



## Efeitos de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina no cultivo *in vitro* de *Manihot esculenta* Crantz

Simone da Silva<sup>1\*</sup>, Flávio Freires Ferreira<sup>2</sup>, Arlena Maria Guimarães Gato<sup>3</sup>

Submetido 22/10/2014 – Aceito 09/03/2015 – Publicado on-line 23/03/2015

### Resumo

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta da família Euphorbiaceae, que apresenta grande relevância econômica como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, essencialmente nos países mais pobres e em desenvolvimento. A propagação em campo, a partir de manivas, além de muito lenta, pode disseminar várias doenças, principalmente as sistêmicas. A produção de material de plantio básico sadio e em números elevados é uma das grandes limitações para a expansão e um cultivo produtivo de mandioca. Este trabalho apresenta dados sobre o desenvolvimento de *Manihot esculenta* na presença de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) no meio de cultura *in vitro*. As hastes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foram coletadas em área de produtor rural do Município de Itapiranga/AM. O experimento foi instalado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/CBA, Manaus, AM, onde os explantes foram cultivados em meio de cultura segundo Murashige & Skoog (MS), 1962, com adição de diferentes concentrações do regulador do crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP – 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L), durante 30 dias. A taxa de multiplicação máxima foi obtida com a suplementação do meio MS com 1,0 mg/L de BAP (3,15:1), porém este resultado mostrou-se estatisticamente semelhante ao observado em plantas cultivadas em MS0 (3,06:1). As plantas desenvolvidas em MS0 obtiveram 100% de enraizamento e foram aclimatizadas com sucesso.

**Palavras-Chave:** cultura de tecidos vegetais, micropropagação, produção de mudas e biotecnologia

**Effects of different concentrations of 6-Benzylaminopurine in vitro culture of *Manihot esculenta* Crantz.** Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a plant of the family Euphorbiaceae, which has great economic importance as the main source of carbohydrates for millions of people, mostly in poor and developing countries. The field propagation from cuttings, besides being very slow, can spread various diseases, mainly systemic. The production of basic healthy planting materials and in high numbers is a major limitation for the expansion and a productive cassava culture. This study presents data on the development of *Manihot esculenta* in the presence of different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) *in vitro* culture medium. The stems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) were derived from a production area in Itapiranga/AM. The experiment was conducted at the Laboratory of Plant Tissue Culture / CBA, Manaus, AM, where the explants were cultured on Murashige and Skoog (MS), 1962, with the addition of different concentrations of the growth regulator 6-Benzylaminopurine (BAP – 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg/L), during 30 days. The highest multiplication rate was obtained with the medium MS supplemented with 1.0 mg/L BAP (3.15:1). However, this result was statistically similar to the observed in plant cultivated in MS0 (3.06:1). The plants developed in MS0 obtained 100% of rooting and were acclimatized with success.

**Key-words:** plant tissue culture, micropropagation, plant production and biotechnology

<sup>1</sup> Pesquisadora do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais - Av. Governador Danilo de Matos Areosa, Nº 690 - Distrito Industrial - CEP 69075-351 - Manaus, AM, Brasil. \*Autor para correspondência: [simone.cba@sufrema.gov.br](mailto:simone.cba@sufrema.gov.br)

<sup>2</sup> Pesquisador do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. [flavio.cba@sufrema.gov.br](mailto:flavio.cba@sufrema.gov.br)

<sup>3</sup> Pesquisadora do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. [gato.cba@sufrema.gov.br](mailto:gato.cba@sufrema.gov.br)

## 1. Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família das euforbiáceas, sendo uma espécie originária do continente americano e, provavelmente, do Brasil central (OTSUBO; LORENZI, 2004). Pesquisas contendo evidências, obtidas a partir de estudos moleculares e arqueológicos, apontam o Sudoeste da Amazônia e a região que compreende os Estados do Acre, Rondônia, Tocantins, Goiás e Mato Grosso, como sendo a localidade de origem e domesticação da mandioca, há cerca de 10 a 12 mil anos (OLSEN & SCHAAL, 2001 e ALLEM, 2002).

Seu cultivo apresenta grande relevância econômica como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, essencialmente nos países mais pobres e em desenvolvimento (MACHADO, 2004). Adicionalmente, tem grande importância na indústria alimentícia, na fabricação de amido, rações concentradas para animais, dentre outros produtos (SOUZA *et al.*, 2008).

A espécie apresenta uma ampla diversidade genética, concentrada principalmente na América Latina e Caribe. Diversidade esta que foi resultado da facilidade de polinização cruzada da espécie, de sua alta heterozigosidade e da deiscência abrupta dos frutos, sendo a maioria das variedades nativas selecionadas naturalmente, muitas vezes pelos próprios agricultores (FUKUDA & SILVA, 2002).

Propagada vegetativamente a partir de manivas, a propagação em campo, além de muito lenta, pode disseminar várias doenças, principalmente as sistêmicas. O ciclo longo, a propagação assexuada e a baixa taxa de multiplicação fazem com que a mandioca esteja continuamente sujeita a ação de diversos fatores, entre eles os biológicos, o que pode diminuir a qualidade do material de plantio e, conseqüentemente, a produção de raízes (PIZA & PINHO, 2002). Além disso, a propagação por manivas ocasiona baixa produção devido a dois fatores principais: o envelhecimento fisiológico provocado pela constante multiplicação e a infestação por doenças que são transmitidas por sucessivas gerações (SILVA *et al.*, 2002). A produção de material de plantio básico sadio e em números elevados é uma das grandes limitações para a expansão e um cultivo produtivo de mandioca (SOUZA *et al.*, 2008).

Como alternativa, a biotecnologia vem contribuindo para as pesquisas realizadas com a cultura, pelo uso de diferentes técnicas,

destacando-se a micropropagação para a produção de material propagativo sadio, além de representar o resgate de variedades de importância regional ou crioulas, que por meio de sua limpeza, representa o resgate e a conservação de uma parte importante de seu germoplasma (SOUZA *et al.*, 2006).

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*.

O efeito benéfico da 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação de brotações relaciona-se com a influência deste regulador de crescimento na divisão celular e na liberação das gemas auxiliares inibidas pela dominância apical (CORDEIRO *et al.*, 2004).

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina no desenvolvimento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) através da técnica de cultura de tecidos.

## 2. Material e Método

Hastes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletadas de área de produtor rural do Município de Itapiranga-AM, foram cortadas em 20-30 cm de comprimento por 1,5-2,0cm de largura. As estacas foram plantadas em sacos plásticos pretos (1kg), contendo o substrato da marca Vivato® e levadas à casa de vegetação com sistema de aspersão controlado.

Quando os ramos surgidos da brotação das gemas apresentaram entre 10 e 20 cm de comprimento, os mesmos foram cortados, levados ao laboratório, e divididos em segmentos menores (3 cm). As microestacas resultantes foram lavadas com detergente líquido (de origem comercial) e água corrente, e submetidas à lavagem em solução de álcool 70%, por dois minutos. Já em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados em solução a 60% de água sanitária (formulação comercial: hipoclorito de sódio 2,5%), acrescido de Tween 20, durante 10 minutos e posteriormente enxaguadas, quatro vezes, em água destilada autoclavada.

Após a desinfestação, as microestacas foram subdivididas em segmentos menores (com

uma gema, cada) e inoculados em tubos de ensaio (150 x 24 mm) contendo 10 mL de meio de cultura semissólido, de composição básica segundo MURASHIGE e SKOOG (1962), sem reguladores de crescimento (MS0), suplementado com 3% de sacarose; 4,1  $\mu\text{M}$  de ácido nicotínico; 0,6 mM de mio-inositol; 2,4  $\mu\text{M}$  de piridoxina-HCl; 1,5  $\mu\text{M}$  de tiamina-HCl e solidificado com 2% de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 e os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,1 Kgf/cm<sup>2</sup>, durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas a 25±1°C, iluminadas com lâmpadas fluorescentes (Sylvania, Phillips/luz do dia) com intensidade de 30,0  $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , e 16 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias, sendo avaliado o desenvolvimento e a porcentagem de contaminação.

Após as plântulas atingirem a altura máxima livre dos frascos de cultura (8 cm, com aproximadamente 5 nós), foram utilizadas como doadoras de explantes para os testes com diferentes concentrações do regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP) (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L). Cada explante ou fitômero constituiu-se de uma região nodal, sem folhas, com tamanho aproximado de 1 cm.

Os efeitos das diferentes concentrações do regulador de crescimento foram analisados quanto à taxa de multiplicação, taxa de enraizamento, taxa de calogênese e altura dos explantes, após trinta dias de cultura.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e três repetições, sendo utilizados 30 explantes para cada tratamento, que foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos sobre o desenvolvimento da planta, quanto ao número de brotos e de gemas (taxa de multiplicação), a altura das plantas, o comprimento e o número de raízes por explante foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de significância 5%. Estas análises foram efetuadas utilizando-se o *Graph Pad in Stat*, versão 3,01. Para a análise das porcentagens de germinação, enraizamento e calogênese, foi usado o teste de diferença entre porcentagens ( $p_1$  e  $p_2$ ) ao nível de 5% de significância utilizando-se o Software Statistica for Windows™, versão 5.0.

Após serem retiradas dos frascos de cultura, as plantas obtidas *in vitro* (após 60 dias de

cultivo), tiveram suas raízes lavadas em água corrente (para a completa remoção do meio de cultura) e foram acondicionadas em tubetes, preparados com condicionador de solo da marca Vivato®. Os tubetes, com as plantas, permaneceram por 30 dias, em casa de vegetação, onde receberam freqüente aspersão de água filtrada, esterilizada com luz ultravioleta. Ao final deste período, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas em casa de vegetação.

### 3. Resultados e Discussão

Após cinco dias de cultivo, foram observados 67% de descontaminação dos explantes com 50% já em início de brotação.

O efeito de reguladores de crescimento, naturais e sintéticos, raramente é específico em sua influência sobre o crescimento e o desenvolvimento, e as respostas das células, tecidos e órgãos *in vitro* podem variar conforme as condições de cultura, o tipo de explante e o genótipo da planta utilizada (GASPAR *et al.*, 1996).

As avaliações de desenvolvimento em diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) foram comparadas com as obtidas de plantas cultivadas em MS0. O melhor resultado, em relação à taxa de multiplicação, foi obtido com a adição de 1,0 mg/L de BAP ao meio MS, que levou ao desenvolvimento de 3,15 segmentos nodais por explante, porém este resultado mostrou-se estatisticamente semelhante ao obtido em MS0 (3,06). Com a utilização de 0,5 e 1,5 mg/L de BAP, observou-se a formação de 2,57 e 2,13 segmentos nodais por explante, respectivamente. Já o meio de cultura que mostrou-se menos eficiente quanto à produção de segmentos nodais foi o suplementado com 2,0 mg/L de BAP (1,79:1) (Tabela 1).

Vidal (2009), utilizando o meio MS com 1/3 dos macro e micronutrientes, acrescido de 0,01 mg/L de BAP, 0,01mg/L de ANA e 0,01mg/L de GA<sub>3</sub>, obteve 1,5 microestacas, por explante, na variedade Mocotó, após 30 dias de cultivo. Nunes (2013), relatou a indução de 100% de brotamento ao utilizar 0,01 e 0,05 mg/L de BAP, aos 16 dias de cultivo.

Em relação ao alongamento de brotos, foi observado que o meio MS0 e o suplementado com 1 mg/L de BAP foram os mais eficientes, pois as plantas produzidas alcançaram 2,07 e 1,91 cm, respectivamente, após 30 dias de cultivo (Tabela 1). VIDAL (2009), ao utilizar 0,01 mg/L de BAP,

0,01mg/L de ANA e 0,01mg/L de GA<sub>3</sub>, obteve brotos com 1,80 cm, na variedade Mocotó. SILVA *et al.* (2005), utilizando 2 mg/L de BAP na cultura *in vitro* de *Melissa officinalis*, obtiveram brotos com 8,76 cm de altura, em 45 dias de cultivo. SILVA *et al.* (2006), obtiveram plantas com 3,85 e 4,03 cm, quando cultivadas em 5 µM (1,1 mg/L) de BAP e em MS0, respectivamente, aos 30 dias de cultivo.

Tabela 1 – Efeito de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina no desenvolvimento *in vitro* de *Manihot esculenta*.

	Taxa de Multiplicação	Altura (cm)	Taxa de Calogênese (%)
MS0	3,06 <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>	0 <sup>e</sup>
MS+0,5mg/L BAP	2,57 <sup>b</sup>	1,06 <sup>c</sup>	93 <sup>b</sup>
MS+1,0mg/L BAP	3,15 <sup>a</sup>	1,91 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
MS+1,5mg/L BAP	2,13 <sup>c</sup>	0,72 <sup>d</sup>	83 <sup>c</sup>
MS+2,0mg/L BAP	1,79 <sup>d</sup>	0,70 <sup>d</sup>	68 <sup>d</sup>

Quanto à formação de calos, ela apenas não ocorreu no meio MS0, já nas concentrações de BAP testadas, observou-se a formação de calos de base, de coloração palha (Tabela 1). Isto se deve, provavelmente, ao desbalanceamento nos níveis de fitormônios dos explantes. Segundo Santos (1998), elevadas concentrações de citocininas parecem reagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos, provocando certa inibição no desenvolvimento dos brotos. Vidal (2009) relata que, ao utilizar 0,01mg/L de BAP, 0,01mg/L de ANA e 0,01mg/L de GA<sub>3</sub>, foi observada a formação de calos em 91,1% dos explantes.

Roca (1984) e Guo & Liu (1994) associam a formação de calos a níveis elevados de BAP (maiores que 0,1 mg L<sup>-1</sup>) no meio de cultura, e destacam que o processo inibe o crescimento das plântulas. Entretanto, calogênese também pode ser atribuída à adaptação dos explantes às condições de cultivo *in vitro*, como relata Oliveira *et al.*, 2000, que obteve 22% de formação de calos, utilizando 0,04 mg/L de BAP apenas na fase de estabelecimento *in vitro* dos explantes.

Quanto ao enraizamento das plantas, a taxa máxima (100%) foi obtida em meio MS0, com uma produção média de 4 raízes por explante, com 5,9 cm. Essa ocorrência, provavelmente, se deve à facilidade de enraizamento da espécie, e particularmente, da cultivar testada. Segundo Assis e Teixeira (1998), há várias evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada, pois há bastante variação entre espécies e mesmo entre clones. Os resultados obtidos com meios de cultura suplementados com 0,5 e 1,0 mg/L de BAP mostraram-se estatisticamente semelhantes, pois levaram a 23,33 e 22,22% de enraizamento, respectivamente, com produção média de 2 raízes por explante. Já os meios suplementados com 2,0 e 1,5 mg/L de BAP mostraram-se ser os menos eficientes para promoção do enraizamento, em 30 dias de cultivo, pois promoveram o enraizamento de apenas 7,14 e 6,66% dos explantes, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina no enraizamento *in vitro* de *Manihot esculenta*.

	Taxa de Enraizamento (%)	Número de Raízes	Comprimento das Raízes (cm)
MS0	100 <sup>a</sup>	3,65 <sup>a</sup>	5,9 <sup>a</sup>
MS+0,5 mg/L BAP	23,33 <sup>b</sup>	2,00 <sup>c</sup>	1,2 <sup>c</sup>
MS+1,0 mg/L BAP	22,22 <sup>b</sup>	2,33 <sup>b</sup>	2,48 <sup>b</sup>
MS+1,5 mg/L BAP	6,66 <sup>d</sup>	2,00 <sup>c</sup>	0,4 <sup>e</sup>
MS+2,0 mg/L BAP	7,14 <sup>c</sup>	1,00 <sup>d</sup>	0,7 <sup>d</sup>

A presença de raízes nas plântulas de mandioca, em quantidade equilibrada com o desenvolvimento da parte aérea, é benéfica à multiplicação, por promover maior absorção de nutrientes e conseqüente produção de gemas, que servirão de explantes para os subcultivos subseqüentes (OLIVEIRA *et al.*, 2000). VIDAL (2009) obteve 71,1% de enraizamento, aos 30 dias de cultivo, ao trabalhar com a variedade Mocotó, utilizando 0,01mg/L de BAP, 0,01mg/L de ANA e



0,01mg/L de GA<sub>3</sub>. Enquanto NUNES (2013), observou 95,55% de enraizamento ao utilizar 0,01 mg/L de BAP, aos 16 dias de cultivo.

O processo de aclimatização utilizado para *Manihot esculenta* cultivada *in vitro* foi bem sucedido, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 93% (n = 30). Isto demonstra que o protocolo desenvolvido neste estudo é apropriado na regeneração da mandioca.

NUNES (2013), relata que a porcentagem de sobrevivência *ex vitro* das plântulas de mandioca de mesa micropropagadas em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose e 0,01 mg/l de BAP foi de 100%, após 45 dias de transferência para o substrato comercial e mistura de areia e substrato comercial (1:1), cujas plântulas apresentaram coloração verde e aspecto vigoroso. OGERO *et al.*, 2012, ao utilizar vermiculita na aclimatização das variedades KME 1 e Muchericheri, obtiveram 80 e 81% de sobrevivência, respectivamente. Já OLIVEIRA *et al.*, 2000, obteve 92% de eficiência na aclimatização das plântulas, ao utilizar substrato à base de vermiculita, areia e terra vegetal esterilizada (1:1:1).

A adaptação de mudas *in vitro* para as condições naturais é crucial para qualquer protocolo para ser bem sucedido. Isso ocorre porque há grandes diferenças entre as condições de cultura artificiais em sala de crescimento, as condições de estufa e as condições naturais em termos de quantidade e qualidade da luz, umidade relativa, nutrientes e substratos. A mandioca é uma planta delicada, e enormes perdas ocorrem durante a transferência das condições *in vitro* para as *ex vitro* (JORGE, 2002), que exige cuidado e otimização do meio.

#### 4. Conclusão

O processo de desinfestação utilizado mostrou-se eficiente, garantindo a assepsia de 67% dos explantes, porém é possível melhorar esta porcentagem, através de novos experimentos relacionados às concentrações e tempos de imersão nos agentes desinfestantes.

O meio controle (MS0) pode ser considerado o mais indicado para a produção das mudas, pois foi o meio em que as plantas tiveram uma taxa de multiplicação de 3,06:1 e 100% de enraizamento, aos 30 dias de cultivo.

O procedimento de aclimatização utilizado para as plantas *in vitro* foi bem sucedido, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 93%, sem exibição de qualquer anomalia morfológica ou variação.

#### Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

#### Referências

ALLEM, A.C. The Origins and Taxonomy of Cassava, In: R.J. HILLOCKS, J.M. THRESH and A.C. BELLOTTI (Eds), **Cassava: Biology, Production and Utilization**. CABI Publishing, 2002, p. 1-16.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998, v. 1, p. 261-296.

CORDEIRO, E.I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, R.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (PARICÁ). Nota Técnica. **Cerne**. Lavras. v. 10 (1): p. 118-124. Jan./jun. 2004.

FUKUDA, W.M.G. & SILVA, S.O.E. Melhoramento de mandioca Brasil. In: CEREDA, M.P. (Org.). **Agricultura: Tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo, Fundação Cargil (1ª Ed.), 2002, p. 242-257.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cell Development and Biology**, v. 32, p. 272-289. 1996.

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.

GUO, J.Y.; LIU, Y.Q. Rapid propagation of cassava by tissue culture and its application in rural districts in China. In: International Meeting on Cassava Biotechnology Network, Proceedings, Bogor: **Cassava Biotechnology Network**, p. 183-189, 1994.

JORGE, M. A. B. **Factors affecting the hardening and acclimatisation of tissue-cultured cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plantlets**. PhD thesis, Department of Crop Science, University of Zimbabwe, Harare, Zimbabwe, 2002.

MACHADO, T. F. **Regeneração *in vitro* e transformação genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, 2004. 131p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará.

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

NUNES, E. L. **Caracterização físico-química do amido e cultura de células e tecidos vegetais como ferramentas biotecnológicas à seleção e conservação de germoplasma de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz)**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

OGERO K. O.; GITONGA N. M.; MWANGI M.; OMBORI O.; NGUGI M. Cost-effective nutrient sources for tissue culture of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 66, p. 12964-12973, 16 August, 2012.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 2329-2334, 2000.

OLSEN, K.M. & SCHAAL, B.A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonas origin of

domestication, **American Journal of Botany**, v. 88, n. 1, p.131-142, 2001.

OTSUBO, A. A.; LORENZI, J. O. **Cultivo da mandioca na região centro-sul do Brasil**. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2004, 116p.

PIZA, I. M. de T.; PINHO, R. S. Protocolo de Micropropagação da Mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, 2002, v. 2, p. 178-187.

ROCA, W.M. Cassava. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Mcmillan, 1984. p. 269-301.

SANTOS, M. R. A. DOS. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* grisebach**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. p. 81. 1998.

SILVA, M. N. da; CEREDA, M. P.; FIORINI, R. A. Multiplicação rápida de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, 2002, v. 2, p.187-197.

SILVA, S.; SATO, A.; LAGE, C.L.S.; GIL, R.A.S.S.; AZEVEDO, D.A.; ESQUIBEL, M.A. Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* Produced under the Influence of Growth Regulators. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 6B, p. 1347-1352. 2005.

SILVA, S.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A.; GIL, R.A.S.S.; SATO, A. In vitro propagation of *Melissa officinalis* L. and production of essential oil. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. v.2, n. 2, p. 53-60. 2006.

SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds). **Introdução à cultura de tecidos de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006a. p. 11-37.



SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SILVA NETO, H. P. da. Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais. **Circular Técnica 88. Embrapa.** Cruz das Almas, 2008, 11p.

VIDAL, A. M. **Micropropagação e Embriogênese Somática em Variedades Cultivadas de Mandioca.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Cruz das Almas, Bahia, 2009.