

EFEITO DO BAP E ANA E ATIVIDADE DA PEROXIDASE EM MANDIOCA (*Manihot esculenta* CRANTZ CV MCOL 22) CULTIVADA *in vitro*

BAP, NAA AND PEROXIDASE ACTIVITY IN CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz cv Mcol 22) MICROPROPAGATED

LIMA, Giuseppina P. P.¹; BARSALOBRES, Carla²; PIZA, Isabela M. T.³; CEREDA, Marney P.⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos reguladores de crescimento vegetal BAP – Benzilaminopurina e ANA– Ácido Naftalenoacético, na morfogênese *in vitro* da mandioca e suas relações com a atividade da peroxidase, enzima freqüentemente correlacionada ao processo organogenético em vegetais. Explantes de mandioca foram submetidos a quatro tratamentos utilizando BAP e/ou ANA, em meio MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado a 5,8. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura (25 ± 1°C) e luminosidade (1.000 lux, 16/8 h de claro/escuro) controladas. Avaliou-se a formação de calos, parte aérea (brotos) e raízes e a atividade da peroxidase, durante vinte e oito dias, com intervalo de sete dias entre cada coleta. BAP promoveu a formação de calos maiores e mais friáveis e ANA propiciou a formação de brotos em explantes de mandioca. A atividade da peroxidase mostrou relação direta com a formação de calos em meio ausente de reguladores de crescimento e inversa, tanto na organogênese no tratamento contendo BAP, como na rizogênese em meio contendo BAP ou ANA, respectivamente.

Palavras-chave: micropropagação, enzima, regulador de crescimento.

INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* e subsequente propagação é uma técnica atualmente bem estabelecida para diversas espécies e visa a propagação clonal, eliminação de vírus, conservação de germoplasma, entre outros (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), uma das espécies cultivadas do gênero *Manihot*, é uma planta que tem a maior parte de sua produção destinada à alimentação humana, através do consumo de suas raízes. Para grande número de países é o alimento predominante na dieta diária, como fonte de carboidrato. Além disso, é também empregada

na nutrição animal, sob forma de farelos obtidos da parte aérea. Na indústria, pode ser utilizada como matéria prima, na produção de amido (McMAHON & SAYRE, 1997). A mandioca pode ser multiplicada via micropropagação, porém, algumas cultivares apresentam problemas na aclimação devido à baixa taxa de formação de raízes, trazendo dessa forma, sérios problemas para instituições que necessitam da planta inteira para propagação no campo (CABRAL et al., 2000).

A espécie e o tipo de explante respondem de forma diferente à ação dos diversos tipos de reguladores de crescimento utilizados em culturas *in vitro*. Os principais tipos de reguladores, com efeito sobre a micropropagação, são as citocininas e auxinas (GONZALEZ, 1998) em que as concentrações são fatores determinantes para o desenvolvimento da planta *in vitro*.

A peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) é uma enzima que esta relacionada com a organogênese. Alterações na atividade geral e na complexidade do padrão eletroforético da isoenzima têm sido observados durante a rizogênese de várias plantas (RIVAL et al., 1997; FRANCISCO, 2001). ROVT & DAS (1995) associaram a regeneração de *Bambusa vulgaris* via embriogênese somática a enzimas como peroxidases e observaram que os estádios de desenvolvimento podem ser associados a alterações na atividade desta isoenzima.

A atividade da peroxidase pode ser alterada por fatores externos como luz ou outras radiações, estresse (saís e temperatura), senescência, regulador de crescimento, entre outros. Segundo GASPAR et al. (1994), a peroxidase está relacionada com a regulação ou alteração dos níveis endógenos de auxina. A complexidade das respostas desta enzima tem causado problemas em entender a função específica *in vivo* e seu papel no crescimento da planta e sua adaptação no ambiente (RIVAL et al., 1997).

Assim, o objetivo do trabalho foi o de avaliar o efeito dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e

¹ Eng. Agrônoma, Profa. Livre-Docente, Departamento de Química e Bioquímica, I.B., UNESP, CP 545, 18618-000, Botucatu – SP
E-mail: gpplima@ibb.unesp.br; Autora correspondente

² Bióloga, Departamento de Química e Bioquímica, IB UNESP, Botucatu - SP

³ Bióloga, MSc, Dra. Departamento de Química e Bioquímica, IB UNESP, Botucatu - SP

⁴ Eng. Agrônoma, Profa. Titular, CERAT – Centro de Raízes e Amidos Tropicais - UNESP, Botucatu - SP

(Recebido para publicação em 29/05/2002)

BAP (benzilaminopurina) e a atividade da enzima peroxidase durante o processo de formação de calos, brotos e raízes de mandioca em cultivo *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal de mandioca (*M. esculenta* Crantz cv MCOL 22) foi obtido a partir de estacas oriundas de plantas propagadas vegetativamente (propagação rápida) com idade aproximada de 15 dias. Esses explantes foram isolados de gemas apicais e laterais, contendo dois pares de folhas. Na desinfestação, segmentos caulinares foram imersos em etanol 70% por 60 segundos e em hipoclorito de sódio 20 % (produto comercial Q-Boa, contendo 2 % de cloro ativo) por 20 minutos, lavados quatro vezes em água destilada e esterilizada e inoculados em tubos de ensaio de 150 mm X 25mm contendo 15 mL de meio de cultura nutritivo semi-sólido (6% ágar) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), pH 5,8, contendo citocinina (BAP – Benzilaminopurina) e/ou auxina (ANA – Ácido Naftalenoacético), resultando em quatro tratamentos, com 8 repetições: controle (sem regulador crescimento); 0,1 mg L⁻¹ de BAP; 0,3 mg L⁻¹ de ANA; 0,1mg L⁻¹ de BAP + 0,3 mg L⁻¹ de ANA. Como fonte de carbono utilizou-se sacarose 30 g L⁻¹. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura (25 ± 1°C) e luminosidade (1.000 lux, 16/8 h de claro/escuro) controladas. Avaliou-se aos 7, 14, 21 e 27 dias a formação de calos, parte aérea (brotos), raízes e a atividade da peroxidase.

A atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) foi analisada nos calos, brotos (parte aérea) e raízes, em triplicata, utilizando o método descrito por LIMA et al. (1999), onde 0,5 g de material vegetal fresco foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 0,2M pH 6,7 e centrifugado por 20 minutos a 10.000 x g em centrífuga refrigerada (Jouan MR1812) a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima. Alíquotas de 1,0 mL foram colocadas em tubos de ensaio contendo H₂O₂, aminoantipirina e fenol e mantidas em banho Maria por 5 minutos. Etanol absoluto (2mL) foi utilizado para interromper a reação. A leitura foi feita em 505 nm em espectrofotômetro Perkin-Elmer UV/VIS. A atividade da enzima foi expressa em µmoles H₂O₂ decomposto.g matéria fresca⁻¹.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos inteiramente casualizados (4 x 4 x 8), sendo 4 tratamentos, 4 coletas e 8 repetições. As médias obtidas de oito repetições (± SD) foram calculadas através do programa estatístico ORIGIN 6.0 Professional.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos Morfogênicos

Segmentos caulinares (1,0 – 1,5 cm de comprimento) (Tabela 1), inoculados em meio sem regulador de crescimento (controle), não apresentaram formação de calos aos 7 dias. A partir de 14 dias e em todos os períodos de coletas subsequentes, ocorreu indução de tecido indiferenciado (calos). A suplementação do meio de cultura com BAP induziu a formação de calos, sendo que todos apresentaram raízes (Tabela 1). UNNIKISHNAN & SHEELA (2000) também observaram que a aplicação de BA (Benziladenina) induziu aumentos na porcentagem de calos indiferenciados em mandioca. ANA não mostrou ser tão eficiente como a citocinina utilizada para a indução de calos, no entanto, em associação com o BAP, apresentou efeito positivo. MALAMUG

et al. (1994) também verificaram que ANA em associação com BA induziu a formação de calos em *Colocasia esculenta* (taro). Neste trabalho, tanto ANA como BAP induziram calos, entretanto, no tratamento com BAP, os calos foram maiores e mais friáveis.

A regeneração de brotos (eixos caulinares) a partir dos segmentos internodais foi menos efetiva em meio contendo apenas BAP (Tabela 1). Provavelmente, a concentração utilizada foi baixa, pois em *Xanthosoma sagittifolium*, a regeneração ocorreu apenas quando foi usado 1 mg L⁻¹ de BAP (ZOK et al., 1998) e em *Dioscorea alata* a adição de 2 mg. L⁻¹ de BAP promoveu a emissão de múltiplos brotos (SOUZA, 2002). Em meio de cultura isento de regulador de crescimento (controle) também foi notada a formação de parte aérea, assim como para os demais tratamentos. As maiores taxas de emissão de parte aérea em mandioca foram observadas por NICOLINI (1995) em nós caulinares cultivados em meios contendo mínimas ou nulas concentrações de ANA. GRATAPAGLIA & MACHADO (1998) afirmaram que concentrações excessivas de auxina no meio de cultura podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calos em detrimento à multiplicação.

A rizogênese (Tabela 1) ocorreu tanto em meio contendo BAP ou ANA isoladamente. Explantes cultivados em meio controle, mostraram formação de maior número de raízes aos 7 dias (5 raízes em média). Referente à influência do regulador de crescimento ANA sobre o enraizamento, NAIR et al. (1979) relatam que altas concentrações induziram a formação de raízes mais vigorosas em plântulas regeneradas a partir de meristemas apicais de mandioca e as diferenças referentes às concentrações de ANA, que proporcionam melhor frequência de enraizamento, podem ser devidas aos diferentes níveis endógenos de auxina presente nas variedades de mandioca estudadas pelos autores. NICOLINI (1995) salientou, no entanto, que em meios contendo altas concentrações de ambos os reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), tal evento não foi constatado.

Atividade da Peroxidase

Calos submetidos a tratamento com BAP, aos 21 dias, apresentaram as maiores atividades da peroxidase (Tabela 2) onde, a presença desse regulador teria promovido aumento na porcentagem de formação de calos. Geralmente, durante a iniciação de órgãos e em regiões de ativa divisão celular, a atividade da peroxidase aumenta, por ser provavelmente, essencial no metabolismo do ácido indolacético (AIA), modificando o balanço hormonal na planta, modulando a morfogênese (MÄDER, 1975; BOUAZZA et al., 1993; SOUZA, 2002). Assim, a atividade da peroxidase estaria expressando a formação de calos na presença de BAP.

A atividade da peroxidase foi baixa durante o alongamento (desenvolvimento) de brotos (Tabela 2), em meio contendo BAP, mostrando dessa forma, uma relação inversa. Na literatura é encontrado que a peroxidase geralmente é alta durante a fase de máxima divisão celular, diminuindo durante o alongamento (PIZA, 2000). ANDERSEN et al. (1986) afirmaram que a enzima peroxidase poderia ser usada como um marcador de organogênese por participar da regulação endógena de AIA, agindo como AIA oxidase, principalmente nas fases de intenso crescimento ou formação de órgãos das plantas, e em estudos de desenvolvimento *in vitro* de cenoura, notaram que a baixa atividade da enzima poderia estar relacionada com a perda do potencial morfogênico.

Tabela 1 - Médias do número de calos (**NC**), número de brotos (**NB**) e número de raízes (**NR**) formados em explantes de *Manihot esculenta* Crantz, submetidos aos tratamentos BAP, ANA e BAP+ANA em cultivo *in vitro* nas quatro épocas de coletas.

Coletas	Avaliações	Tratamentos			
		Controle	BAP	ANA	BAP+ANA
7	NC	0,00	1,33 ± 0,33	2,00 ± 0,58	4,00 ± 0,58
	NB	4,33 ± 0,33	4,00 ± 0,58	4,33 ± 0,33	4,33 ± 0,33
	NR	5,00 ± 0,58	4,67 ± 0,33	4,00 ± 0,33	3,33 ± 0,33
14	NC	1,00	3,00 ± 0,58	2,00 ± 0,58	4,00 ± 0,58
	NB	4,33 ± 0,33	3,33 ± 0,33	5,67 ± 0,33	4,33 ± 0,33
	NR	5,33 ± 0,33	3,33 ± 0,33	3,33 ± 0,33	5,33 ± 0,33
21	NC	1,33 ± 0,58	3,33 ± 0,33	3,00 ± 0,33	5,00 ± 0,33
	NB	5,00 ± 0,58	3,33 ± 0,33	4,33 ± 0,33	4,33 ± 0,33
	NR	2,33 ± 0,33	5,33 ± 0,33	5,33 ± 0,33	2,33 ± 0,33
28	NC	1,33 ± 0,33	4,00 ± 0,58	1,33 ± 0,33	3,00 ± 0,58
	NB	3,33 ± 0,58	3,33 ± 0,33	3,33 ± 0,33	3,33 ± 0,33
	NR	5,33 ± 0,33	5,33 ± 0,33	5,33 ± 0,33	5,33 ± 0,33

Média ± SD (n = 8)

Tabela 2 - Atividade da peroxidase ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$ decomposto. g massa fresca⁻¹. minuto⁻¹), em calos (**C**), brotos (**B**) e raízes (**R**) formados em explantes de *Manihot esculenta* Crantz, submetidos aos tratamentos BAP, ANA e BAP+ANA em cultivo *in vitro* nas quatro épocas de coletas.

Coletas	Avaliações	Tratamentos			
		Controle	BAP	ANA	BAP+ANA
7	C	0,00	0,00	0,00	0,00
	B	0,138 ± 0,014	0,034 ± 0,002	0,067 ± 0,009	0,052 ± 0,010
	R	0,200 ± 0,010	0,054 ± 4,5.10 ⁻⁷	0,029 ± 9,5.10 ⁻⁷	0,002
14	C	0,001	0,101 ± 4,5.10 ⁻⁷	0,176 ± 0,003	0,042 ± 0,007
	B	0,058 ± 0,003	0,058 ± 0,002	0,053 ± 7.10 ⁻⁷	0,058 ± 0,007
	R	0,197 ± 0,030	0,134 ± 0,011	0,131 ± 0,004	0,106 ± 1.10 ⁻⁶
21	C	0,086 ± 0,004	0,067 ± 0,007	0,026 ± 0,006	0,040 ± 0,001
	B	0,083 ± 0,007	0,054 ± 0,004	0,037 ± 0,005	0,024 ± 0,003
	R	0,178 ± 7,5.10 ⁻⁷	0,066 ± 0,003	0,044 ± 0,009	0,038 ± 6,3.10 ⁻⁷
28	C	0,138 ± 0,004	0,034 ± 0,007	0,067 ± 0,006	0,052
	B	0,045 ± 0,004	0,080 ± 0,007	0,016 ± 0,002	0,009 ± 3,7.10 ⁻⁴
	R	0,223 ± 0,011	0,066 ± 0,004	0,059 ± 1,3.10 ⁻⁷	0,021 ± 1,3.10 ⁻⁷

Média ± SD (n = 8)

Assim, a peroxidase é formada como conseqüência da diminuição da auxina endógena e a aplicação de ANA no meio de cultura (0,3 mg L⁻¹ de ANA) pode ter prevenido esse efeito resultando numa menor atividade da enzima, quando comparada ao controle e ao tratamento contendo citocinina, durante a formação de parte aérea e raízes. De acordo com BASU et al. (1998), a atividade da peroxidase é significativamente reduzida em tecidos tratados com auxina. Assim, a baixa atividade corresponderia ao período pelo qual os explantes teriam um nível maior de auxina endógena e tal fase precederia a formação visível de órgãos (MONCOUSIN & GASPAREL, 1983; GASPAREL et al., 1994; FRANCISCO, 2001; SOUZA, 2002). Trabalhos relatam diminuição na atividade da peroxidase antes do enraizamento de *Vitis vinifera* (GASPAREL et al., 1994) e *Vigna radiata* (NAG et al., 2001) devido ao possível catabolismo do AIA-oxidase apontando que esse evento pode servir como possível marcador bioquímico.

O processo de neoformação de raízes é convencionalmente dividido em três fases: a) uma fase de indução, caracterizada por uma queda na atividade da peroxidase, a qual é muito rápida e difícil de ser detectada, b)

uma segunda fase, correspondente ao aumento na atividade da enzima e c) uma fase de expressão, caracterizada pela diminuição gradual da atividade, seguida pelos primeiros sinais histológicos visíveis (RIVAL et al., 1997).

Como muitos trabalhos têm buscado correlacionar possíveis diferenças bioquímicas nos tecidos em processo de regeneração, uma vez que a identificação visual é subjetiva e somente aplicada depois de prolongados períodos de cultivo (FRANCISCO, 2001), a peroxidase pode ser tomada como marcador bioquímico possível de auxiliar a identificação precoce de processos regenerativos, durante a diferenciação e crescimento da mandioca cv Mcol 22, cultivada *in vitro*.

CONCLUSÕES

BAP promoveu a formação de calos maiores e mais friáveis e ANA propiciou a formação de brotos em explantes de mandioca.

A atividade da peroxidase mostrou relação direta com a formação de calos em meio ausente de reguladores vegetais e

inversa tanto na organogênese com a aplicação de BAP, como na rizogênese em meio contendo BAP ou ANA, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio concedido (Proc. 98/01649-9).

ABSTRACT

The aim of this report was to analyze the effect of plant growth regulators BAP and NAA in the *in vitro* morphogenesis of cassava and their connections with peroxidase enzymes related to the organogenetic process in plants. Explants of cassava were submitted to four treatments using BAP and/or NAA, in MS medium, adding 30 g.L⁻¹ of sucrose and 6 g.L⁻¹ of agar, having the medium pH adjusted to 5.8. The cultures were kept in a culture room with control of temperature (25 ± 1°C) and luminosity (1.000 lux, 16 h photoperiod). The callus formation, shoots and roots was evaluated, during twenty-eight days, with seven days between collections. BAP promoted brittle callus formation, and NAA promoted shoot formation. The peroxidase activity showed direct relation to the callus formation in the medium free of plant growth regulators and inverse relation in organogenesis and rizogêneses with BAP or NAA.

Key words: micropropagation, enzyme, growth regulator.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, W.C. A revised medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal American Society Horticultural Science**, v.109, p.343-347, 1986.
- BASU, P. S.; CHATTOPADHYAY, K. K.; BHATTACHARYYA, R. N. Relation of naphthalene acetic acid and 2,4-dichlorophenoxy acetic-acid induced growth of wheat coleoptile with IAA metabolism. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.36, p.109-712, 1998.
- BOUZZA, A.; KAMBOUR, S.; GASPAS, T. et al. Peroxidases during the course of callusing and organ differentiation from root explants of *Chicorium intybus*. **Biologia Plantarum**, v.35, p. 481-489, 1993.
- CABRAL, G. B.; CARVALHO, J. C. B.; SCHAAL, B. A. Root induction of wild species of *Manihot* under *in vitro* culture. In: CARVALHO, J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. Proceedings: **Cassava biotechnology. IV International Scientific Meeting** – CBN, Brasília, Embrapa, 2000. p. 383-387.
- FRANCISCO, A. A. **Ação das poliaminas na organogênese de *Colocasia esculenta* (L.) Schott**. Botucatu, 2001. 122p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- GASPAS, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J. F. et al. Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: LUMDSEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVEIS, W. J. **Physiology, growth and development of plants in culture**. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, 1994. p. 289-298.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA CNPH, 1998. v.1, p. 183-260.
- GONZALEZ, E. A. J. Cultivo de ápices y meristemas. In: PONCE, J.N.P. (ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Cuba, Ediciones GEO 1998. p.45-56.
- LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; OLIVEIRA, A. M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v. 56, p.21-25, 1999.
- MÄDER, M.; MÜNCH, P.; BOPP, M. Regulation und bedeutung der peroxidase-musteränderungen in sprossdifferenzierenden kalluslulturen von *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v.123, p.257-265, 1975.
- MALAMUG, J. J. F.; YAZAWA, S.; ASAHIRA, T. Morphological variants induced from shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) treated with gamma radiation. **Scientia Horticulturae**, v. 58, p.105-113, 1994.
- McMAHON, M. J.; SAYRE, R. T. The biology and culture of cassava roots. In: FLORES, H. E.; LYNCH, J. P.; EISSENSTAT, D. **Radical biology: Advances and perspective on the function of plant roots**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1997. p.297-310.
- MONCOUSIN, C.; GASPAS, T. Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* L. cultured *in vitro*. **Biochemistry Physiology Pflanzen**, v. 178, p.263-269, 1983.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.
- NAG, S.; SAHA, K.; CHAUXHEIRI, M.A. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.20, p.182-194, 2001.
- NAIR, N. G.; KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L. Effect of growth regeneration from shott apical meristem of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and on the culture of internodes *in vitro*. **Zeitschrift für Pflanzen Physiologie**, v. 95, p. 51-56, 1979.
- NICOLINI, E. S. **Morfogênese *in vitro* de cultivares de cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**. Jaboticabal, 1995. 87p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- PIZA, I.M.T. **Bromelina e peroxidase em plantas de *Ananas comosus* L. Merrill, sob condições de salinidade *in vitro***. Botucatu, 2000. 123p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- RIVAL, A.; BERNARD, F.; MATHIEU, Y. Changes in peroxidase activity during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Scientia Horticulturae**, v. 71, p. 103-112, 1997.
- ROVT, G. R.; DAS, P. Isozyme *in vitro* flowering of *Bambusa vulgaris*. **Journal Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.1, p.43-49, 1995.
- SOUZA, C.C. **Influência de poliaminas no desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea* sp) cultivadas *in vitro***. Botucatu, 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista.
- UNNIKRISHNAN, M.; SHEELA, M. N. Studies on media, explants and incubation conditions for *in vitro* conservation of cassava germplasm. In: CARVALHO, J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. Proceedings: **Cassava biotechnology. IV International Scientific Meeting** – CBN, Brasília, Embrapa, 2000. p. 425-430.
- ZOK, S.; SAMA, A.E.; NYOCHEMBEN, L. et al. Rapid multiplication of root and tuber crops through tissue culture in Cameroon. **Cahiers Agricoles**, v.7, p. 63-66, 1998.