



Assepsia de segmentos nodais de mini-rosa (*Rosa* sp.) para o estabelecimento *in vitro*

Ana Caroline Miléo da Silva^a, Tanara Pletsch Dalla Costa^{a*}, Milla Karolina Correa Costa^a, Eliandra de Freitas Sia^a, Rogério Rangel Rodrigues^b

^a Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

* Autor correspondente (tanara_dallacosta@hotmail.com)

INFO

Keywords

plant tissue culture
explants
sodium hypochlorite
ornamental plants

Palavras-chaves

cultura de tecidos
vegetais
explante
hipoclorito de sódio
plantas ornamentais

ABSTRACT

Mini rose (Rosa sp.) nodal segments asepsis for in vitro establishment.

Brazil stands out as one of the largest producers of ornamental plants in the world. The mini roses (*Rosa* sp.) are among the most commercialized vase flowers. However, despite of their great economic importance, traditional propagation methods presents undesirable characteristics, since they favor the spread of diseases and pests, seasonal dependence and low multiplication rate. Therefore, the objective of this study was to evaluate the mini rose nodal segments asepsis using different concentrations and immersion times in sodium hypochlorite solution (NaClO). Nodal segments were collected from young mini red roses plants, straight from the field. Nine treatments were evaluated, combining the concentrations of 0.75, 1.00 and 1.25% NaClO and the times of 10, 20 and 30 minutes of exposure the explants to disinfectant agent. The experimental design was completely randomized, with nine treatments containing 20 replications. Over 30 days of *in vitro* culture, the percentage of explant contamination, survival and necrosis were evaluated. According to the data obtained, there was a high contamination rate in all treatments. However, explants submitted to 1.25% NaClO concentration for 30 minutes had the highest aseptic rate (45%). Also, in this same treatment, no bacterial contamination or explant necrosis were observed. Therefore, the mini rose nodal segments submitted to sodium hypochlorite at 1.25% concentration for 30 minutes of immersion obtained the highest percentage of asepsis.

RESUMO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de plantas ornamentais do mundo. E as mini-rosas (*Rosa* sp.) estão entre as flores de vaso mais comercializadas. No entanto, apesar de sua grande importância econômica, os métodos de propagação tradicional possuem características indesejadas, pois favorecem a disseminação de doenças e pragas, dependência sazonal e baixa taxa de multiplicação. Portanto, o objetivo neste trabalho foi avaliar o uso de diferentes concentrações e tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) na assepsia de segmentos nodais de mini-rosa. Os segmentos nodais foram coletados de plantas jovens de mini-roseiras de cor vermelha, oriundas do campo. Foram avaliados nove tratamentos, combinando-se as concentrações de 0,75, 1,00 e 1,25% de NaClO e os tempos de 10, 20 e 30 minutos de exposição dos explantes ao agente desinfestante. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com nove tratamentos contendo 20 repetições. Ao longo de 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se o percentual de contaminação, sobrevivência e necrose dos explantes. De acordo com os dados obtidos, verificou-se alta taxa de contaminação em todos os tratamentos. Porém, os explantes submetidos à concentração de 1,25% de NaClO por 30 minutos, apresentaram a maior taxa de assepsia (45%). Ainda neste mesmo tratamento, não foram verificadas contaminações por bactérias nem ocorrência de necrose nos explantes. Portanto, os segmentos nodais de mini-rosa submetidos ao hipoclorito de sódio na concentração de 1,25% por 30 minutos de imersão obtiveram o maior percentual de assepsia.

INTRODUÇÃO

O gênero *Rosa* possui grande diversidade morfológica, possui mais de 100 espécies relatadas, com mais de 30.000 variedades e inúmeros híbridos, produtos de cruzamento e retrocruzamentos (Kole, 2011). Dentro desta ampla diversidade, encontram-se as mini-roseiras (*Rosa* spp.), popularmente chamadas de mini-rosas ou rosas-meninas, caracterizadas por flores de pequeno à médio porte, de florescimento contínuo e encontradas em diversas cores, tais como vermelho, rosa, amarelo, laranja, purpura e branca (Boettcher, 1991; Diniz, 2014).

As mini-roseiras são, geralmente, multiplicadas por métodos de propagação vegetativa tradicionais, como estaquia, mergulhia e enxertia (Diniz et al., 2014). No entanto, tais técnicas apresentam dependência sazonal, baixa taxa de multiplicação e favorecem a disseminação de pragas e doenças (Kumud et al. 2015). Estes fatores, entre outros, tem limitado a produção de mudas de qualidade fitossanitária.

Deste modo, a utilização de técnicas biotecnológicas como a micropropagação surge como uma alternativa para a viabilização produtiva de Rosas spp. A técnica consiste no cultivo in vitro de plantas, com meios nutritivos adequados, sob condições controladas de luminosidade, temperatura e fotoperíodo (Silva et al., 2017). Além disso, possibilita a produção de maior número de mudas idênticas a planta mãe em períodos relativamente curtos e não necessita de grandes quantidades de plantas matrizes, evidenciando, portanto, uma grande vantagem em comparação com a propagação vegetativa tradicional (Diniz et al., 2008; Ulisses et al., 2010).

Contudo, uma das principais problemáticas do cultivo in vitro é o controle e a prevenção de contaminações por microrganismos, especialmente no cultivo de espécies lenhosas (Golle et al., 2013), caracterizadas por suas paredes celulares mais rígidas e resistentes, devido à presença de lignina (Stewart & Stewart, 2008). Portanto, a assepsia é um dos primeiros e principais passos para o bom estabelecimento das plântulas micropropagadas, na qual, as demais etapas dependem do sucesso da mesma (Effege et al., 2014; Pereira et al., 2011). Sendo assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar o uso de diferentes concentrações e tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio na assepsia de segmentos nodais de mini-rosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas In Vitro, da Universidade

Federal do Oeste do Pará (UFOPA) em parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA), no primeiro semestre de 2018. Para o presente estudo, foram utilizadas como plantas matrizes mudas de mini-rosas de cor vermelha, entre 4 e 6 meses de idade, oriundas de plantação de pequeno produtor do município de Santarém-PA, e comercializadas no Mercado das Flores, localizado no mesmo município.

Com o auxílio de uma tesoura de poda esterilizada, as hastes foram retiradas das plantas matrizes. Em seguida, as folhas foram eliminadas e as hastes foram cortadas em segmentos de aproximadamente 2 cm, contendo uma gema axilar. Estes segmentos, denominados de segmentos nodais, foram utilizados como explantes no cultivo in vitro.

Os explantes foram envoltos em gaze e levados para a capela de fluxo laminar, onde realizou-se a assepsia. Primeiramente, os segmentos nodais foram imersos em álcool 70% (v/v) durante cinco minutos. Em seguida, foram submetidos a diferentes concentrações de cloro ativo e tempos de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial. Por fim, os explantes foram imersos em água destilada esterilizada por três vezes consecutivas.

Foram avaliados nove tratamentos, combinando-se as concentrações de 0,75, 1,00 e 1,25% de cloro ativo e os tempos de 10, 20 e 30 minutos de imersão dos explantes na solução. Foram eles: 0,75% de NaClO por 10 min (T1); 0,75% de NaClO por 20 min (T2); 0,75% de NaClO por 30 min (T3); 1,00% de NaClO por 10 min (T4); 1,00% de NaClO por 20 min (T5); 1,00% de NaClO por 30 min (T6); 1,25% de NaClO por 10 min (T7); 1,25% de NaClO por 20 min (T8); 1,25% de NaClO por 30 min (T9).

Após a assepsia, eliminou-se as extremidades dos segmentos nodais e estes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura composto pelos macro e micronutrientes e vitaminas do MS (Murashige & Skoog, 1962). O meio foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 0,5 mg L⁻¹ de ácido 6-benzilaminopurina (BAP) e solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel, ajustando-se o pH a 5,7 ± 0,1. O meio foi previamente autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Os tubos de ensaio foram transferidos para a sala de crescimento, onde foram mantidos por 30 dias. As condições de cultivo foram controladas com a iluminação por lâmpadas fluorescentes brancas frias, com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 °C ± 2 °C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo nove tratamentos com 20 repetições cada. A unidade amostral foi

constituída de um tubo de ensaio contendo um segmento nodal. As avaliações foram realizadas a cada três dias, após a introdução dos segmentos nodais *in vitro*, quando foram observadas as seguintes variáveis: número de explantes contaminados por fungo e/ou bactéria e necrose. Quanto a variável de necrose, considerou-se aqueles explantes que apresentaram morte por oxidação. Foi realizada a porcentagem dos dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo de 30 dias de cultivo *in vitro* de segmentos nodais de mini-rosa, submetidos à diferentes tratamentos de assepsia, foram confirmadas, ao todo, contaminações por fungos e/ou bactérias em

130 dos 180 explantes inoculados em meio de cultura, o que corresponde a um total de 72,2% de contaminação.

Conforme apresentado na figura 1, do terceiro ao sexto dia de cultivo *in vitro*, constatou-se a maior ocorrência de contaminação dos explantes de mini-rosa. No sexto dia, obteve-se o número máximo de contaminações, totalizando 52 explantes contaminados, o que representa 40% das perdas totais. A fase crítica de contaminação se estendeu até o décimo segundo dia após a inoculação, corroborando com o trabalho de Silva et al. (2017) que obteve sua fase crítica de contaminações em segmentos nodais de roseira (*Rosa* sp.) durante os primeiros 14 dias de cultivo *in vitro*.

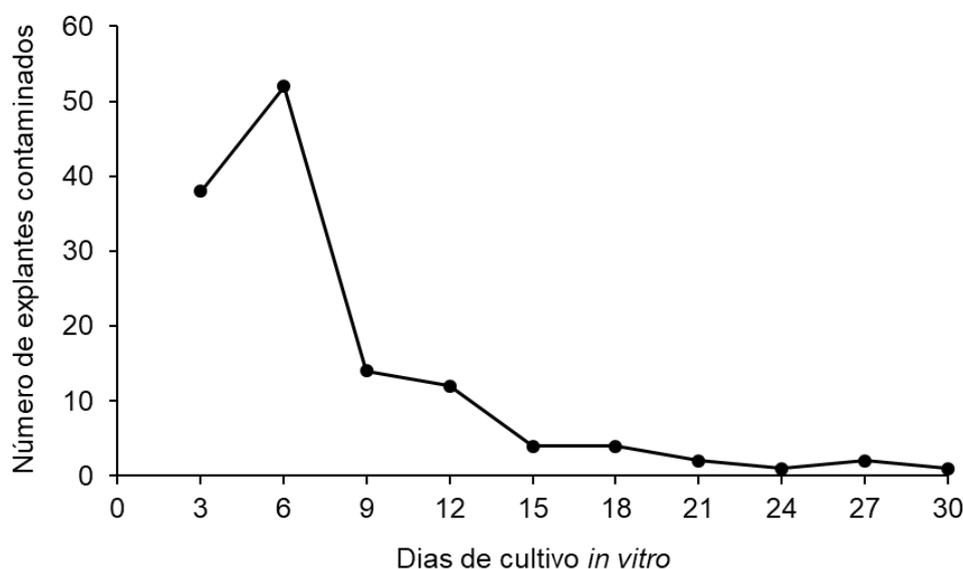


Figura 1 - Número total de contaminações de explantes de mini-rosa submetidos à diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,75%; 1,00% e 1,25%) e tempos de desinfestação (10 min; 20 min e 30 min), ao longo de 30 dias de cultivo *in vitro*.

A partir do sexto dia, houve uma redução gradativa no número de contaminações ao longo do tempo, porém, ocorreram até o último dia de avaliação, após 30 dias de introdução *in vitro* (Figura 1). Resultado semelhante foi encontrado por Silva et al. (2017) e Sousa et al. (2007) para roseira e orquídea, respectivamente. Em ambos os trabalhos, mesmo após 30 dias de cultivo *in vitro*, houve contaminação dos explantes, cujas matrizes utilizadas também foram provenientes de campo.

Acredita-se que o surgimento de contaminações tardias seja proveniente de microrganismos endofíticos, os quais habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro (Azevedo et al., 2000). Em situações de estresse, como alteração do

pH e empobrecimento do meio de cultura, os microrganismos, antes em condição de latência, passam a colonizar o meio (Almeida et al., 2005). Embora os efeitos de microrganismos endofíticos *in vitro* ainda sejam pouco conhecidos, estes são responsáveis por grande perda de materiais vegetais micropropagados (Picolotto, 2007).

A tabela 1 demonstra a porcentagem de contaminação por fungos e/ou bactérias, sobrevivência e necrose de segmentos nodais de mini-rosa submetidos à assepsia com diferentes concentrações e tempo de imersão em hipoclorito de sódio, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 1 - Contaminação por fungos e/ou bactérias, sobrevivência e necrose de explantes de mini-rosa desinfestados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão, após 30 dias de cultivo in vitro.

Concentrações ⁽¹⁾ (v/v)	Tempo ⁽²⁾ (min)	Tratamentos	F ⁽³⁾ (%)	B ⁽⁴⁾ (%)	F e B ⁽⁵⁾ (%)	S ⁽⁶⁾ (%)	N ⁽⁷⁾ (%)
0,75%	10	1	80	5	15	0	5
	20	2	60	5	5	30	10
	30	3	65	5	5	25	5
1,00%	10	4	80	10	0	10	30
	20	5	50	15	0	35	15
	30	6	55	0	15	30	5
1,25%	10	7	70	0	0	30	0
	20	8	60	0	0	40	0
	30	9	55	0	0	45	0

⁽¹⁾ Concentrações de cloro ativo. ⁽²⁾ Tempo de imersão. ⁽³⁾ F - Fungos. ⁽⁴⁾ B - Bactérias. ⁽⁵⁾ F e B - Fungos e Bactérias. ⁽⁶⁾ S - Sobrevivência. ⁽⁷⁾ N - Necrose.

Os explantes submetidos ao tratamento 1 (NaClO à 0,75% com 10 minutos de exposição) apresentaram 100% de contaminação por microrganismos, dos quais 80% foram por fungos, 5% por bactérias e 15% por ambos os microrganismos. Os explantes expostos ao NaClO à 1,00% por 10 minutos de imersão (tratamento 4) também obtiveram alta taxa de contaminação, com cerca de 80% de perdas por fungos e 10% por bactérias, totalizando 90% de explantes contaminados. Portanto, ambos tratamentos foram ineficientes na assepsia dos segmentos nodais de mini-rosa.

Os tratamentos 2, 3, 5 e 6 promoveram menores taxas de contaminação dos explantes, em relação aos tratamentos 1 e 4. Nestes tratamentos, o percentual de assepsia dos segmentos nodais de mini-rosa variou de 25 a 35%. As concentrações de 0,75 e 1,00% de NaClO no tempo de 20 minutos (T2 e T5) proporcionaram uma porcentagem de sobrevivência maior (30 e 35%) do que quando comparadas ao tempo de 30 minutos nessas mesmas concentrações (25% - T3 e 30% - T6). No entanto, os explantes submetidos aos tratamentos 2 e 5 apresentaram maior percentual de necrose (10 e 15%, respectivamente) quando comparados aos tratamentos 3 e 6, ambos de apenas 5%. Portanto, embora a maior assepsia tenha sido aos 20 minutos, os explantes desenvolveram-se melhor no tempo de 30 minutos.

De acordo com Oliveira et al. (2013), a oxidação é recorrente em plantas lenhosas, devido à liberação de compostos fenólicos e taninos pelas células vegetais, após sofrer um ferimento. Estas substâncias são secretadas no meio de cultura, podendo modificar a composição do meio de cultivo e a absorção

de metabólitos (Andrade et al., 2000). Isto prejudica o desenvolvimento in vitro e pode causar a morte dos explantes.

Por outro lado, os segmentos nodais submetidos ao hipoclorito de sódio à 1,25% de cloro ativo (T7, T8 e T9), apresentaram as maiores porcentagens de sobrevivência, de 30, 40 e 45%, respectivamente, ausência de necrose e eficiência na assepsia de bactérias. Contudo, deve-se ressaltar que esses explantes foram retirados de uma planta originária de campo e que não foi realizado pré-tratamento de desinfestação nas matrizes.

Silva et al. (2015), realizaram a desinfestação de explantes de sacaca (*Croton cajucara* Benth.) originados do campo, com NaClO a 1,25% durante 15 e 20 minutos e obtiveram uma porcentagem de contaminação de 94,7% e 88,3%, respectivamente, sendo a maior parte referente a contaminação por fungos. Isto demonstra que o resultado obtido neste trabalho foi satisfatório, considerando a origem da planta matriz, pois nesta mesma concentração com tempo de 30 minutos (T9) a porcentagem de contaminação foi de 55% para segmentos nodais de mini-rosas.

Segundo Fermio Junior et al. (2009), o estabelecimento é a fase mais crítica no cultivo in vitro de plantas lenhosas, como as mini-rosas. Isto se deve à maior dificuldade dos agentes desinfestantes em penetrar nos tecidos lenhosos, principalmente quando utilizadas plantas matrizes selecionadas a campo, as quais apresentam naturalmente maior carga de microrganismos e, conseqüentemente, maior taxa de contaminação (Oliveira et al., 2013; Santos et al., 2015). Para a lenhosa *Ulmus minor*

Mill., por exemplo, o estabelecimento de brotos extraídos diretamente do campo resultou em contaminações próximas a 100% (Conde et al., 2008).

Por isso, faz-se necessário tratamentos adicionais para a desinfestação de explantes oriundos de matrizes lenhosas de campo. A manutenção de plantas matrizes em casa de vegetação aliado a um pré-tratamento de controle fitossanitário, através da aplicação de fungicidas e bactericidas, antecedente à coleta dos explantes, pode ser uma alternativa eficaz para a redução da contaminação no cultivo in vitro (Oliveira et al., 2013). Gomes et al. (2014), utilizaram plantas de mini-rosas vermelhas oriundas do campo, mantidas em casa de vegetação e pulverizadas uma vez por semana com fungicida, obtendo uma taxa de contaminação de 3,91%, sendo que a maior taxa ocorreu nos segmentos nodais (3,29%) quando comparados com as gemas (0,62%).

Além disso, antibióticos e antifúngicos podem ser combinados com os tratamentos de assepsia, bem como adicionados ao meio de cultura para auxiliar no controle de microrganismos. Bharadwaj et al. (2006), por exemplo, obteve máxima desinfestação (82,3%) usando 1000 mg.L⁻¹ de Ridomil (fungicida) em conjunto com 200 mg.L⁻¹ de hidroxiquinolona, sob agitação com os explantes, na micropropagação de *Rosa chinensis*.

Portanto, a assepsia realizada com a imersão dos segmentos nodais de mini-rosa em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1,25% de cloro ativo por 30 minutos, resultou no maior percentual de plantas assépticas, 45%. Além disso, o tratamento não causou danos aos tecidos, uma vez que estes explantes se estabeleceram in vitro e emitiram brotações ao final dos 30 dias de cultivo. Embora seja um resultado satisfatório para explantes oriundos de matriz de campo, outras práticas podem ser empregadas para melhorar a assepsia de segmentos nodais de mini-rosa cultivados in vitro.

CONCLUSÕES

Os segmentos nodais de mini-rosa submetidos ao hipoclorito de sódio na concentração de 1,25% por 30 minutos de imersão obtiveram o maior percentual de assepsia. Além disso, não apresentaram danos no estabelecimento in vitro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.40, p.467-470, 2005.

- ANDRADE, M.V.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). Ciência Agrotécnica, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, v.3, p.40-65, 2000.
- BHARADWAJ, R.; SINGH, S.K.; SURINDER, P.; SURENDRA, K. Improved protocol for a micropropagation of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. var. Minima) cultivas. Journal of Ornamental Horticulture, v.9, p.238-242, 2006.
- BOETTCHER, A. Sítios e jardins: rosas. São Paulo: Editora Europa, 87p. 1991.
- CONDE, P.; SOUSA, A.; COSTA, A.; SANTOS, C. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.92, p.113-119, 2008.
- DINIZ, J.D.N.; ALMEIDA, J.L.; OLIVEIRA, A.B.; BEZERRA, A.M. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento in vitro de *Spathiphyllum wallisi*. Revista Ciência Agronômica, v.39, p.107-113, 2008.
- DINIZ, J.D.; ALMEIDA, J.L.; OLIVEIRA, A.B.; VIDAL, F.R. Multiplicação e enraizamento in vitro de minirosa. Revista Ciência Agronômica, v.45, p.68-73, 2014.
- EFFEGEM, C.; GONTIJO, A.B.P.L.; CAMPANHARO, A.; GONTIJO, I. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). Enciclopédia Biosfera, v.10, p.1221-1228, 2014.
- FERMINO-JUNIOR, P.C.P.; NAGAO, E.O.; PEREIRA, J.E.S. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. Scientia Forestales, v.37, p.427-435, 2009.
- GOLLE, D.P.; REINIGER, L.R.S.; BELLÉ, R.A.; CURTI, A.R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). Revista Cerne, v.19, p.77-82, 2013.
- GOMES, G.B.; ROCHA, P.S.G.; FREITAS, F.B.R.; MENE-GATTI, P.W.S.; ZONIN, M.L.C. Estabelecimento in vitro de mini-rosa sob leds a partir de gemas e segmentos nodais. In: I Mostra Científica das Ciências Agrárias e Ciências Biológicas, 2014, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Erechim, RS. Anais... Erechim: EdIFAPES, 2014.
- KOLE, C. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Plantation and Ornamental Crops. Berlin: Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 303p. 2011.
- KUMUD, S.; HEM, P.; VIJAY, R. Micropropagation of rose cultivars: biotechnological application. Journal of Environmental Research and Development, v. 10, p.40-46, 2015.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. Pesquisa Florestal Brasileira, v.33, p.439-453, 2013.

- PEREIRA, G.A.; CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira ‘Grande naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, p.222-226, 2011.
- PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; SILVA, L.C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J.C. Efeito de hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento in vitro de jabuticabeira. *Scientia Agraria*, v.8, p.19-23, 2007.
- SANTOS, M.R.A.; CHAGAS, S.E.S.; GUIMARÃES, M.C.M. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). *Saber Científico*, v.4, p.10-16, 2015.
- SILVA, J.P.G.S.; COSTA, T.P.D.; COSTA, M.K.C.; ARAÚJO, M.R.S.; ARAÚJO, K.S.; SILVA, A.C.M.; OLIVEIRA, P.C.; SAI, E.F. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Rosa* sp. *Revista Agroecossistema*, v.9, p.370-380, 2017.
- SILVA, T.L.; PEREIRA, M.A.A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Propagação in vitro de sacaca (*Croton cajucara* Benth.): entendimentos sobre a dificuldade no desenvolvimento de protocolos de micropropagação da espécie. *Biotemas*, v.28, p.43-50, 2015.
- SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, W.L.R.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R.C. Contaminação microbiana na propagação in vitro de *Cattleya walkeriana* e *Schum burkii-crispa*. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, p.405-407, 2007.
- STEWART, A.J.; STEWART, R.F. Phenols. In: Jorgensen SE, Fath BD (Eds.). *Encyclopedia of Ecology*. Oxford: Academic Press, p.2682-2689. 2008.
- ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C.C.; CÂMARA, T.R. Clonagem vegetal. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v.7, p.86-91, 2010.