical species. *Seed Science and Technology*, Zurich, 16(1):97-103, 1988.
- De CANDOLE, A. *Origin of cultivated plants*. 2.ed. New York, Hafner Publ., 1959. 468p.

- DEBERGH, P.C.A. Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; & BIESBOER, D.D., eds. *Plant tissue and cell culture*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1987. p.383-93.
- DEWALD, S.G. & LITZ, R.E. Somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). *Hort Science*, Alexandria, **22**(5 Sec.2):1117, 1987. (conference abstract).
- DEWALD, S.G.; LITZ, R.E. & MOORE, G.A. Somatic embryogenesis and plantlet formation from *Mangifera indica* L. callus. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6., Minneapolis, 1986. *Abstracts*. Minneapolis, 1986. p.136.
- DHAKAL, B.R. & HODA, M.N. Vigour of mango veneer grafts in relation to defoliation period and storage of scion shoots. *South Indian Horticulture*, Coimbatore **34**(3):184-6, 1986. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, **58**(5). 1988.
- DONADIO, L.C. *Cultura da mangueira*. Piracicaba, Livroceres, 1980. 67 p.
- DONATO, M. de. Le tecniche di coltura asettica applicate alle piante superiore ed il loro contributo al miglioramento della produzione vegetale. *Annali dell'Accademia di Agricoltura di Torino*, Torino **123**:89-106. 1981.
- DONI, M.E. *Manga: subsídio para implantação do Centro de Mandioca e Fruticultura*. Cruz das Almas, EMBRAPA, 1975. 22p.
- DURIGAN, J.C. Enxertia em variedades de manga do Distrito Federal. *Cerrado*, Brasilia, **8**:25-8, 1976.
- EVERS, P.W.; DONKERS, J.; PRAT, A. & VERMEER, E. *Micropropagation of forest trees through tissue culture*. Wageningen, Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1988. 84 p.
- FAO. *Production Yearbook*. Roma, 1987. v.41, p.218. (FAO statistics series, no 82)
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. Recalcitrance – a current assessment. *Seed Science & Technology*, Zurich, **16**(1):155-66, 1988.

- GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N. & SALGADO, C.L. *Manual de Fitopatologia; doenças das plantas e seu controle*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1968. 640p.
- GAZIT, S. & KADMAN, A. 13-1 Mango rootstock selection. *HortScience*, Alexandria, **15**(5):669, 1980.
- GONÇALVES, A.N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO. Águas de São Pedro, 1980. *Anais. Águas de São Pedro, Sociedade Brasileira de Silvicultura*, 1980. 6p.
- GORTER, C.J. Synergism of indole and indole-3-acetic acid in the root production of *Phaseolus* cuttings. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **11**:1-9, 1958.
- GORTER, C.J. Auxin-synergists in rooting of cuttings. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **22**:497-502, 1969.
- GRAVENA, S. & ZACCARO, R. Manejo da broca da seca-da-mangueira *Hypocryphalus mangiferae* Stebbing. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais. Jaboticabal, UNESP*, 1980. p.131-6.
- HUANG, S.C. & MILLIKAN, D.F. *In vitro* micrografting of apple shoot tips. *HortScience*, Alexandria, **15**:741-3, 1980.
- HUTCHINSON, J.F. & ZIMMERMAN, R.H. Tissue culture of temperate fruit and nut trees. *Horticultural Reviews*, Westport, **9**:273-350, 1987.
- IVER, C.P.A. & SUBRAMANYAM, M.D. Possible role of embryo culture in mango breeding. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, **29**(2):135-6, 1972.
- JONARD, R.; HUGARD, J.; MACHEIX, J.J.; MARTINEZ, J.; MOSELLA-CHANCEL, L.; POESSEL, J.L. & VILLEMUR, P. *In vitro* micrografting and its application to fruit science. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **20**:147-59, 1983.
- JONKERS, H. Growth regulators in fruit production reviewed from ISHS Symposia at St. Paul and Long Ashton, 1972. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **1**:279-90, 1973.

- KACHRU, R.B.; SINGH, R.N. & CHACKO, E.K. Inhibition of flowering in mango (*Mangifera indica* L.) by gibberellic acid. *HortScience*, Alexandria, **6**(2):140-1, 1971.
- KADMAN, A.; GAZIT, S. & ZIV, G. Selection of mango rootstocks for adverse water and soil conditions in arid areas. *Acta Horticulturae*, The Hague, **57**:81-7, 1976.
- KAHLON, P.S.; MISHRA, M.L. Effect of leaf lamina on the success and scion vigour in veneer grafting of mango. *Punjab Horticultural Journal*, Chandigarh, **19**(1/2):56-8, 1979. Apud *Horticultural Abstract*, Wallingford, **50**(7). 1980.
- KANWAR, J.S. & BAJWA, M.S. Propagation of mango by side grafting. *Indian Journal of Agricultural Science*, New Delhi, **44**(5):270-2, 1974.
- KING, M.W. & ROBERTS, E.H. *The storage of recalcitrant seeds; achievements and possible approaches*. Rome, IBPGR Secretariat, 1979, 96p.
- KNIGHT, R. JR. Origin and world importance of tropical and subtropical fruit crops. In: NAGY, S. & SHAW, P.E., ed. *Tropical and subtropical fruits; composition, properties and uses*. Westport, AVI Publishing, 1980. p.1-120.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P & SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus. Planta*, Berlin, **106**:237-45, 1972.
- LITZ, R.E. In vitro somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. *HortScience*, Alexandria, **19**(5):715-17, 1984b.
- LITZ, R.E. Mango (*Mangifera indica*). In: BAJAJ, Y.P.S. ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Springer-Verlag, 1986a. v.1 , p.267-73.
- LITZ, R.E. Mango. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R. & AMMIRATO, P.V. *Handbook of Plant Cell Culture; Techniques and applications*. New York, Macmillan Publishing Company, 1986b. v.4, p.612-25.
- LITZ, R.E. Application of tissue culture to tropical fruits. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; & BIESBOER, D.D., eds. *Plant tissue and cell culture*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1987. p.407-18.
- LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. High-frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. *Annals of Botany*, London, **51**:683-6, 1983.

- LITZ, R.E.; KNIGHT, R.J. & GAZIT, S. Somatic embryos from cultured ovules of polyembryonic *Mangifera indica* L. *Plant Cell Reports*, Berlin, 1:264-6, 1982.
- LITZ, R.E.; KNIGHT, R.J. & GAZIT, S. In vitro somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 22:233-40, 1984.
- LITZ, R.E.; MOORE, G.A. & SRINIVASAN, C. In vitro systems for propagation and improvement of tropical fruits and palms. *Horticultural Reviews*, Westport, 7:157-200, 1985.
- MAHESHWARI, P. & RANGASWAMI, N.S. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore. 15:275-82, 1958.
- MAITI, S.C. & BISWAS, P. Effect of scion variety and type of scion shoot on success of epicotyl grafting of mango. *Punjab Horticultural Journal*, Chandigarh, 20(3/4):152-5, 1980. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, 51(10). 1981.
- MANICA, I. *Manga*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres Ltda, 1981. 135p. (Fruticultura Tropical, 2).
- MEDCALF, J.C. Controle de Moléstias da mangueira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais. Jaboticabal, UNESP*, 1980. p.107-11.
- MEDINA, J.C. ; BLEINROTH, E.W. ; DE MARTIN, Z.J. ; QUAST, D.G. ; HASHIZUME, T. ; FIGUEIREDO, N.M.S. ; MORETTI, V.A. ; CANTO, W.L. & BICUDO NETO, L.C. *Manga; da cultura ao processamento e comercialização*. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981. 399p. (Série Frutas Tropicais, 8).
- MORAES, L.G. de; ZACCARO, R.P. & MORAES JR., L.G. Propagação da mangueira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais. Jaboticabal, UNESP*, 1980. p.63-7.
- MOREIRA, C.S. Formação da muda da mangueira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais. Jaboticabal, UNESP*, 1980. p.57-61.
- MUKHERJEE, S.K. The mango and its relatives. *Science and Culture*, Calcutta, 15:5-19, 1949.

- MUKHERJEE, S.K. Mango, its allopolyploid nature. *Nature*, London **150**:196-7, 1950.
- MUKHERJEE, S.K. The mango, its botany, cultivation, uses and future improvements, especially as observed in India. *Economic Botany*, Lancaster, **7**:130-62, 1953.
- MUKHERJEE, S.K.; BID, N.N. Propagation of mango (*Mangifera indica* L.). II. Effect of etiolation and growth regulator treatments on the success of air-layering. *Indian Journal of Agricultural Science*, New Delhi, **35**(4):309-14, 1965.
- MUKHERJEE, S.K.; MAJUMDER, N.N.; BID, N.N. & GOSWAMI, A.M. Clonal propagation of mango through cuttings. *Current Science*, Bangalore, **34**(14):434-5, 1965.
- MUKHERJEE, S.K.; MAJUMDER, N.N.; BID, N.N. & GOSWAMI, A.M. Standardization of rootstocks of mango (*Mangifera indica* L.). II. Studies on the effects of source, invigoration and etiolation on the rooting of mango cuttings. *Journal of Horticultural Science*, London, **42**(1):83-7, 1967.
- MUKHERJEE, S.K.; SINGH, R.N.; MAJUMDER, N.N. & SHARMA, D.K. Present position regarding breeding of mango (*Mangifera indica* L.) in India. *Euphytica*, Dordrecht, **17**:462-7, 1968.
- MULLINS, M.G. Application of tissue culture to the propagation and improvement of fruit crops. *South Indian Horticulture*, Commemoration issue, p.127-34, 1983.
- MULLINS, M.G. Propagation and genetic improvement of temperate fruits: the role of tissue culture. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; & BIESBOER, D.D., eds. *Plant tissue and cell culture*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1987. p.395-406.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, **25**:135-66, 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **15**:473-97, 1962.
- NAIK, K.C. & RAO, M.M. Studies on blossom biology and pollination in mangoes. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, **1**(2):107-19, 1943.

- NAKASONE, H.Y.; BOWERS, F.A.I. & BEAUMONT, J.H. Terminal growth and flowering behaviour of the Pirie mango in Hawaii. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Geneva, **66**:183-91, 1955.
- NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M. & JUAREZ, J. Aberrant *Citrus* plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured *in vitro*. *HortScience*, Alexandria, **20**:214-5, 1985.
- OHASHI, O.N.B. Influência de porta-enxertos e copa na produtividade da mangueira *Mangifera indica* L. Piracicaba, 1984. 60p. (Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ USP).
- OLIVEIRA, C.A.L. Ácaros da mangueira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais. Jaboticabal*, UNESP, 1980. p.141-7.
- PAL, S. & RAM, S. Endogenous gibberellins of mango shoot-tips and their significance in flowering. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **9**:369-79, 1978.
- PATEL, M.H. & AMIN, R.S. Possibilities of bench grafting on young seedling of mango (*Mangifera indica* L.) under Anand conditions. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, **33**(2):156-61, 1976.
- PATEL, M.H. & AMIN, R.S. Investigation into the best period for soft wood grafting of mango *in situ*. *South Indian Horticulture*, Coimbatore, **29**(2):90-4, 1981. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, **51**(11). 1981.
- PINHEIRO, R.V.R.; ANDERSEN, O. & FORTES, J.M. Comparação de modalidades de enxertia na propagação da mangueira (*Mangifera indica* L.). *Revista Ceres*, Viçosa, **17**:264-73, 1970.
- POPENOE, W. *Manual of Tropical and Subtropical Fruits*. 2 ed. New York, Hafner Press, 1974. 474p.
- PRASAD, A. & PATAK, R.A. Biennial bearing of mango. *Tropical Agriculturist*, Peradeniya, **126**:35-56, 1970.
- PURSEGLOVE, J.W. *Tropical Crops; Dicotyledons 1*. London, Longmans Green & Co. Ltd., 1968. 332p.

- PURSEGLOVE, J.W. Mangoes West of India. *Acta Horticulturae*, The Hague, **24**:170-3, 1972.
- RAM, S. & BIST, L.O. Studies on venner grafting of mango in Tarai. *Punjab Horticultural Journal*, Chandigarh, **22**(1/2):64-71, 1982. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, **53**(4). 1983.
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T. & BITTERS, W.P. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic *Citrus*. *HortScience*, Alexandria, **3**:226-7, 1968.
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T. & BITTERS, W.P. In vitro studies of zigotic and nucellar embryogenesis in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1969. *Proceedings*. Riverside, 1969. p.225-9.
- RAO, A.N.; SIN, Y.M.; KOTHAGODA, N. & HUTCHINSON, J.F. Cotyledon tissue culture of some tropical fruits. In: COSTED SYMPOSIUM ON TISSUE CULTURE OF ECONOMICALLY IMPORTANT PLANTS, Singapore, 1981. *Proceedings*. Singapore, 1981. p.124-37.
- REECE, P.C.; FURR, J.R. & COOPPER, W.C. The inhibitory effect of terminal bud on flower formation in the axillary buds of the 'Haden' mango (*Mangifera indica* L.). *American Journal of Botany*, New York, **33**:209-10, 1946.
- REECE, P.C.; FURR, J.R. & COOPPER, W.C. Further studies of floral induction in the 'Haden' mango (*Mangifera indica* L.). *American Journal of Botany*, New York, **36**:734-40, 1949.
- RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL - 1984. Propagação da mangueira através da microenxertia. Cruz das Almas, CNPMF/EMBRAPA, 1985. p.239-40.
- RIBEIRO, I.J.A. Seca da Mangueira - agentes causais e estudo da moléstia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais*. Jaboticabal, UNESP, 1980. p.123-30.
- RODRIGUEZ, J.A.S.; PINHEIRO, R.V.R.; MANICA, I.; CASALI, V.W.D. & CONDE, A.R. Comportamento de dez variedades de manga em Viçosa e Visconde do Rio Branco, Minas Gerais. *Revista Ceres*, Viçosa, **24**(136):580-95, 1977.

- RUEHLE, G.D. & LEDIN, R.B. Mango growing in Florida. *Bulletin Florida Agricultural Experiment Station*, (574):1-90, 1955.
- SADHU, M.K. Effect of pre-treatment of stock plants of mango with cycocel, ethrel and morphactin on the rooting of cuttings and air layers. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **10**:363-8, 1979.
- SADHU, M.K. & BOSE, S. Effect of ethylene on rooting of cuttings and air layers of mango, guava and waterapple. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, **37**(4):335-7, 1980.
- SADHU, M.K.; BOSE, S. & SAHA, L. Auxin synergists in the rooting of mango cuttings. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **9**:381-7, 1978.
- SAIDHA, T.; RAO, V.N.M. & SANTHANAKRISHNAN, P. Internal leaf ethylene levels in relation to flowering in mango. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, **40**(3/4):139-45, 1983.
- SALIBE, A.A. Aspectos do melhoramento de plantas frutíferas no Brasil. *Ciência e Cultura*, São Paulo, **23**(6):688-91, 1971.
- SAMPAIO, V.R. Moléstias de pós-colheita dos frutos da mangueira e seu controle. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais. Jaboticabal*, UNESP, 1980. p.113-21.
- SAMSON, J.A. *Tropical Fruits*. 2 ed. New York, Longman, 1986. 336p.
- SHOLEFIELD, P.B. A scanning electron microscope study of flowers of avocado, litchi, macadamia and mango. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **16**:263-72, 1982.
- SEN, P.K.; BASU, R.N.; BOSE, T.K. & ROYCHOUDHURY, N. Rooting of mango cuttings under mist. *Current Science*, Bangalore, **37**(5):144-6, 1968.
- SILVA, W.S. Aptidão climática da cultura da mangueira. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, **8**(86):5-8, 1982.
- SIMÃO, S. Estudo do poder germinativo da semente de manga. *Anais ESALQ*, Piracicaba, **16**:289-297, 1959.
- SIMÃO, S. Estudo da planta e do fruto da mangueira (*Mangifera indica* L.). Piracicaba, 1960a. 167p. (Cátedra - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).

- SIMÃO, S. Doenças que reduzem a frutificação das mangueiras. *Boletim de Agricultura*, Belo Horizonte, 9(3-4):53-6, 1960b.
- SIMÃO, S. *Manual de Fruticultura*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1971. 530p.
- SIMÃO, S. Situação da cultura da mangueira no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais*. Jaboticabal, UNESP, 1980. p.3-11.
- SIMÃO, S. Florescimento irregular da mangueira. *Suplemento Agrícola*, São Paulo, 27(1422):5, 1982.
- SINGH, L.B. Mango grafting in eight weeks. *Science*, New York, 114(2963):393, 1951.
- SINGH, L.B. Propagation of mango by air-layering for rootstocks. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Geneva, 63:128-30, 1954.
- SINGH, L.B. *The mango; botany, cultivation and utilization*. London, Leonard Hill, 1968. 438p.
- SINGH, N.P. & SRIVASTAVA, R.P. Practical hints on veneer grafting in mango. *Indian Horticulture*, New Delhi, 23(4):6-8, 1979a. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, 50(5). 1980.
- SINGH, N.P. & SRIVASTAVA, R.P. Studies on the different aspects involved in veneer grafting in mango. *Progressive Horticulture*, Uttar Pradesh, 11(1):67-74, 1979b. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, 50(8). 1980.
- SINGH, R. & SINGH, R.N. Lateral bud growth in *Mangifera indica* L. in relation to auxin and inhibitor content of shoots and fruits. *Acta Horticulturae*, The Hague, 24:175-84, 1972.
- SINGH, R.N. Studies in the differentiation and development of fruit buds in mango (*Mangifera indica* L.). III. Mango shoots and fruit bud differentiation. *Horticultural Advance*, Sahanpur, 3:28-40, 1959.
- SINGH, R.N. Mango. In: SETHURAJ, M.R. & RAGHAVENDRA, A.S. *Tree crop physiology*. Amsterdam, Elsevier, 1987. cap.14, p.287-318.

- SINGH, R.N.; RAO, O.P. & SINGH, G. Propagational studies in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Langra. *Progressive Horticulture*, Uttar Pradesh, **16**(314):161-5, 1984. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, **56**(5). 1986.
- SINGH, R.N.; RAO, O.P. & SINGH, G. Modified veneer grafting in 'Langra' mango. *Indian Horticulture*, New Delhi, **31**(2):11-8, 1986. *Apud: Horticultural Abstract*, Wallingford, **57**(10). 1987.
- SINGH, R.N.; MAJUMDER, P.K. & SHARMA, D.K. Self incompatibility in mango var. Dashehari. *Current Science*, Bangalore, **31**:209, 1962.
- SINGH, R.N.; MAJUMDER, P.K.; SHARMA, D.K. & MUKHERJEE, S.K. Some promising mango hybrids. *Acta Horticulturae*, The Hague, **24**:117-9, 1972.
- SOARES, N.B. & VEIGA, A.A. Estudo de épocas para enxertia de mangueira por borbulhia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979. *Anais. Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura*, 1979. v.3, p.902-6.
- SOULE, J. Anatomy of the bud union in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Saint Joseph, **96**(3):380-3, 1971.
- THOMAS, C.A. Mango propagation by saddle grafting. *Journal of Horticultural Science*, London, **56**(2):173-5, 1981.
- TOMER, E. Inhibition of flowering in mango by gibberelic acid. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **24**:299-303, 1984.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P. & GALUN, E. *Citrus* cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Science Letters*, Amsterdam, **4**:231-6, 1975.
- YAMASHIRO, T. Fatores fitopatológicos que influem na floração e frutificação da mangueira (*Mangifera indica* L.) no Estado de São Paulo e seu controle. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979. *Anais. Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura*, 1979. v.3, p.922-6.

YAMASHIRO, T. Moléstias da mangueira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1., Jaboticabal, 1980. *Anais*. Jaboticabal, UNESP, 1980. p.101-6.

ZIMMERMAN, R.A. Tissue Culture. In: MOORE, J.N. & JANICK, J. *Methods in fruit breeding*. West Lafayette, Purdue University Press, 1983. p.124-135.