



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

ANA CAROLINE MILÉO DA SILVA

**DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE MINI-
ROSA (*Rosa* sp.) PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO***

**Santarém - PA
Julho de 2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

ANA CAROLINE MILÉO DA SILVA

**DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE MINI-
ROSA (*Rosa* sp.) PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao Instituto de Biodiversidade e
Florestas, da Universidade Federal do Oeste
do Pará como forma de requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientada: Ana Caroline Miléo da Silva.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliandra de Freitas Sia.

**Santarém - PA
Julho de 2018**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema
Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

S586d Silva, Ana Caroline Miléo da

Desinfestação de segmentos nodais de mini-rosa (*Rosa sp.*) para o estabelecimento *in vitro.*/ Ana Caroline Miléo da Silva. – Santarém, 2018.

37 p.: il.

Inclui bibliografias.

Orientadora: Eliandra de Freitas Sia

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Curso de Bacharelado em Biotecnologia.

1. Mini-rosa. 2. Cultura de tecidos. 3. Desinfestação. I. Sia, Eliandra de Freitas, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 583.73

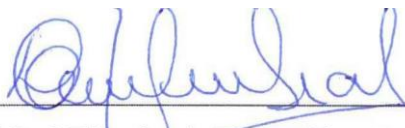
ANA CAROLINE MILÉO DA SILVA

**DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE MINI-ROSA
(*Rosa* sp.) PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO***

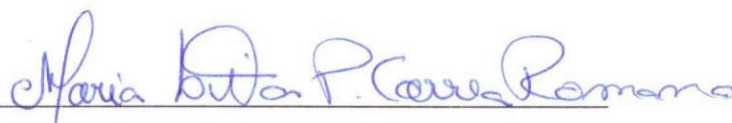
Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Instituto de Biodiversidade e Florestas, da Universidade Federal do Oeste do Pará como forma de requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Conceito:

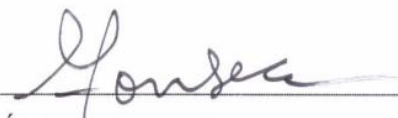
Data de Aprovação: 11/07/2018



Prof.^a Dr.^a Eliandra de Freitas Sia – Presidente / Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ



Prof. Dr.^a Maria Lita Padinha Corrêa - 1^o Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ



Prof. Dr. Elcio eira da Fonseca Júnior- 2^o Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus que colocou pessoas maravilhosas no meu caminho ao longo desta jornada. Me sinto uma filha muito privilegiada.

Aos meus pais Lena Silvia Cohen Miléo e José da Silva, por todo amor incondicional, apoio e incentivo a mim dedicados.

As minhas irmãs, Hellen Thais da Silva Miléo e Vitória Miléo da Silva pelo apoio e companheirismo.

Ao Laboratório de Micropropagação de Plantas *in vitro* da UFOPA por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Eliandra de Freitas Sia, pela parceria, atenção e pelos valiosos ensinamentos.

À Tanara Pletsch Dalla Costa, pela parceria e ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho, sem você este trabalho não seria o mesmo.

Aos professores Dr. Edwin Camacho Palamino e Rogério Rodrigues, por gentilmente disponibilizarem de seu tempo em me ajudar com a análise estatística.

À minha amiga Milla Karolina Corrêa Costa, por sempre estar disposta a me ajudar com este trabalho.

Gratidão a todos os envolvidos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Número total de contaminações de explantes de mini-rosa estabelecidos sob diferentes concentrações (1 -0,75%; 2 – 1% e 3 – 1,25%) de hipoclorito de sódio e tempos (1 – 10 min; 2- 20 min e 3 – 30 min) de desinfestação, ao longo de 30 dias de cultivo, com avaliações de 3 em 3 dias.....	16
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Retrospectiva de 5 anos com o faturamento e crescimento do setor de plantas ornamentais no Brasil.....	4
Tabela 2 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 <i>in vitro</i>	12
Tabela 3 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de mini-rosa desinfestados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão.....	16

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 FAMÍLIA E GÊNERO DE MINI-ROSA	12
2.2 CULTIVO NO BRASIL: IMPORTANCIA ECONÔMICA	13
2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	15
2.4 CULTURA DE TECIDOS	16
2.5 DESINFESTAÇÃO DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	19
4.2 DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i>	19
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO SOBREVIVÊNCIA E NECROSE	21
5.2 DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i>	24
4 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de plantas ornamentais do mundo, com as mini-rosa (*Rosa sp.*) configurando-se como uma das flores de vaso mais vendidas. No entanto, apesar de sua grande importância econômica, há carência de pesquisas de forma geral sobre as mini-roseiras, principalmente na área de cultura de tecidos. Geralmente, estas plantas são multiplicadas por propagação vegetativa através de estacas, mergulhia ou enxertia. Todavia, esses métodos de propagação tradicional possuem inúmeras características indesejadas, pois favorecem a disseminação de doenças e pragas, dependência sazonal e baixa taxa de multiplicação. Devido a esta problemática, o trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de desinfestação para o estabelecimento *in vitro* de mini-rosas no qual foram utilizados segmentos nodais como fonte de explantes. Em capela de fluxo laminar a desinfestação foi realizada utilizando álcool 70%, durante 5 minutos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio comercial com diferentes concentrações de cloro ativo (0,75%, 1,00% e 1,25%), com variações de tempo (10, 20 e 30 minutos) para cada concentração. Um total de 180 explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 com 9 tratamentos e 5 repetições, contendo 4 explantes por parcela. Foram avaliadas as variáveis porcentagem de contaminação, sobrevivência, necrose, calos, número de explantes responsivos, número e altura das plântulas e número de folhas. Dentre os tratamentos, o que apresentou melhores resultados foi a concentração de 1,25% com o tempo de imersão de 30 minutos, resultando em uma porcentagem de desinfestação de 45%, a qual proporcionou melhores condições para o estabelecimento *in vitro* e desenvolvimento dos segmentos nodais de mini-rosas, apresentando um maior número e altura de brotos e sem formação de necrose nos tecidos. Já os tratamentos com concentrações de 0,75% e 1% no tempo de exposição de 10 minutos, não foram eficientes para a desinfestação dos segmentos nodais, apresentando uma porcentagem de contaminação de 100% e 90%, respectivamente, nos primeiros dias de avaliação. Portanto, a concentração de 1,25% de hipoclorito de sódio associada ao tempo de 30 minutos de exposição ao agente, resultou na maior assepsia dos segmentos nodais de mini-rosas, bem como na maior sobrevivência e na menor ocorrência de necrose dos explantes, proporcionando ainda as melhores condições para o estabelecimento *in vitro* e desenvolvimento dos segmentos nodais de mini-rosas. Ressalta-se que o índice de desinfestação dos explantes foi satisfatório, uma vez que a planta matriz utilizada era oriunda do campo e não passou por um pré-tratamento de assepsia.

Palavras-chave: Mini-rosa, Cultura de Tecidos, Desinfestação.

ABSTRACT

Brazil stands out as one of the largest producers of ornamental plants in the world, with the mini-roses (*Rosa* sp.) becoming one of the best-selling potted flowers. However, in spite of the great economic importance of mini-roses, there is a lack of general research on mini-roses, mainly in the area of tissue culture. Generally, these plants are multiplied by vegetative propagation through cuttings, plunging or grafting. However, these traditional propagation methods have numerous undesirable characteristics, as they favor the spread of diseases and pests, seasonal dependence and low multiplication rate. Due to this problem, the objective of the work was to develop a disinfection protocol for the *in vitro* establishment of mini-roses in which nodal segments containing axillary buds were used as source of explants. In a laminar flow hood, disinfection was performed using 70% alcohol for 5 minutes, followed by immersion in commercial sodium hypochlorite with different concentrations of active chlorine (0.75%, 1.00% and 1.25%), with (10, 20 and 30 minutes) for each concentration. A total of 180 explants were inoculated in MS medium supplemented with 30 g / L sucrose. The experimental design was completely randomized in factorial 3 x 3 with 9 treatments and 5 replicates, containing 4 explants per plot. The variables variables of contamination, survival, necrosis, callus, number of responsive explants, number and height of the seedlings and number of leaves were evaluated. Among the treatments, the best results were the concentration of 1.25% with the immersion time of 30 minutes, resulting in a rate of disinfection of 45%, which provided better conditions for *in vitro* establishment and development of segments nodal of mini-roses, showing a greater number and height of shoots and without formation of necrosis in the tissues. However, treatments with concentrations of 0.75% and 1% in the exposure time of 10 minutes were not efficient for disinfection of the nodal segments, presenting a contamination rate of 100% and 90%, respectively, in the first evaluation days. Therefore, the concentration of 1.25% sodium hypochlorite associated with the 30-minute exposure time to the agent resulted in a higher aseptic rate of the mini-roses nodal segments, as well as higher survival and lower occurrence of necrosis explants, further providing the best conditions for *in vitro* establishment and development of nodal segments of mini roses. It should be noted that the disinfection index of the explants was satisfactory, since the matrix plant used came from the field and did not undergo an aseptic pretreatment.

Key words: Mini-rose, Tissue Culture, Disinfection.

1. INTRODUÇÃO

A família *Rosaceae* compreende aproximadamente 100 gêneros e cerca de 3.000 espécies de grande interesse econômico, devido a utilização ornamental das flores como *Rosa spp.* (roseiras) e frutos como de *Fragaria ananassa* (morangueiro), de *Rubus idaeus*. (framboeseira), de *Malus sylvestres* (macieira), entre outras (SOUZA & LORENZI, 2012) O gênero *Rosa* L. é considerado difícil classificar em função de sua diversidade morfológica, por isso, não existe um consenso na literatura quanto ao número de espécies, variando de 150 a 250 espécies relatadas, com mais de 30.000 mil variedades e inúmeros híbridos, produtos de cruzamento e retrocruzamentos (BOETTCHER, 1991; WISSEMANN, 2003, KOLE, 2011; FUGAS, 2015).

Dentro desta diversidade encontram-se as mini-roseiras (*Rosa sp.*) que receberam este nome devido ao seu pequeno porte quando comparadas a outras roseiras, variando de 20 a 40 centímetros de altura. Elas descendem da *Rosa chinensis* Jacq., espécie natural da China, florescem continuamente e são encontradas flores nas mais variadas cores, tais como vermelho, rosa, amarelo, laranja, purpura e branca (BOETTCHER, 1991; DINIZ, 2014).

As espécies de *Rosa* têm diferentes aplicações, seja na indústria farmacêutica para a produção de perfumes, cosméticos e aromatizantes utilizando óleo essencial das suas pétalas; para fins medicinais como diuréticos, inchaço na tireoide, dores de cólica; assim como na culinária para a preparação de chás com as folhas e de confeitos, vinagres e molhos usando as suas pétalas, inclusive em dietas para ganho de peso (PRATA *et al.*, 2017; BOSKABADY *et al.*, 2011; SILVESTRE & MONTSERRAT, 2001; BARBIERI & STUMPF, 2005). Especificamente as mini-rosas são usadas para enxaquecas, cansaço mental (ZATTA, 1993), apresentam ação antioxidante (CAI *et al.*, 2005) e possuem efeito fungistático contra algumas espécies de fungos devido a presença do ácido gálico (TRIPATHI *et al.*, 1977). No entanto, o principal uso das roseiras tem sido na floricultura (BARBIERI & STUMPF, 2005; NEVES & PINTO, 2015).

Neste cenário, o Brasil está entre os 15 maiores produtores de plantas ornamentais do mundo, tendo um faturamento no ano de 2016 de R\$ 6,7 bilhões, enquanto que em 2017 foi de R\$ 7,3 bilhões. Frente a crise que o país enfrenta esses dados são bastante significativos, demonstrando o potencial do país para aumentar ainda mais esses valores conforme o fortalecimento da economia. Diante deste cenário, é positivo o setor ter se mantido em crescimento no mercado interno e com perspectiva de crescimento entre 8 e 10% para 2018 (IBRAFLOR, 2017).

Entre as flores de vaso mais cultivadas, destacam-se as mini-rosas, orquídeas, azaléias e crisântemos (IBRAFLOR, 2017). Com as mini-roseiras configurando-se como o 202º produto mais comercializado na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo no ano de 2016, com 69 toneladas vendidas somente nesse estado (CEAGESP, 2017). Apesar da grande importância econômica no país, ainda há carência de pesquisas sobre o manejo, as exigências nutricionais para seu cultivo em solos brasileiros e programas de melhoramento, assim como tecnologias apropriadas para o cultivo nas diversas condições edafoclimáticas do país (BEZERRA, 2011).

As roseiras geralmente são multiplicadas por métodos de propagação vegetativa tradicionais, como estaquia, mergulhia e enxertia. No entanto, tais técnicas apresentam dependência sazonal, baixa taxa de multiplicação, demandam tempo, a produção é lenta e apresentam incapacidade de produzir plantas sem doença, o que favorece a disseminação e o acúmulo de patógenos (DINIZ, 2014; KUMUD *et al.*, 2015).

Deste modo, a utilização de técnicas biotecnológicas como a micropropagação, surge como uma alternativa para a propagação de *Rosas spp.*, permitindo a obtenção de maior número de mudas com qualidade fitossanitária (SCARANARI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2017). A técnica consiste no cultivo *in vitro* de plantas, com meios nutritivos adequados, sob condições controladas de luminosidade, temperatura e fotoperíodo. Além disso, viabiliza 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; ALMEIDA *et al.*, 2015).

No entanto, uma das principais problemáticas da micropropagação se encontra em controlar e prevenir a contaminação dos explantes por microrganismos no cultivo *in vitro*, sem causar danos aos explantes (GOLLE *et al.*, 2013). Portanto, a desinfestação é um dos primeiros e principais passos para o bom estabelecimento das plântulas micropropagadas, na qual, as demais etapas dependem do sucesso da mesma (EFFEGEM *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2011).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA E GÊNERO DE MINI-ROSA

As rosas pertencem a família *Rosaceae* Juss. que abrange diversas espécies importantes economicamente. Grande parte dos frutos que consumimos pertencem a esta família, incluindo a maçã (*Malus sylvestris.*), pera (*Pyrus communis*), o pêssego (*Prunus persica*), nêspersas (*Eriobotrya japonica*), marmelo (*Cydonia oblonga*), ameixa (*Prunus domestica*), o morango (*Fragraria spp.*), entre outros. Também inclui importantes gêneros ornamentais como as roseiras (*Rosa spp.*), alquimila (*Alchemilla vulgaris*), o buquê – de noiva (*Spiraea spp.*), a sorveira (*Sorbus spp.*), entre outros (SOUZA & LORENZI, 2012).

A família possui cerca de 100 gêneros e 3.000 espécies, com poucas espécies nativas do Brasil, em torno de 7 gêneros e 25 espécies (SOUZA & LORENZI, 2012). Dentre os gêneros que possuem maior número de representantes estão *Rubus L.* com 400; *Potentilla L.* com 300 espécies; *Crataegus L.* que compreende 300 espécies; *Prunus L.* e *Rosa L.* que incluem cerca de 200 espécies. No entanto, ainda há controvérsia sobre o número exato de espécies pertencentes ao gênero *Rosa L.* variando de 150 a 250 espécies relatadas, sem considerar as variedades oriundas de cruzamento e retrocruzamentos (BOETTCHER, 1991; WISSEMANN, 2003; SOUZA & LORENZI, 2012; KOLE, 2011; FUGAS, 2015).

As espécies desse gênero são consideradas as plantas mais antigas em cultivo em todo o mundo, sendo cultivadas de 3 a 4 mil anos antes da Era de Cristo, tendo como centro primário de diversidade a Ásia (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988; SILVA, 1977). Apresentam uma distribuição cosmopolita, com maior representatividade na Europa, América do Norte e Ásia (KIYAMA, 2003).

Análise do DNA (Ácido Desoxirribonucleico) de rosas mostram que elas devam existir á pelo menos 200 milhões de anos atrás com distribuição em todo Hemisfério Norte (BARBIERI & STUMPF, 2005). No entanto, mais pesquisas sobre a idade da *Rosa* são necessárias, devido a ampla diversidade genética que possuem e sua difícil classificação (FUGAS, 2015). Os estudos moleculares ainda não foram usados com sucesso para construir uma filogenia abrangente das espécies do gênero (KOLE, 2011). Por isso, esta família é considerada uma das mais diversificadas no clado das angiospermas (POTTER, 2007).

Dentro desta ampla diversidade encontrada no gênero *Rosa*, estão presentes as mini-roseiras (*Rosa sp.*), popularmente chamadas de mini-rosas ou rosas-meninas, que são caracterizadas pelo tamanho diminuto das suas flores de pequeno à médio, quando comparadas às demais rosaseiras. São consideradas descendentes de uma espécie natural da China

denominada de *Rosa chinensis* Jacq., de crescimento compacto, floração intensa e contínua, suas flores possuem uma grande durabilidade, espinhos no talo e ciclo de vida perene (BOETTCHER, 1991; DINIZ, 2014).

2.2 CULTIVO NO BRASIL: IMPORTANCIA ECONÔMICA

A floricultura é um campo da horticultura responsável pela produção comercial de flores e plantas ornamentais, a qual exerce importantes funções econômicas, ecológicas, culturais e sociais. A importância na economia, deve-se ao rápido retorno financeiro, em decorrência do curto ciclo de produção com alto valor agregado e geração de elevado número de empregos fixos (TERRA & ZÜGE, 2013).

No último balanço liberado pelo Instituto Brasileiro de Floricultura (2017), o Brasil encontra-se entre os 15 maiores produtores de flores do mundo, com um faturamento anual em torno de 6 bilhões de reais. De acordo com uma retrospectiva de 5 anos, mostrado na Tabela 1, houve um aumento significativo no faturamento neste setor. Isto demonstra o potencial do Brasil para floricultura, que mesmo em meio à crise econômica enfrentada pelo país, a qual impactou diversos setores, ainda assim, houve aumento mesmo que pequeno no consumo de flores. É importante ressaltar que as flores são vendidas internamente, principalmente em datas comemorativas como o Dia dos Namorados e Dia das mães. Considerando a atual situação econômica do país, poucas são as classes econômicas que ainda conseguem presentear com flores. Apesar disto, o setor se manteve em crescimento no mercado interno e com perspectiva de crescimento entre 8 e 10% para 2018 (NEVES & PINTO, 2015; IBRAFLOR, 2017).

Tabela 1. Retrospectiva de 5 anos com o faturamento e crescimento do setor de Plantas Ornamentais no Brasil.

Faturamento e Crescimento do mercado de Plantas Ornamentais no Brasil (à nível de consumidor)		
Ano	Faturamento	Crescimento
2013	R\$ 5,2 bilhões	16%
2014	R\$ 5,7 bilhões	12%
2015	R\$ 6,2 bilhões	10,4%
2016	R\$ 6,7 bilhões	8%
2017	R\$ 7,3 bilhões	8%

Fonte: Adaptado de Instituto Brasileiro de Floricultura (2017).

O processo de profissionalização e dinamismo da Floricultura como atividade são considerados fenômenos relativamente recentes no país, entretanto, já conta com números extremamente significantes, apresentando um crescimento nos últimos cinco anos, com cerca de 8 mil produtores de plantas ornamentais. Deste modo, o mercado de flores é considerado uma importante engrenagem na economia brasileira, responsável por 199.100 empregos diretos, sendo 8.400 (4,22%) relacionados à distribuição, 105.500 (53%) ao varejo, 78.700 (39,53%) à produção e 6.500 (3,25%) em outras funções como de apoio (RESENDE & TOLEDO, 2014; IBRAFLO, 2017).

Dentro deste contexto, o principal mercado para expansão da floricultura brasileira é o interno, devido ao baixo consumo per capita que esteve em torno de R\$ 35,00 por habitante no ano de 2017, com estimativa de crescimento para R\$ 38,00 em 2018, enquanto países da Europa apresentam um consumo per capita de R\$ 150. A Alemanha, por exemplo, é o maior consumidor de flores da Europa com gasto por habitante em torno de R\$ 190,00. Aliado a isso, o setor apresenta um grande potencial de expansão no Brasil, tendo em vista as condições edafoclimáticas diversas do país, que favorecem a produção de espécies de clima temperado e tropical (FACHINELLO, 2011; IBRAFLO, 2017).

A produção brasileira é subdividida em três setores: Plantas ornamentais para paisagismo e jardinagem, Flores e folhagens de corte e Flores e plantas envasadas, com participação no mercado distribuída em 41,55%, 34,33% e 24,12%, respectivamente. No entanto, através de análises comparativas de 2008 a 2013, foi possível perceber que tanto as Flores e folhagens de corte quanto as Flores e plantas envasadas vêm apresentando crescimento. Por sua vez, o setor de Plantas ornamentais para paisagismo e jardinagem exibiu diminuição da porcentagem de participação no mercado interno. Para Flores e folhagens de corte, o crescimento se deve em grande parte ao crescimento do mercado interno, ao aumento da área destinada ao plantio e do número de produtores, especialmente na região Norte do país (JUNQUEIRA & PEETZ, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

As rosas estão entre as mais importantes no setor de Flores e folhagens para corte distribuídas no Brasil (SEBRAE, 2015; DIAS *et al.*, 2016). Esta categoria, aparece em terceiro lugar em área cultivada com 790 hectares, destacam-se os cultivos de rosas, crisântemos, astromélias, lírios, lisiantos. Já para Flores e plantas envasadas a área cultivada foi de 810 hectares com o maior faturamento por hectare da categoria, destacando-se os cultivos de mini-rosas, orquídeas, kalanchoe, antúrios e crisântemos (NEVES & JUNQUEIRA, 2015; IBRAFLO, 2017).

Em relação as macrorregiões geográficas do país, a região Sudeste é a principal consumidora e produtora de flores e plantas ornamentais, na qual a maior concentração pertence ao estado de São Paulo; o Sul é a segunda região mais importante neste segmento; o Nordeste vem registrando um significativo crescimento e o Norte é a região do Brasil que apresenta maior potencial de crescimento na floricultura. O estado do Pará é o principal produtor de flores de corte da região Norte, no qual a área cultivada com flores vem aumentando e a produção tem como finalidade abastecer o mercado local e os demais estados da região. Entre 2008 e 2013 o estado apresentou um crescimento no número de produtores, devido ao apoio de órgãos e entidades privadas e públicas, com particular destaque para o município de Santarém (SEBRAE, 2015).

2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

Tradicionalmente, as roseiras são multiplicadas por propagação vegetativa artificial através da enxertia, mergulhia e estaquia (DINIZ *et al.*, 2014). Comercialmente, mudas de roseiras são produzidas predominantemente por enxertia, sendo a enxertia-de-mesa o método mais usado, através de encostia, borbulhia sob casca e enxertia por garfagem e muda estabelecida (BARBOSA *et al.*, 2011). Algumas espécies também são propagadas por meio da propagação sexuada, através de sementes por semeadura. A população de plantas propagadas por sementes apresenta maior variabilidade entre os indivíduos em relação à propagação vegetativa, o que é geralmente indesejável. No entanto, ela apresenta algumas vantagens como baixo custo, facilidade de armazenamento e transporte (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Comercialmente, a obtenção de mudas propagadas de forma assexual, como a enxertia, mergulhia e estaquia é interessante, pois através destes métodos é possível obter plantas uniformes com o mesmo fenótipo da planta-mãe, selecionando e conservando características desejadas como a alta produtividade, floração, etc. (CID, 2014). No entanto, tais técnicas são caras, o processo é relativamente lento e trabalhoso, juntamente com outras desvantagens, como incapacidade de produzir plantas sem doenças, dependência sazonal e produção lenta. (KUMUD *et al.*, 2015).

Outra problemática a destacar, está relacionada as doenças relatadas no cultivo tradicional. A Podridão-da-Estaca está associada ao método de propagação por estaquia, causada pelo patógeno *Lasiodiplodia theobromae*, que afeta cerca de 300 espécies de plantas, incluindo roseiras e mini-rosas. Esta doença causa uma infecção na forma de um escurecimento basal necrótico, o qual avança para a extremidade superior ou inferior, impedindo o enraizamento e podendo matar toda a estaca. Estas infecções se disseminaram em alguns

viveiros no Brasil e seu controle se dá de forma preventiva através de pulverizações nas plantas matrizes um mês antes da retirada das estacas. Outras podridões são relatadas na literatura associadas a estaquia em viveiros, causadas por *Rhizoctonia solani*, *Cylindrocladium sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides*. (FREIRE & VIANA, 2007). Dessa forma, a cultura de tecidos *in vitro*, surge como uma boa alternativa para propagação de roseiras com qualidade fitossanitária (SCARANARI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2017).

2.4 CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos *in vitro*, consiste no aproveitamento da capacidade de totipotência das células vegetais, na qual tecidos diferenciados conseguem se regenerar e recuperar características e potencialidades de células embrionárias (CARVALHO, 1996). Abrange um conjunto de técnicas que permitem a multiplicação e crescimento de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, em meio de cultura apropriado, sob condições assépticas e ambientais controladas com determinadas condições de luminosidade e temperatura (CARVALHO, 2011). Dentre as técnicas de cultura de tecidos, destaca-se a micropropagação que permite uma rápida multiplicação das plantas em larga escala, viabilizando a produção de grande quantidade de mudas idênticas à planta matriz, durante todo o ano (ULISSES, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2015).

A micropropagação surge como uma alternativa mais eficiente frente aos métodos tradicionais de propagação (SILVA, *et al.*, 2017). Tendo em vista que, em um sistema de produção otimizado, o material é dividido em 4 a 6 semanas, produzindo pelo menos uma duplicação de biomassa em cada ocasião (WARDROP, 1997). Martin (1985), estimou que anualmente podem ser obtidas 400.000 plantas de alta qualidade, uniformes à planta matriz, livres de doenças através da micropropagação de uma única roseira. Essa capacidade de produzir números tão grandes de plantas facilita a multiplicação rápida de novas cultivares e, assim, maior capacidade de resposta às exigências do mercado.

A micropropagação de mudas oferece algumas vantagens, como a redução do tempo e espaço necessários para a obtenção dessas plantas e a oferta de materiais com qualidade fitossanitária, livres de fungos, bactérias, nematoides e vírus, os quais podem ser prejudiciais as mudas (SCARANARI *et al.*, 2008). No entanto, para que a micropropagação de mudas se torne uma técnica competitiva em relação aos demais métodos tradicionais e seja viável comercialmente, é necessário reduzir gastos com a produção, que são causadas em grande parte pelas perdas por contaminação *in vitro* dos explantes (ERIG & SCHUCH, 2005). Esta é uma

das principais problemáticas da técnica, manter os propágulos livres de microrganismos no cultivo *in vitro* (GOLLE *et al.*, 2013).

2.5 DESINFESTAÇÃO DE PLANTAS *IN VITRO*

A desinfestação consiste em uma etapa da micropropagação que visa eliminar microrganismos contaminantes aderidos na superfície dos explantes obtidos de casa de vegetação ou de campo. Dessa forma, considera-se o desenvolvimento de uma metodologia de desinfestação um dos primeiros e principais passos para o bom estabelecimento dos explantes micropropagados (CARVALHO *et al.*, 2006). Para tanto, podem ser usadas diversas substâncias com ação germicida como o etanol, o hipoclorito de sódio e de cálcio, cloreto de mercúrio, peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico, isopropanol alguns ácidos e bases concentrados, entre outros (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; CARVALHO *et al.*, 2006). Os agentes desinfetantes mais utilizados são os produtos químicos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio com variações na concentração de cloro ativo (EFFEGEM *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2011).

Geralmente, esta etapa é realizada em capela de fluxo laminar, onde os explantes envolvidos por gaze, são expostos a concentrações de hipoclorito de sódio ou água sanitária, durante determinado período de tempo, sob agitação. Posteriormente, retira-se o excesso de hipoclorito com três enxagues em água bidestilada esterilizada em autoclave, e por último, o explante é colocado em meio de cultura (CARVALHO *et al.*, 2006)

Neste processo, as espécies de plantas e seus tecidos apresentam respostas diferentes devida a exposição as substâncias desinfetantes, sendo a concentração e o tempo, variáveis relevantes que influenciam nestas respostas (SMITH, 2000). Então, para cada espécie são realizados estudos prévios a fim de determinar o tipo de substância desinfetante utilizada, a concentração da mesma e o tempo de imersão do explante a substância, a fim de encontrar os melhores parâmetros que garantam uma boa desinfestação sem causar danos aos tecidos devido a sensibilidade de exposição ao agente (SILVA, 2012). Ao se tratar de espécies lenhosas como as mini-rosas, existe uma dificuldade encontrada na literatura em promover o estabelecimento *in vitro* com obtenção de explantes assépticos, a partir de plantas de origem do campo ou de casa de vegetação (NADHA *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de desinfestação de segmentos nodais de mini-rosas, visando sua propagação *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor concentração e tempo de imersão ao hipoclorito de sódio para desinfestação de segmentos nodais de mini-rosas, através da análise da porcentagem de contaminação, sobrevivência e necrose obtidas por tratamento;
- Avaliar o desenvolvimento *in vitro* dos explantes de mini-rosa, por tratamento, através da análise das variáveis: número de explantes responsivos, número e altura das plântulas, número de folhas e calos produzidos após 30 dias de cultivo *in vitro*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Para o presente estudo foi utilizado mudas de mini-rosas de cor vermelha, entre 4 e 6 meses de idade, obtidas no Mercado das Flores em Santarém-PA, com o produtor Luiz Alberto Alcântara de Menezes, que possui viveiro localizado na Rua Castelo Branco, bairro do Mararú, n° 1.030.

As mudas foram levadas para o 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. Onde foi realizada a retirada de ramos jovens das matrizes com o auxílio de uma lâmina de bisturi, com posterior retirada das folhas, obtendo-se os segmentos nodais contendo gemas axilares de aproximadamente 4 cm, os quais foram envoltos em gaze e levados para a capela de fluxo laminar.

4.2 DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Em capela de fluxo laminar, os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v) durante 5 minutos e, posteriormente, em hipoclorito de sódio comercial a 2% (Qboa®) com diferentes concentrações de cloro ativo de 0,75%, 1,00% e 1,25% (v/v) e com tempos de imersão de 10, 20 e 30 minutos para cada concentração, e por último, foram emergidos em água destilada esterilizada por três vezes consecutivas.

Após a assepsia, os segmentos nodais foram reduzidos a aproximadamente 2 cm, os quais foram inoculados em tubos de ensaio (30X150 mm) contendo 5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962 - Sigma-aldrich) previamente autoclavado (Digitale) no ciclo 2 a 135°C durante 20 minutos, o qual foi suplementado com 30g/L de sacarose (Sigma-aldrich), 2g/L de Phytigel (Sigma-aldrich), 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético – ANA (Sigma-aldrich), e 0,5 mg/L de ácido 6-benzilaminopurin – BAP (Sigma-aldrich), com pH ajustado para 5,7. Os frascos inoculados foram mantidos em sala de crescimento iluminadas com lâmpadas fluorescentes brancas frias, as quais fornecem uma densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27°C \pm 2°C.

As avaliações foram realizadas a cada 3 dias, após a introdução *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 oxidação total.

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foi realizada a avaliação final do experimento, quando foram analisadas variáveis como sobrevivência, número de bortes, altura das plântulas, número de explantes responsivos, ou seja, aqueles que formaram brotos, número de folhas e calos.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (concentrações hipoclorito de sódio) x 3 (tempos de imersão) com 5 repetições, contendo 4 explantes por parcela, totalizando 20 explantes por tratamento.

Os resultados das variáveis altura das plântulas, número de brotos e número de folhas foram submetidos a análise estatística descritiva, na qual foram obtidos os valores das médias e coeficiente de variação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO SOBREVIVÊNCIA E NECROSE

Na avaliação da porcentagem de contaminação (Tabela 2), o tratamento que apresentou a menor porcentagem foi o T9 (NaClO 1,25% por 30 minutos), com 55% de contaminação causada somente por fungos. Para a desinfestação de plantas de mini-rosa, o tratamento T1 (NaClO à 0,75% com 10 minutos de exposição) não foi eficiente na desinfestação, pois 9 dias após a data de inoculação 100% dos explantes contaminaram, desses 80% por fungos, 5% por bactérias e 15% de contaminação por ambos os microrganismos.

Tabela 2: 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)	Tempos ⁽²⁾ (min)	Tratamentos	Fungos (%)	Bactérias (%)	F e B ⁽³⁾ (%)	Sobrevivência (%)	Necrose (%)
0,75%	10	T1	80	5	15	0	5
	20	T2	60	5	5	30	10
	30	T3	65	5	5	25	5
1,00%	10	T4	80	10	0	10	30
	20	T5	50	15	0	35	15
	30	T6	55	0	15	30	5
1,25%	10	T7	70	0	0	30	0
	20	T8	60	0	0	40	0
	30	T9	55	0	0	45	0

Fonte: Autora

(1) Concentrações de cloro ativo. (2) Tempos de imersão. (3) F e B - Fungos e bactérias.

As concentrações 0,75% e 1,00% no tempo de 20 minutos (T2, T5) apresentaram uma porcentagem de sobrevivência maior quando comparadas ao tempo de 30 minutos (T3, T6) nessas mesmas concentrações. No entanto, elas apresentaram uma maior necrose dos explantes comparadas ao tempo de 30 minutos. Isso demonstra que apesar da maior sobrevivência, os explantes desenvolveram-se melhor no tempo de 30 minutos, apresentando uma porcentagem menor de necrose de apenas 5%.

Salles *et al.* (2017), realizaram a desinfestação de segmentos nodais de *Acaccia mearnsii* originada do campo, utilizando álcool 70% por 10 segundos, HgCl (0,4%) por 15 minutos, com variações nas concentrações de 2% a 3% de hipoclorito de sódio e tempo de

exposição de 10 e 15 minutos, no qual ocorreu menores porcentagens de necrose nos tratamentos com as maiores concentrações de hipoclorito de sódio (3%) e no tempo de 15 minutos não houve necrose, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, no qual a maior concentração de NaClO (1,25%) também não acarretou em necrose nos explantes.

Drefahl (2004) realizou ensaios utilizando segmentos nodais de *Rosa x híbrida* desinfestadas com etanol por 1 minuto e diferentes concentrações de NaClO por 5 minutos, obteve melhor resultado com o NaClO à 2% com uma porcentagem de sobrevivência de 60% e necrose de 75%. Além disso, verificou que o aparecimento de necrose estava relacionada com a contaminação fúngica e bacteriana, provavelmente devido a ação fitotóxica desses microrganismos. A mesma relação foi encontrada neste trabalho para mini-rosas, pois os tratamentos com as menores concentrações de hipoclorito de sódio (0,75% e 1,00%) foram os que apresentaram necrose nos explantes e os mesmos posteriormente contaminaram.

Os tratamentos T7, T8 e T9 apresentaram uma porcentagem de sobrevivência de 30, 40 e 45%, respectivamente, com ausência de necrose para esses tratamentos e eficiência na assepsia de bactérias, enquanto o T9 obteve a menor porcentagem de contaminação (55%). Contudo, deve-se ressaltar que esses explantes foram retirados de uma planta originária de campo e que não foi realizado pré-tratamento para auxílio na assepsia.

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 a porcentagem de contaminação foi de 55% para segmentos nodais de mini-rosas.

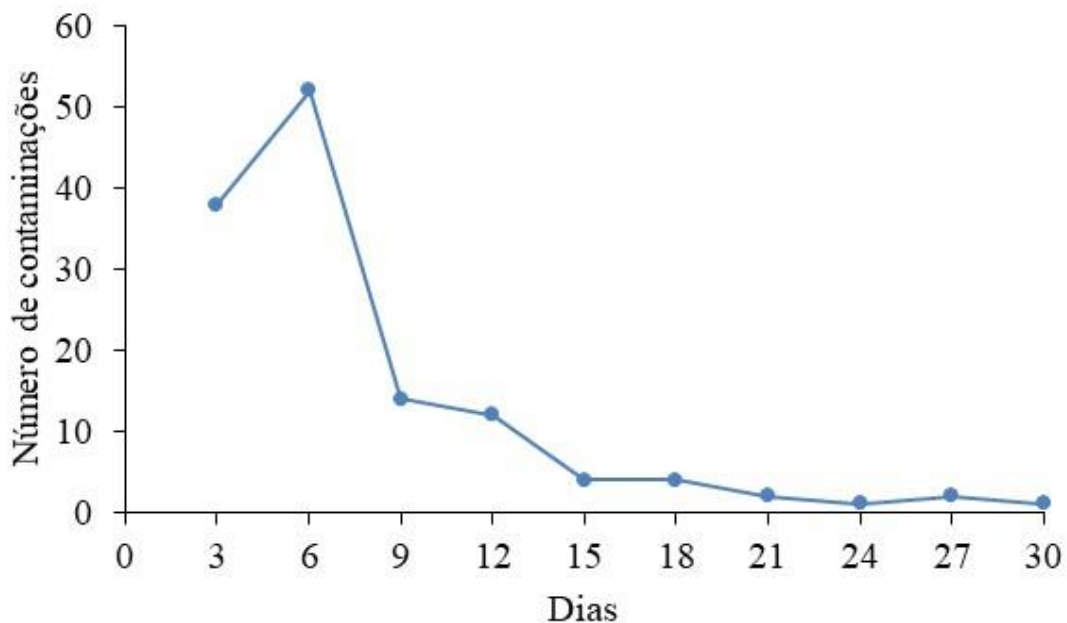
Segundo Santos *et al.* (2015) explantes provenientes de plantas matrizes cultivadas no campo apresentam naturalmente maior porcentagem de contaminação, aliado a isso, plantas lenhosas, como o caso das mini-rosas, merecem atenção especial, pois as contaminações são frequentes obstáculos para o estabelecimento *in vitro* dessas plantas (GOLLE *et al.*, 2013). Para a lenhosa *Ulmus minor* Mill., o estabelecimento de brotos extraídos diretamente do campo resultou em contaminações próximas a 100% (CONDE *et al.*, 2008).

Por isso, para uma desinfestação eficiente algumas plantas necessitam da adição de fungicidas ao meio de cultura, conforme realizado por Jobim *et al.* (2013) para a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), que obteve uma porcentagem de contaminação de 0% utilizando o fungicida Derosal Plus aliado ao etanol e hipoclorito de sódio a 2,5%. Outro trabalho relevante

é o de Bharadwaj *et al.* (2006), com micropropagação de *Rosa chinensis* Jacq., que obteve como resposta máxima uma desinfestação de 82,3% usando 1000 mg/L de Ridomil (fungicida) em conjunto com 200 mg/L de 8-HQC (Hidroxiquinolina) durante 2 horas sob agitação.

A adição do fungicida é devido a alta incidência de microrganismos endofíticos, e esse talvez seja o caso dos explantes de mini-rosa neste trabalho, pois, observou-se que na 10ª avaliação (aos 30 dias de cultivo *in vitro*) ainda haviam explantes contaminando (Figura 1), porém são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese. Os efeitos de microrganismos endofíticos *in vitro* ainda são pouco conhecidos, mas quando deixam o tecido das plantas e passam a colonizar o meio de cultura são responsáveis por grande perda de materiais vegetais micropropagados (TOLEDO, 2011).

Figura 1: Número total de contaminações de explantes de mini-rosa estabelecidos sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1 -0,75%; 2 - 1% e 3 - 1,25%) e tempos de desinfestação (1 - 10 min; 2- 20 min e 3 - 30 min), ao longo de 30 dias de cultivo *in vitro*, com avaliações de 3 em 3 dias.



Fonte: Autora.

Conforme apresentado na Figura 1, houve uma redução na contaminação dos explantes no decorrer do tempo de cultivo *in vitro*. A fase crítica de contaminação se deu nos primeiros 12 dias após a inoculação, o que corrobora com o trabalho de Silva *et al.* (2017) em *Rosa sp.*, onde sua fase crítica foi nos primeiros 14 dias após a inoculação.

Após os 6 primeiros dias, os índices de contaminações foram diminuindo, mas se mantiveram presentes até o último dia de avaliação, com 30 dias de experimento. O mesmo foi

encontrado por Silva *et al.* (2017) e Sousa *et al.* (2007) para *Rosa sp.* e orquídeas, respectivamente. No qual, mesmo após 30 dias de experimento ainda haviam explantes contaminando e ambos utilizaram como fonte de explantes matrizes cultivadas em campo.

A manutenção de matrizes de origem do campo em casa de vegetação aliado a um pré-tratamento pode ser uma alternativa eficaz para a redução da contaminação do explante em condições de cultivo *in vitro* (SOUZA, *et al.*, 2014). Gomes *et al.* (2014), utilizaram plantas de mini-rosas vermelhas de origem de campo, mantidas em casa de vegetação e pulverizadas uma vez por semana com fungicida, obtendo uma porcentagem de contaminação de 3,91%, sendo que a maior porcentagem ocorreu nos segmentos nodais (3,29%) quando comparados com as gemas (0,62%).

Outra possibilidade seria utilizar o NaClO à 1,25% em conjunto com outro agente desinfetante como o cloreto de mercúrio (HgCl), biguanida (PHMB), dióxido de cloro (ClO₂), tiofanato metílico, lixívia ou ácido sulfúrico (H₂SO₄), comumente utilizados na literatura para desinfestação de algumas espécies (SALLES *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2017; BELTRAME, 2013; FABRIS *et al.*, 2013). De acordo com Zeng (2013), a desinfestação de segmentos nodais de mini-rosas vermelhas utilizando o cloreto de mercúrio II (HgCl₂) a 0,1% durante 3 minutos por 3 vezes, proporcionou uma porcentagem de descontaminação de 88%.

Portanto, embora os resultados deste trabalho tenham sido satisfatórios, considerando-se o fato da matriz ser oriunda do campo, para que se tenha uma maior eficiência, é necessário a otimização deste protocolo de desinfestação. Neste contexto, é possível utilizar maiores tempos de exposição e diferentes combinações de agentes desinfetantes, adicionar antibióticos e fungicidas no meio de cultura, entre outras ações, a fim de diminuir a porcentagem de contaminação e conseqüentemente os custos do processo.

5.2 DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*

Para avaliar o desenvolvimento das plântulas, foi realizada a contagem dos explantes responsivos, ou seja, aqueles que formaram brotos, do número de brotos por explante, altura das plântulas, número de folhas e porcentagem de calos (Tabela 3).

Para a variável número de explantes responsivos, os tratamentos com o maior número foram o T8 e o T9, com 7 explantes. Já os tratamentos com menor número de explantes responsivos foram o T4 e o T7, com 0 e 3, respectivamente. O T1 não continha mais representantes aos 30 dias de experimento (Tabela 3).

Dessa forma, a maior concentração de hipoclorito de sódio (1,25%) proporcionou a formação de um maior número de explantes responsivos, devido a uma melhor desinfestação

e sobrevivência, totalizando 17 explantes. Enquanto para as concentrações de 0,75% e 1,00% totalizaram apenas 10 explantes responsivos cada, devido à alta porcentagem de contaminação nesses tratamentos (Tabela 2). Observa-se, que não houve diferença entre as concentrações 0,75% e 1,00%, na qual o T1 e o T4 com tempo de 10 minutos contaram com 0 explantes responsivos. Os tratamentos T2, T3, T5 e T6 (tempo de 20 e 30 minutos) contaram com 5 explantes responsivos cada, com as mesmas médias para número de brotos.

Para a análise do tempo para número de responsivos, percebe-se que os tempos de 20 e 30 minutos apresentaram um maior número de explantes responsivos, não diferindo entre si para esta variável. Para o tempo de 10 minutos restaram 8 explantes, devido à alta porcentagem de contaminação de seus representantes, dos quais apenas 3 foram responsivos, quando submetidos ao hipoclorito de sódio a 1,25% (T7).

Tabela 3: Desenvolvimento *in vitro* de explantes de mini-rosa desinfestados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão.

C ⁽¹⁾ (v/v)	T ⁽²⁾ (min)	Trat ⁽³⁾	Resp ⁽⁴⁾	Número de Brotos		Altura das Plântulas(cm)		Número de Folhas		Calos (%)
				Média	CV(%) ⁽⁵⁾	Média	CV(%) ⁽⁵⁾	Média	CV(%) ⁽⁵⁾	
	10	T1	-	-	-	-	-	-	-	0
0,75%	20	T2	5	1	0,00	0,80	69,60	4,80	57,81	10
	30	T3	5	1,2	37,27	0,86	43,51	4,20	26,08	0
	10	T4	0	-	-	-	-	-	-	0
1,00%	20	T5	5	1,2	37,27	0,94	48,75	5,00	80,00	10
	30	T6	5	1	0,00	1,04	38,46	4,20	35,32	15
	10	T7	3	1	0,00	1,20	71,20	5,30	94,96	10
1,25%	20	T8	7	1	0,00	1,17	82,42	4,14	92,96	20
	30	T9	7	1,29	58,53	1,13	63,20	4,14	56,54	20
TOTAL			37	1,11	35,49	1,20	60,98	4,46	63,34	

Fonte: Autora.

Nota: Sinal Convencional utilizado:

- Dado numérico inexistente

(1) C – Concentrações de cloro ativo. (2) T – Tempos de imersão. (3) Trat – Tratamentos. (4) Número de explantes responsivos. (5) DP – Coeficiente de Variação.

Na análise do número de brotos por explantes, verificou-se que esta variável foi bastante homogênea na maioria dos tratamentos, evidenciada pela média e coeficiente de variação, apresentados na Tabela 3.

Os tratamentos que apresentaram os maiores valores foram o T9 (1,29), T3 e T5 (1,2) brotos por explante, no qual estes tratamentos foram os únicos que apresentaram mais de um broto por explante. Por isso, estes tratamentos foram os únicos que apresentaram valores para coeficiente de variação. Os demais tratamentos obtiveram média de um broto por explante, demonstrando simetria entre eles, sem dispersão nos dados (coeficiente de variação).

Drefahl (2004), trabalhando com *Rosa x hybrida* cv. Vegas, utilizou concentrações de 1% e 2% de hipoclorito de sódio em conjunto ou não com o etanol 70% por 1 minuto, concluindo que o melhor tratamento foi a maior concentração de NaClO do trabalho (2%) por 5 minutos aliado ao etanol 70% por 1 minuto, o qual apresentou uma menor porcentagem de contaminação (40%) e maiores brotações (15%). Assemelhando-se ao encontrado neste trabalho, no qual o T9 com a maior concentração de NaClO também promoveu as maiores porcentagens para estes parâmetros, aliado a maior número de brotos.

Na avaliação de altura das plântulas, verificou-se que o crescimento *in vitro* foi bastante diversificado, evidenciada pelo alto coeficiente de variação total de 60, 98% (Tabela 3). Os tratamentos T7, T8 e o T9, respectivamente, foram os que apresentaram os maiores valores, coincidindo ou aproximando-se da média geral do grupo, demonstrando que a concentração de 1,25% promoveu o melhor desenvolvimento destes explantes *in vitro*. Esse resultado, possivelmente, ocorreu devido a uma maior desinfestação promovida por esta concentração, o que pode ter favorecido o desenvolvimento das plântulas.

No entanto, os tratamentos com a concentração de 1,25% apresentaram uma maior dispersão dos dados, com o T7 e o T8 liderando com os maiores valores para coeficientes de variação quando comparados com o restante dos tratamentos. Sendo assim, pode-se considerar que o melhor tratamento foi o T9, com menor dispersão dos dados, ou seja, maior precisão, com dados amostrais mais homogêneos em comparação ao T7 e ao T8.

Já os tratamentos que obtiveram a menor média de crescimento foram os tratamentos com a concentração de 0,75% (T2 e T3), seguidos da concentração de 1,00% (T5 e T6), com destaque para o T6 que obteve os maiores valores médios para altura nessa concentração (4,20). Para as duas concentrações, os valores para coeficiente de variação foram menores em relação a concentração de 1,25%, demonstrando uma maior homogeneidade dos dados.

Com relação ao tempo, nota-se que as maiores alturas médias das plântulas foram obtidas nos tempos de 20 e 30 minutos, estatisticamente superiores ao tempo de 10 minutos. A menor altura das plântulas no tempo de 10 minutos se deve a menor desinfestação dos explantes, desfavorecendo o crescimento das plântulas.

Gomes *et al.* (2014), em experimento para comparação no cultivo *in vitro* de segmentos nodais e gemas de plantas de mini-rosas vermelhas desinfetadas com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1,25% por 15 minutos, obtiveram uma maior altura dos explantes para os segmentos nodais e ressaltaram que, provavelmente, estes resultados se devem a uma maior quantidade de reservas hormonais e nutricionais presentes nesses tipos de tecidos vegetais. Por sua vez, Diniz *et al.* (2014), demonstrou que o meio MS com 100% dos sais macronutrientes favoreceu o crescimento *in vitro* de explantes de mini-rosas proporcionando uma maior altura média e peso seco para as plântulas micropropagadas.

No entanto, estes parâmetros descritos pelos autores acima, neste trabalho foram iguais para todos os tratamentos, onde todos contavam com o mesmo tipo de explante e meio nutritivo, o que diferiu foi a desinfestação promovida por cada tratamento. Haja vista que a melhor desinfestação resultou em um maior número de representantes.

As folhas das plântulas de mini-rosas apresentaram desenvolvimento normal quanto a sua forma, tamanho e coloração, diferindo apenas no número de folhas produzidos por broto. Os resultados para esta variável foram submetidos a análise descritiva, apresentados na Tabela 3.

Os tratamentos que possuíam os menores tempos ainda com representatividade (T2, T5 e T7) obtiveram os maiores números médios de folhas, com 4,80, 5,00 e 5,30 respectivamente. Conforme aumenta a concentração, maiores os números de folhas nesses tratamentos (T2, T5 e T7). Quanto a dispersão de dados o T5 e o T7 obtiveram valores altos, com mais de 80% de coeficiente de variação, demonstrando a heterogeneidade dos dados.

Analisando os dados a partir da soma das concentrações, percebe-se que as concentrações de 0,75% e 1,00%, acarretaram em um menor número de folhas devido a maior contaminação nesses tratamentos. De acordo com Souza *et al.* (2014) a contaminação por fungos e bactérias interfere em todos os parâmetros de desenvolvimento dos explantes analisados, tendo em vista que esses microrganismos vão consumir os nutrientes necessários para o crescimento da planta e podem liberar compostos que inibem ou retardam o estabelecimento *in vitro* dos explantes, comprometendo a composição química do meio de cultura.

Os resultados obtidos na concentração de 1,25% com os maiores valores na soma, se devem a uma maior desinfestação dos tratamentos, que possibilitou melhores condições para que os explantes se desenvolvessem, crescessem e conseqüentemente apresentassem um maior número de folhas. As concentrações de 0,75% e 1,00% foram as que apresentaram maior contaminação ao longo do experimento e na avaliação final contavam com poucos

representantes em relação a concentração de 1,25%, sendo este um fator que também influenciou nesse resultado para esta variável.

Por sua vez, na influência do tempo em relação ao número de folhas, foi possível perceber que quanto maior o tempo de imersão no hipoclorito de sódio, menores foram os números de folhas produzidas, com exceção da concentração de 1,25% em que o T8 (20 minutos) e o T9 (30 minutos) ficaram com a mesma média, apesar de T8 ter apresentado uma maior dispersão de dados.

Costa *et al.* (2007), testaram diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,2; 0,4; 0,6 e 0,8%) e tempos de 8; 12; 16 e 20 minutos de imersão para Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), na qual a melhor concentração para a variável número de folhas por broto foi a maior concentração do trabalho, de 0,8% com média de 1,88 folhas. Já o tempo de 20 minutos proporcionou menor número de folhas, coincidindo com o resultado encontrado neste trabalho para concentração e tempo no desenvolvimento de folhas.

Os resultados demonstraram que a concentração e o tempo influenciaram inversamente no número de folhas. Conforme aumentava a concentração, maior o número de folhas produzidas (T2, T5 e T7). E, quanto maior o tempo de imersão, menor o número de folhas produzidas (T3, T6, T8 e T9).

Os calos são um aglomerado de células em proliferação desorganizada, irregularmente diferenciadas, formados a partir de segmentos de tecidos vegetais que sofreram alguma lesão ou em resposta a reguladores de crescimento (TAIZ & ZEIGER, 2009; ABCPT, 2011; SILVA & FERREIRA, 2016).

Observa-se que houve uma tendência de aumento na porcentagem de calos conforme aumentava a concentração de hipoclorito de sódio. A concentração de 1,25% nos tempos de 20 e 30 minutos não diferiram entre si, apresentando a maior porcentagem de calos (20%), enquanto que no tempo de 10 minutos para a mesma concentração houve 10% de calogênese. A segunda maior porcentagem de calogênese foi o tratamento T6 na concentração de 1,00% e tempo de 30 minutos (15%), enquanto o T1, T3 e T4 não apresentaram formação de calos.

Embora a concentração de 1,25% nos tempos de 20 e 30 minutos tenha apresentado o maior número de calos, isso não desfavoreceu o desenvolvimento do explante, onde ocorreu uma maior brotação e altura dos explantes nesses tratamentos (Tabela 3). Estes resultados diferem dos encontrados por Junkes (2015) para *Malus 'Marubakaido'*, que testou diferentes variações nos meios de cultura MS para o estabelecimento, e observou que nos meios MS e MS $\frac{3}{4}$ houve uma maior formação de calos, o que impediu o desenvolvimento dos explantes. Isso

demonstra que, dependendo da espécie com a qual se trabalha, pode ocorrer uma resposta diferente e o meio de cultura utilizado também pode influenciar na formação de calos.

Um outro fator que contribui para a formação dos calos são as concentrações de reguladores de crescimento, que induzem a formação de calos, parte aérea, embriões e raízes (DOBRÁNSZKI *et al.*, 2010). A interação de ANA e BAP é frequente na formação de calos na literatura (SALLES *et al.*, 2017; PIASSI & PIASSO, 2016; ALENCAR, 2015; COSTA *et al.*, 2015; MENDONÇA, *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2014). No entanto, neste trabalho, todos os tratamentos possuíam as mesmas concentrações de ANA e BAP, diferindo somente na concentração e no tempo de exposição ao NaClO. O que possivelmente ocorreu, foi que a maior concentração de hipoclorito de sódio promoveu melhores condições fitossanitárias, conseqüentemente um melhor desenvolvimento da planta e maior porcentagem de calos.

6. CONCLUSÃO

A concentração de 1,25% de hipoclorito de sódio associada ao tempo de 30 minutos de exposição, resultou na maior porcentagem de assepsia dos segmentos nodais de mini-rosas, bem como na maior sobrevivência e menor ocorrência de necrose dos explantes. Proporcionou também as melhores condições para o estabelecimento *in vitro* e desenvolvimento dos segmentos nodais de mini-rosas, promovendo um maior número de brotos, altura de plântulas e explantes responsivos.

Houve formação de calos ao longo do experimento, independentemente da concentração e do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio.

Ressalta-se que a desinfestação dos explantes foi satisfatório, já que planta matriz utilizada foi proveniente do campo e não passou por um pré-tratamento de assepsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, D. R. C. Calogênese e regeneração in vitro de brotos a partir de raiz, entrenó e disco foliar de *brosimum gaudichaudii* tréc. (moraceae). **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 8, 2015.
- ALMEIDA, N. M.; PACHECO JUNIOR, R. G.; CÉZAR, J. O.; GONÇALVES, H. A.; SOUZA, A. S. **Produção de mudas micropropagadas de mandioca (Manihot esculenta Crantz) em larga escala: uma inovação tecnológica**. In: Congresso Brasileiro De Mandioca, 16; Congresso Latino-Americano E Caribenho De Mandioca, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: SBM, CD-ROM, 2015.
- ARAÚJO, E. F.; BARBOSA, J. G.; PIVETTA, K. F. L. Sementes: Germinação e Dormência. In: BARBOSA, J. G.; LOPES, L. C. (Ed.). **Propagação de plantas ornamentais**. Viçosa: Ed. UFV, p. 16-42, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS (ABCTP). Cultura de Células & Micropropagação de Plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagatior**. Lavras, v.7, n.1, p. 1-60, 2011
- BARBIERI, Rosa L.; STUMP, F., Elisabeth R. T. Origem, evolução e história das rosas cultivadas. **Revista brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n. 3, p. 267-271, jul-set, 2005
- BARBOSA, J. G.; LOPES, L. C.; GROSSI, J. A. S.; MAPELI, A. M. Propagação vegetativa artificial. In: BARBOSA, J. G.; LOPES, L. C. (Ed.). **Propagação de plantas ornamentais**. Viçosa: Ed. UFV, p. 110-144, 2011.
- BELTRAME, H. S. **Micropropagação de clones híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata* e *C. sativa* x *C. molíssima* para estudos de resistência a *Phytophthora cinamom***. 2013. Tese (Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal) - Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- BEZERRA, M. E. **Estudo da colonização micorrízica arbuscular no desenvolvimento de minirosa em um neossolo quartzarênico no município de Eusébio-CE**. 2011. Tese (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará.
- BHARADWAJ, R., SINGH, S. K., SURINDER, P., SURENDRA, K. AN Improved Protocol for a Micro-propagation of Miniature Rose (*Rosa chinensis* Jacq. Var. Minima) Cultivas. **Journal of Ornamental Horticulture**, Indian, v.9, n. 4, p. 238-242, 2006.
- BOETTCHER, A. **Sítios e jardins: rosas**. São Paulo: Editora Europa, p. 87, 1991.
- BOSKABADY, M. H., SHAFEI, M. N., SABERI, Z., & AMINI, S. Pharmacological effects of Rosa damascena. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 295-307, 2011.
- BROERTJES, C., VAN HARTEN, A. M. (Eds.). Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. **Developments in Crop Science**, Amsterdam, v.12, p. 197- 204, 1988.
- CAI, Y. Z., XING, J., SUN, M., ZHAN, Z. Q. & CORKE, H. Phenolic antioxidants hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-

TOF MS from *Rosa chinensis* flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(26): 9940-8, 2005.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, p.45, 2010.

CARVALHO, A.C.P.P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.7, p.30-60, 2011.

CARVALHO, J. M. F. C. **Aplicacion de las tecnicas de cultivo in vitro em la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L)**. 1996. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) – Departamento de Biologia Vegetal, Escuela Tecnica Superior de Ingenieros Agronomos de la Universidad Politecnica de Madrid, Madrid.

CARVALHO, J. M. F.; SILVA, M. M.; MEDEIROS, M. J. **Fatores Inerentes À Micropropagação**. Campina Grande-PB: Embrapa Algodão, p. 11-18, 2006.

CAVALCANTE JÚNIOR, J. A.; AZEVEDO, B. M.; SOUSA, G. G.; VASCONCELOS, D. V.; ARAÚJO VIANA, T. V.; REBOUÇAS NETO, M. O. Manejo da irrigação na cultura da roseira em ambiente protegido. **Revista Brasileira De Agricultura Irrigada**, v. 7, n. 4, p. 269-276, 2013.

CID, P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília-DF: Embrapa, 3. ed. ampl., p. 4-12, 2014.

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO (CEAGESP). **Mini Rosa**. 2016. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/produtos/mini-rosa/>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

CONDE, P.; SOUSA, A.; COSTA, A.; SANTOS, C. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 113-119, 2008.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B., AMANCIO, V. F., LEDO, A. S. Estabelecimento de Alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 68-72, 2007.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; J. H. S. SILVA, J. H. S.; TORRES, M.F.; SANTOS, O. N. A.; BLANK, A. F. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. **Scientia Plena**, v. 11, n. 01, 2015.

DIAS, G. M.; SIGRIST, J. M. M.; CIA, P.; HONÓRIO, S. L. Wet and dry storage of cut roses. **Ornamental Horticulture**, v. 22, n. 2, p. 166-171, 2016.

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 Agrônômica**, v. 39, n. 1, 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 Agrônômica**, v. 45, n. 1, p. 68-73, jan-mar, 2014.

DOBRÁNSKI, J.; SILVA, J. A. T. *Micropropagation of apple - A review*. **Biotechnology Advances**. Vol. 28, p. 452-488, 2010.

DREFAHL, A. **Organogênese de rosa x híbrida cv. vegas**, Curitiba, 2004. 88 f. Tese (Mestrado em Ciências Agrárias) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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, n.18; p. 2112, 2014.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**. v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FABRIS, D.; GERBER, T.; SARTORETTO, L. M. Desinfestação, germinação e micropropagação in vitro de Apuleia leiocarpa (Vogel) Macbride. **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 3, p. 17-26, 2016.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p. 109-120, 2011.

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P. **Podridões em estacas de Roseira, Minirrosas e Mussaendras no Estado do Ceará**. Fortaleza, CE: EMPRABA. (Comunicado Técnico 129), 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C., CALDAS, L. S., BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, v. 1, p. 183-260, 1998.

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, n. 1, p. 77-82, 2013.

GOMES, G.B.; ROCHA, P.S.G.; FREITAS, F.B.R.; MENEGATTI, 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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **O mercado de flores no Brasil (BOLETIM INFORMATIVO DO)**, São Paulo- Campinas, 2017.

JOBIM, L. H.; STEFENON, V. M.; JUNGES, M.; RISPOLI, R. G.; SILVA, P. R. D. **Verificação da desinfestação de explantes na multiplicação da Eugenia uniflora L. (Myrtaceae)**. In: ANAIS DO SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, v. 5, n. 2, 2013, Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, 2013.

JUNKES, C. F. O. **Estudos Preliminares Para Micropropagação De Malus Prunifolia Cv. Marubakaido Em Sistema De Imersão Temporária**. 2015. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Hortica Consultoria e Treinamento**, São Paulo. 2014.

KIYAMA, C.Y., BIANCHINI, R. S. 2003. Rosaceae. In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M., Kirizawa, M. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, vol. 3, p. 285-294, 2003.

KOLE, C. **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Plantation and Ornamental Crops**. Berlim: Springer, p. 245-146, 2011.

KUMUD, S., HEM, P.; VIJAY, R. Micropropagation of Rose Cultivars: Biotechnological Application. **Journal of Environmental Research And Development**, v.10, n. 01, 2015.

MARTIN, C. **Plant breeding in vitro**. Endeavour, p. 81-6, 1985.

MARTINS, R. C.; LORENZETTI, E. R.; GONÇALVES, F. C.; CANDIAN, J. S. PEREIRA, N. C. Agentes desinfestantes no processo de micropropagação da amora preta (*rubus* ssp). **REVISTA MIRANTE**, Anápolis (GO), v. 10, n. 2, jul. 2017.

MENDONÇA, J. O; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S.; CARVALHO, M. J. S. **Reguladores de crescimento ANA e BAP na micropropagação de espécie silvestre de mandioca *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman**. In: Jornada Científica- EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, IX, 2015, Cruz das Almas-BA:EMBRAPA, 2015.

MORAES, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.350-355, 2014.

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.

NADHA, H. K.; SALWAN, R.; KASANA, R. C.; ANAND, M.; SOD, A. Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 30, p. 93-97, 2012.

NEVES, M. F; PINTO, M. J. A. **Mapeamento e Quantificação da Cadeia de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil**. 1 Ed. São Paulo: OCESP, p. 40-41, 2015.

OLIVEIRA, E. C.; ASSUNÇÃO CARVALHO, J. de; ALMEIDA, E. F. A.; REZENDE, F. C.; REIS, S. N.; MIMURA, S. N. Rendimento de rosas cultivadas em ambiente protegido sob diferentes níveis de irrigação. **Irriga**, v. 21, n. 1, p. 14-24, 2016.

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**. Jaboticabal, volume especial, p. 222-226, 2011.

PIASSI, M.; PIASSI, M. OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA CALOGÊNESE *IN VITRO* EM FOLHAS COTILEDONARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.). **Revista Científica Intelletto**, v. 2, n. 2, p.135-142, 2016.

POTTER, D.; ERIKSSON, T.; EVANS, R. C.; OH, S.; Smedmark, J. E.E.; MORGAN, D. R., KERR, M.; ROBERTSON, K. R.; ARSENAULT, M.; DICKINSON, T. A. and CAMPBELL, C. S. Phylogeny and classification of Rosaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 266, p. 5–43, 2007.

PRATA, G. G. B.; SOUZA, K. O. de; LOPES, M. M. A.; OLIVEIRA, L. S.; ARAGAO, F. A. S.; ALVES, R. E.; SILVA, S. M. Nutritional Characterization, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Brazilian Roses (*Rosa* spp). **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, p. 929-941, 2017.

RESENDE, W. T.; TOLEDO, M. Especialização regional produtiva em Barbacena (MG) e municípios vizinhos: o cultivo das rosas. **Caderno de Geografia**, v. 24, n. 1, p. 179-190, 2014.

SALLES, E. A. P. B., ALCANTARA, G. B., QUOIRIN, M. G. G.; GONÇALVES, A. N.; HIGA, A. R. Desinfestação e introdução in vitro de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, p. 485-491, out./dez. 2017.

SANTOS, M. R. A. dos; CHAGAS, S. E. da S.; GUIMARÃES, M. de C. M. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico**, v. 4, n. 2, p. 15-23, 2015.

SCARANARI, C.; LEAL, P. A. M.; PELEGRINO, G. Q. Estudo de simulações de microclimas em casas de vegetação visando à aclimação de mudas micropropagadas de bananeira cv grande naine. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 4, p. 1001-1008, dez. 2008.

SEBRAE. 2015. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Flores e plantas ornamentais do Brasil** (série estudos mercadológicos), São Paulo, v. 1, p. 9-34, 2015.

SEBRAE. **Balanco Comercial da Floricultura Brasileira. Flores e plantas ornamentais do Brasil** (série estudos mercadológicos), São Paulo, v. 2, p. 73-77, 2015.

SILVA, W. **Cultivo de rosas no Brasil**. 4 ed. São Paulo: Nobel, p. 7, 1987.

SILVA, L. C. **Germinação, estabelecimento e multiplicação in vitro de *Dipteryx alata* VOGEL e *Eugenia dysenterica* DC., Espécies frutíferas do cerrado**. 2012. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

SILVA, I. M. C. **Cultivo in vitro de *Pyrus* sp., cultivares Carrick, Cascatense e Ya-Li**. 2013. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SILVA, T. L., PEREIRA, M. A. A., SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Propagação in vitro de sacaca (*Croton cajucara* Benth.): entendimentos sobre a diiculdade no desenvolvimento de protocolos de micropropagação da espécie. **Biotemas**, v. 28, n. 4, p. 43-50, 2015

SILVA, M. M. A.; FERREIRA, L. T. Cultivo in vitro de Plantas e suas Aplicações em Cactáceas. **Instituto Nacional do Semiárido**. Campina Grande-PB, p. 32. 2016.

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.; SIA, E. F. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Rosa sp.* **Revista Agroecossistemas**, v. 9, n. 2, p. 370-380, 2017.

SILVESTRE, S.; MONTSERRAT, P. Rosa. In: SCASTROVIEJO. et al. Flora iberica: plantas vasculares de la Peninsula Iberica e Islas Baleares. Madrid: **Real Jardín Botánico**, v. 6, p. 592, 2001.

SMITH, J. Micropropagation of the Gynea Lily: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. **Kingston: RIRDC**, p. 59, 2000.

SOUZA, A. V. V.; SANTOS, M. C.; SOUZA, M. D.; LARANJEIRA, L. R. **Protocolos de Assepsia para o Estabelecimento In Vitro de Espécies Mediciniais Nativas da Caatinga**. Petrolina, EMBRAPA-SEMIÁRIDO, 2014. (EMBRAPA-SEMIÁRIDO. Comunicado Técnico, 160). 2014.

SOUZA, L. S.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.berg) D. legrand. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 691-697, sep. 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 3. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 316-317, 2012.

SOUZA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, W. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação microbiana na Propagação *in vitro* de *Cttleya walkeriana* e *Schum burkiacrispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, c.5, p. 405-407. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 848, 2009.

TASCHNER, L. **ROSES**. África do Sul: Struik Publishers. p. 56, 2001.

TERRA, S. B.; ZÜGE, D. P. P. de O. Floricultura: A produção de flores como uma nova alternativa de emprego e renda para a comunidade de Bagé - RS. **Revista Conexão UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 342-353, 2013.

TOLEDO, C. P. **Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar**. 2011. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TRIPATHI, S. C. & OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R. **Clonagem Vegetal**. Anais... da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, vol. 7, p.86-91, 2010.

WARDROP, J.; LOWE, K. C.; DAVEY, M. R.; MARCHANT, R.; POWER, J. B. Carbon dioxide-gassed fluorocarbon enhances micropropagation of rose (*Rosa chinensis* Jacq.). **Plant Cell Reports**, p. 17–21, 1997.

WISSEMANN, V. Conventional taxonomy of wild roses. In: Roberts A, Debener T, Gudin S, eds. **Encyclopedia of rose science**. London: Elsevier, p. 111–117, 2003.

YAN, M.; BYRNE, D.H. and JING, C. Propagation of rose species *in vitro*. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, 32: 103-108, 1996.

ZATTA, M. **A farmácia da Natureza**. 2 ed. Porto Alegre: Gráfica Dom Bosco. p. 99, 1993.

ZENG, S. J.; ZHANG, Y. Y.; WU, K. L.; SILVA, J. A.; DUAN, J. *In vitro* flowering red miniature rose. **Biologia Plantarum**, Kagawa, v. 57, n. 3, p. 401-409, 2013.