

Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: Vanilloideae)

Cristiano Pedroso-de-Moraes^{1,4}, Thiago de Souza-Leal¹, Alan Rodrigo Panosso² e Marcelo Claro de Souza³

Recebido em 11/10/2011. Aceito em 19/06/2012

RESUMO

(Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: Vanilloideae)). *Vanilla planifolia* é uma espécie com grande valor comercial, porém sua propagação é dificultada devido à baixa germinação de suas sementes. No presente estudo procurou-se avaliar a influência da escarificação destas sementes por meio da imersão em H₂SO₄ concentrado durante 60, 120 e 180 segundos, bem como de diferentes concentrações de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas. Sessenta segundos de escarificação e 25% de nitrogênio no meio de cultura proporcionaram os melhores resultados sobre a germinação e desenvolvimento de *V. planifolia*, constituindo-se em um procedimento viável para a produção comercial dessa espécie.

Palavras-chave: Baunilha, orquídea, sementes, propagação *in vitro*

ABSTRACT

(Effect of chemical scarification and concentration of nitrogen on the germination and *in vitro* development of *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: Vanilloideae)). *Vanilla planifolia* is a species with a large commercial value; however, it is difficult to propagate due to low seeds germination. In the present study we aimed to evaluate the influence of scarification of the seeds by soaking them in concentrated H₂SO₄ for 60, 120 and 180 seconds, as well as different concentrations of nitrogen, on germination and plant development. Sixty seconds of scarification and 25% nitrogen in the culture medium provided the best results for germination and is a viable procedure for the commercial production of this species.

Key words: *In vitro* propagation, orchid, seeds, Vanilla

Introdução

Baunilheira é o nome popular dado a diversas espécies do gênero *Vanilla* Plum. ex Mill., nas quais o desenvolvimento inicial de seus representantes ocorre como ervas sarmentosas, que posteriormente adquirem o hábito hemiepífito. Os caules das espécies apresentam-se cilíndricos, suculentos, nodosos e podem atingir até 20 m de comprimento, encontrando-se sempre fortemente fixados a seus forófitos por meio de inúmeras raízes adventícias (Hoehne 1945).

No Brasil, *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews representa grande potencial econômico, devido à qualidade e o elevado

teor de vanilina produzida em seus frutos (Pedroso-de-Moraes & Fontana 2005; Kalimuthu *et al.* 2006), bem como ao fato de vários pontos do Brasil apresentarem condições edafoclimáticas favoráveis para sua produção e possível exportação (Bicalho 1969). O aroma de baunilha, ou seja, a vanilina é obtido da planta na forma de gluco-vanilina, na proporção de 2% em peso. A fonte natural da gluco-vanilina, o fruto da baunilha, atualmente fornece 20 das 12.000 toneladas consumidas anualmente, o equivalente a cerca de 0,2% da produção nacional (Berger 2000). Apesar da produção de baunilha representar um processo trabalhoso e de alto custo, apresenta-se rentável, uma vez que a

¹ Centro Universitário Hermínio Ometto, Araras, SP, Brasil

² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jabotical, SP, Brasil

³ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Botânica, Rio Claro, SP, Brasil

⁴ Autor para correspondência: pedroso@uniararas.br

vanilina de extrato natural chega a atingir US\$ 4.000 por kg no mercado mundial (Daugsch & Pastore 2005).

Os frutos maduros desta espécie são cápsulas siliquiformes de coloração pardo-escuro (pré-secagem) ou preta (pós-secagem), suculentas e úmidas ao tato, contendo milhares de sementes pequenas e pretas (Corrêa 1984), de diferentes tamanhos, mas com semelhante potencial germinativo e de desenvolvimento (Arditti & Ernest 1992). Apesar de pequenas, tais sementes enquadram-se entre as maiores dentro das Orchidaceae, podendo ser contadas à vista desarmada (Kalimuthu *et al.* 2006).

A propagação da baunilha, em âmbito mundial é realizada por estaquia, pois a germinação de sementes de *Vanilla* spp., assim como da grande maioria das Orchidaceae, é extremamente baixa ou quase nula em condições naturais (Kalimuthu *et al.* 2006). Não obstante, para orquídeas em geral, podem ser obtidas elevadas taxas de germinação quando germinadas assimbioticamente desde que em meios de cultura adequados (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a; b).

Pesquisas sobre a germinação assimbiótica de espécies de *Vanilla* spp. (Knudson 1950; Lugo 1955; Knorr *et al.* 1997), indicam a existência de dois fatores limitantes à germinabilidade e desenvolvimento das mesmas: a permeabilidade do tegumento e a concentração de sais nitrogenados nos meios. Contudo, na literatura, tais fatores não foram estudados de forma conjunta, demonstrando a necessidade da realização de trabalhos envolvendo escarificação e diminuição nas concentrações de sais nitrogenados conjuntamente, visando à otimização de produção destas plantas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização da escarificação química de sementes de *Vanilla planifolia*, bem como a redução da concentração de nitrogênio no meio de cultura visando à produção de mudas da espécie.

Material e métodos

Em abril de 2009, cinco flores de diferentes indivíduos de *Vanilla planifolia* cultivados sob tela de sombreamento 50%, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $236 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em casa de vegetação do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, Araras, São Paulo, foram autopolinizadas e suas sementes foram coletadas após seis meses.

Sementes de *Vanilla planifolia* intactas (controle) e escarificadas em diferentes períodos de exposição ao ácido sulfúrico concentrado (60, 120 e 180 segundos) (Tab. 1), foram pré-embebidas em água destilada por 24 horas.

Posteriormente, foram lavadas em água corrente por três vezes e desinfestadas utilizando hipoclorito de sódio a 5% com duas gotas de detergente comercial, sob agitação durante cinco minutos em tubos Eppendorf®. Em seguida, os tubos contendo as sementes foram mergulhados em álcool 70% e levados à câmara de fluxo laminar, onde foram lavadas em água destilada autoclavada por quatro vezes com o auxílio de seringa de 1 mL esterilizada (Arditti & Ernst 1992).

Em ambiente estéril, as sementes foram depositadas, juntamente com 1 mL de água destilada autoclavada, em placas de Petri (12 cm), como descrito por Arditti & Ernest (1992), as quais continham o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) em sua formulação original e com modificações quanto à concentração de seus sais nitrogenados: nitrato de amônia (NH_4NO_3) e nitrato de potássio (KNO_3). Estes aparecem no meio de cultura em concentrações de 20 mg.L^{-1} na formulação original (100%), alterando-se, portanto, para 10 mg.L^{-1} quando reduzidos pela metade (50%) e 5 mg.L^{-1} reduzidos a 1/4 da formulação original (25%). As placas semeadas foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D., por 120 dias a 25 ± 2 °C no escuro, devido a essa espécie ser fotoblástica negativa (Lugo 1955).

O monitoramento diário da germinação foi realizado sob luz verde de segurança, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram folhas a partir de protocormos visíveis “a olho nu”. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da germinabilidade (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG) (Labouriau & Agudo 1987). O delineamento experimental utilizado foi do tipo inteiramente casualizado com quatro repetições de 250 sementes cada, compondo assim esquema fatorial 4x3 com quatro repetições.

Na segunda etapa, foi avaliado o desenvolvimento de plântulas a partir das sementes germinadas nos diferentes tratamentos da primeira etapa. Em ambiente estéril, sessenta plântulas por tratamento foram transferidas aleatoriamente

Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais de sementes e plântulas de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. submetidas a diferentes períodos de exposição em H_2O , escarificação em H_2SO_4 e concentrações dos sais nitrogenados do meio de cultura MS, expressas em percentagem.

Tratamentos	Descrição dos tratamentos
1	60s. H_2O + 25% meio MS
2	60s. H_2O + 50% meio MS
3	60s. H_2O + 100% meio MS
4	120s. H_2O + 25% meio MS
5	120s. H_2O + 50% meio MS
6	120s. H_2O + 100% meio MS
7	180s. H_2O + 25% meio MS
8	180s. H_2O + 50% meio MS
9	180s. H_2O + 100% meio MS
10	60s. de escarificação em H_2SO_4 + 25% meio MS
11	60s. de escarificação em H_2SO_4 + 50% meio MS
12	60s. de escarificação em H_2SO_4 + 100% meio MS
13	120s. de escarificação em H_2SO_4 + 25% meio MS
14	120s. de escarificação em H_2SO_4 + 50% meio MS
15	120s. de escarificação em H_2SO_4 + 100% meio MS
16	180s. de escarificação em H_2SO_4 + 25% meio MS
17	180s. de escarificação em H_2SO_4 + 50% meio MS
18	180s. de escarificação em H_2SO_4 + 100% meio MS

para quatro recipientes de vidro esterilizados, com volume de 250 mL contendo 50 mL do mesmo meio de cultura utilizado durante a germinação, totalizando, assim, 15 plântulas por frasco (Pedroso-de-Moraes *et al.* 2009a,b). Estes foram fechados com tampa plástica transparente e mantidos em B.O.D. a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de aproximadamente $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 120 dias.

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos: altura das plântulas (AP), número de raízes (NR), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) total, comprimento da maior raiz (CR) e da maior folha (CF). Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, para comparação das médias, utilizou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo utilizada a transformação

em $A_{sen} \sqrt{\frac{(\%G + 5,0)}{100}}$ para as avaliações referentes ao percentual germinativo (Zar 1999).

Resultados e discussão

De modo geral, todas as características avaliadas apresentaram resultados semelhantes, sendo os melhores verificados no tratamento representado pelo menor período de escarificação, associado à menor concentração de sais nitrogenados (NH_4NO_3 e KNO_3) em meio de cultura MS

(5 mg.L^{-1} ou 25% da formulação original) para desenvolvimento das plântulas (Tab. 2).

Em relação ao percentual germinativo foi observado um máximo de 64% para 60 segundos de escarificação em H_2SO_4 associada a 25% de NH_4NO_3 e KNO_3 no meio, diferindo significativamente dos demais tratamentos, bem como o menor percentual (6,5%) foi obtido pela escarificação por 180 segundos e a totalidade de sais nitrogenados no meio de cultura (20 mg.L^{-1}). Os testes envolvendo apenas pré-embebição das sementes de *Vanilla planifolia* em água destilada por 24h, seguido por semeadura em meio MS a 100, 50 e 25% da concentração de sais nitrogenados, obtiveram percentuais germinativos de 5%, sugerindo que o H_2SO_4 tanto pode interferir de forma positiva como negativa sobre a germinação das sementes dessa espécie, dependendo do tempo de exposição.

É amplo o uso de ácidos em experimentos de germinação de sementes das mais variadas espécies (Medeiros-Filho *et al.* 2005; Alves *et al.* 2007; Dutra *et al.* 2007; Dutra & Medeiros-Filho 2009). Porém, esse método, mesmo em baixas concentrações, pode não ser eficiente para a superação de dormência em algumas espécies vegetais, em razão de alguns tegumentos apresentarem certa porosidade, o que permite a absorção rápida dos ácidos, causando efeito deletério ao embrião (Alvarenga *et al.* 2007) como observado em *Chrysophyllum albidum* G. Don., no qual foi verificada uma relação inversamente proporcional entre o período

Tabela 2. Interação entre período de exposição em H_2O , escarificação em H_2SO_4 e concentração de sais nitrogenados no meio de cultivo MS em sementes e plântulas de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr.

Tempo	Meio de Cultivo							
	H_2O	25%	50%	100%	H_2O	25%	50%	100%
	Germinação (%)				IVG			
60 s.	0,05 Ad ¹	0,13 Aa	0,11 Ab	0,09 Ac	0,10 Ad	1,56 Aa	0,99 Ab	0,52 Ac
120 s.	0,05 Ad	0,10 Ba	0,09 Bb	0,08 Bc	0,09 Ad	0,83 Ba	0,39 Bb	0,24 Bc
180 s.	0,05 Ad	0,09 Ca	0,08 Cb	0,07 Cc	0,09 Ad	0,30 Ca	0,20 Cb	0,15 Cc
CV (%)		0,31				0,89		
	Número de raízes				Comprimento radicular (cm)			
60 s.	1,15 Ad	4,75 Aa	3,75 Ab	2,75 Ac	0,35 Ad	4,40 Aa	3,18 Ab	1,33 Ac
120 s.	1,05 Bb	3,25 Ba	3,25 Ba	2,75 Ba	0,12 Bd	4,33 Aa	3,03 Ab	1,13 Ac
180 s.	0,05 Cc	2,75 Ca	1,75 Cb	1,25 Cb	0,01 Cd	4,25 Ba	2,98 Bb	1,03 Bc
CV (%)		17,14				6,06		
	Altura das plântulas (cm)				Comprimento foliar (cm)			
60 s.	1,12Ad	6,40 Aa	5,18 Ab	3,32 Ac	0,52 Ac	1,45 Aa	1,45 Aa	0,92 Ab
120 s.	1,11 Ad	6,30 Ba	5,03 Bb	3,13 Bc	0,45 Bd	1,42 Ba	1,33 Bb	0,90 Bc
180 s.	0,08 Bd	5,98 Ca	4,96 Cb	3,05 Cc	0,38 Cd	1,39 Ca	1,12 Cb	0,88 Cc
CV (%)		1,22				1,51		
	Matéria fresca (g)				Matéria seca (g)			
60 s.	0,03 Ab	0,27 Aa	0,24 Aa	0,07 Ab	0,003 Ad	0,022 Aa	0,019 Ab	0,007 Ac
120 s.	0,01 Bc	0,22 Ba	0,20 Ba	0,04 Bb	0,003 Ad	0,020 Ba	0,008 Bb	0,007 Bc
180 s.	0,01 Bc	0,13 Ca	0,08 Cb	0,02 Cc	0,001 Bc	0,005 Ca	0,002 Cb	0,002 Cb
CV (%)		12,23				4,85		

de exposição ao ácido sulfúrico associado ao aumento de sua concentração e o percentual germinativo, sendo que maiores concentrações e tempos de exposição ao ácido, geraram menores percentuais germinativos, devido às lesões ocorridas nos embriões (Aduradola *et al.* 2005).

São escassos na literatura trabalhos envolvendo a escarificação e a germinação de sementes de plantas epífitas. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho (Tab. 2) corroboram os observados em sementes de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Gaud.) Mez. (Pompelli 2006), *Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult. f. (Angelim *et al.* 2007), *Echinopsis rhodotricha* Schütz e *Echinopsis calochlora* K. Schumann (Alcântara *et al.* 2008; Yule & Dias 2009), nas quais o aumento do período de exposição ao ácido sulfúrico resultou na redução da germinabilidade devido às lesões causadas aos embriões pela permeabilidade concedida pela delgada espessura dos tegumentos das sementes destas espécies e de *V. planifolia* (Porrás-Alfaro & Bayman 2007).

Em meios nutritivos utilizados para germinação e crescimento, são incluídos os mais exigidos elementos minerais pelas plantas, sendo tais elementos utilizados na forma de sais inorgânicos, podendo o nitrogênio ser adicionado como componente de suplementos orgânicos (Caldas *et al.* 1998), pois tal elemento contribui de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do seu potencial osmótico sendo o principal componente em quantidade de meios de cultura (Nagao *et al.* 1994).

Em condições naturais, as orquídeas epífitas encontram sua pequena fonte de nutrientes na atmosfera, podendo resultar de deposição seca ou úmida. No último caso, os nutrientes ficam disponíveis às plantas por meio da água de chuva, da água de gotejamento, isto é, aquela que atravessa o dossel, e da água de escoamento do caule, sendo que o nitrato e o amônio, oriundos do escoamento do caule, são as principais fontes de nitrogênio para as epífitas (Endres & Mercier 2000).

O desenvolvimento é influenciado pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido (George & Sherrington 1984). Dessa forma, altas concentrações de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) podem ser críticas no processo de crescimento de plântulas (Sakuta *et al.* 1987), sendo que tais constatações estão relacionadas com a própria função metabólica do nitrogênio, como constituinte de aminoácidos, enzimas e proteínas. No presente trabalho os tratamentos contendo 25% de sais nitrogenados pelo meio MS, apresentaram os maiores percentuais germinativos assim como observado para *Cattleya loddigesii* Lindl., onde a diminuição do N total em meio de cultura WPM para 1/3, foi responsável pelo aumento na produção de plântulas germinadas *in vitro* (Araújo *et al.* 2009).

Outras características importantes a serem avaliadas, levando em consideração o vigor das plântulas, mediante propagação *in vitro* para produção de mudas comerciais, seriam as características visuais do produto como altura das plântulas, comprimento foliar e radicular e número de raízes,

características essas que foram severamente comprometidas ao cultivar essas plântulas no meio MS nas concentrações de 50 e 100% de sais nitrogenados, sugerindo que a espécie apresenta algum tipo de inibição no seu desenvolvimento quando expostas a elevadas concentrações de N, devido a alterações nos mecanismos responsáveis pela formação de massa seca e acúmulo de água para formação da massa fresca (Tab. 2), assim como observado para *Vanilla fragrans* (Salisb.) Ames (Knudson 1950) e *V. planifolia* (Lugo 1955), germinadas em meio Knudson B o qual apresenta menores concentrações de sais nitrogenados que o meio MS (Murashige & Skoog 1962). Contudo, mesmo que o meio MS tenha sido desenvolvido inicialmente para o uso em cultivo de tecido de tabaco, o mesmo tem sido muito efetivo como substrato nutritivo para muitas espécies de orquídeas. Este meio apresenta altos níveis de nitrogênio em relação a outros meios utilizados para o cultivo *in vitro* de orquídeas, além de possuir menor percentual de nitrato de amônio em relação a outros meios de cultivo (Rodríguez *et al.* 2005). Apesar dos bons resultados em germinação e regeneração (Knudson 1946; George *et al.* 1987; Griesbach 2002) na utilização do meio de cultivo MS ainda não foram padronizadas as concentrações ideais para os muitos genótipos existentes (Krikorian 1991). A avaliação do desenvolvimento do sistema radicular de *Cattleya nobilior* Reichb. f. e das bromélias *Pitcairnia flammula* Lindl. e *Vriesea philippocoburgii* Wawra constataram que em concentrações decrescentes de sais nitrogenados o desenvolvimento do sistema radicular de tais espécies foi favorecido (Mercier & Kerbaux 1991; Araújo *et al.* 2005), assim como observado para *V. planifolia* neste trabalho (Tab. 1, 2) onde os melhores resultados foram obtidos pela escarificação por 60 segundos e 25% da carga de sais nitrogenados no meio de cultura (5 mg.L^{-1}).

Quanto às variáveis, altura das plantas (AP), comprimento da maior folha (CF), peso da matéria fresca (MF) e peso da matéria seca (MS) os resultados obtidos podem ser explicados pela existência de uma relação quadrática explicitada no desenvolvimento de plântulas ocorrente em meios de cultivo com relação às fontes de nitrogênio nítrico e amoniacal. O aumento da concentração de nitrogênio nítrico e a diminuição da de nitrogênio amoniacal, gera incremento quadrático principalmente na variável biométrica altura de plântulas (Bernardi *et al.* 2004). O mesmo foi observado em pesquisas envolvendo orquídeas terrícolas do gênero *Cymbidium*, nas quais foram constatadas que doses diferentes das duas fontes de nitrogênio, principalmente dosagens decrescente de nitrogênio amoniacal, influenciaram positivamente no desenvolvimento de AP, CF, MF e MS (Wen & Hew 1993; Pan & Chen 1994; Powell *et al.* 1988).

Muitas espécies de orquídeas apresentam alterações no padrão vegetativo pela ação de diferentes concentrações de nitrogênio, podendo influenciar significativamente a síntese de citocininas endógenas, como observado para *Epidendrum fulgens* Brongn. (Mercier & Kerbaux 1991). Para a orquídea *Cattleya cinnabarina* (Bateman ex Lindl.) Van der Berg em trabalho envolvendo diferentes compo-

sições de meio de cultivo, foram observados resultados satisfatórios no cultivo *in vitro* em meio MS a 50% da concentração de macronutrientes (Stancato & Faria 1996). O mesmo foi observado para *Catasetum fimbriatum* Lindl., onde os maiores índices de matéria fresca, matéria seca, e comprimento de plântulas se deram pela utilização de meio de cultivo MS a 50% da concentração de macronutrientes em comparação aos meios à base de fertilizantes NPK (Rego-Oliveira & Faria 2005), assim como observado para as mesmas variáveis analisadas neste trabalho para o meio de cultivo MS a 50% da concentração de sais nitrogenados (Tab. 2). E para *Oncidium baueri* Lindl. as análises biométricas relativas à altura da parte aérea indicaram melhores resultados com a utilização do meio de cultivo MS a 50% da concentração de macronutrientes, com adição de 40 g.L⁻¹ de sacarose (Sorace *et al.* 2008), resultado semelhante ao encontrado neste trabalho para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento da maior folha (CMF).

Nesse ínterim, vale citar que a redução do KNO₃ leva, além do nitrogênio, também a diminuição da quantidade de potássio, nutriente essencial aos vegetais, fator que pode prejudicar o desenvolvimento das plântulas. Pasqual (2001) sugere que há uma correlação entre esse elemento e o fósforo e Malavolta *et al.* (1997) afirma que a absorção de um dado nutriente pode ser influenciada por outro, sendo que a deficiência no meio de cultura conduz a hiperidricidade e ao decréscimo na taxa de absorção de fosfato. Porém, o meio MS é conhecido por conter altas taxas de potássio (Rodríguez *et al.* 2005), e oferece como fontes deste, além do KNO₃, outros dois sais: KH₂PO₄ e KI, sendo que nenhum destes teve suas concentrações alteradas no presente estudo. Diante disso, possivelmente o KH₂PO₄ e KI foram suficientes para suprir satisfatoriamente as necessidades das sementes e plântulas de *V. planifolia*, uma vez que a melhor concentração para tal espécie foi aquela com 25% da concentração total de KNO₃ e NH₄NO₃.

Conclusão

A escarificação de sementes de *Vanilla planifolia* com ácido sulfúrico concentrado durante 60 segundos, associada à presença de 5 mg.L⁻¹ de sais nitrogenados no meio MS (25% da carga total) proporcionou os melhores resultados de germinabilidade, velocidade de germinação e crescimento, constituindo assim em um processo factível para aumentar a produção comercial desta espécie de orquídea.

Referências bibliográficas

Aduradola, A.M.; Adeola, B.F. & Adedire, M.O. 2005. Enhancing germination in seeds of African star apple, *Chrysophyllum albidum* (G. Don). **Journal of Food-Agriculture and Environment** 3: 292-294.

Alcântara, N.V.; Menegucci, Z.R.H.; Scremin-Dias, E. & Garcia, J.S. 2008. Germinação, caracterização morfológica de frutos, sementes e desenvolvimento inicial de Cactaceae do Chaco de Porto Murtinho/MS. **GeoPantanal** 1: 12-21.

Alvarenga, A.A.; Abrahao, E.; Carvalho, V.L.; Silva, R.A.; Fraguas, J.C.; Cunha, R.L.; Santa-Cecilia, L.V.C. & Silva, V.J. 2007. Marmelo (*Cydonia oblonga* Mill e *Chaenomeles* spp.). Pp. 513-520. In: Trazilbo Jr., J.P. & Madelaine, V. (Orgs.). **101 Culturas: manual de tecnologias agrícolas**. Belo Horizonte, EPAMIG.

Alves, A.F.; Alves, A.F.; Guerra, M.E.C. & Medeiros-Filho, S. 2007. Superação de dormência de sementes de braúna (*Schinopsis brasiliense* Engl.). **Revista Ciência Agrônômica** 38(1): 74-77.

Angelim, A.E.S.; Moraes, J.P.S.; Silva, J.A.B. & Gervásio, R.C.R.G. 2007. Germinação e aspectos morfológicos de plantas de Macambira (*Bromelia laciniosa*), encontradas na Região do Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 1065-1067.

Araújo, A.G.; Pasqual, M.; Rodrigues, F.A.; Carvalho, J.G. & Zarraga, D.Z.A. 2009. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** 31: 35-39.

Araujo, A.G.; Pasqual, M.; Rodrigues, F.A.; Rodrigues, V.A. & Ferreira, A.L. 2005. Meios de cultura e GA₃ no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Horticultura Brasileira** 2: 612-615.

Arditti, J. & Ernest, R. 1992. **Micropropagation of orchids**. New York, John Wiley & Sons.

Berger, R.G. 2000. **Aroma Biotechnology**. New York, Springer.

Bernardi, A.C.; Faria, R.T.; Carvalho, J.F.R.P.; Unemoto, L.K. & Assis, A.M. 2004. Desenvolvimento vegetativo de *Dendrobium nobile* Lindl. fertirrigadas com diferentes concentrações da solução nutritiva de Sarruge. **Semina: Ciências Agrárias** 25: 13-20.

Bicalho, H.D. 1969. Cultivo e bases para o melhoramento da baunilha. Pp. 169-185. In: Kerr, W.E. (Ed.). **Melhoramento e genética**. São Paulo, EDUSP/Melhoramentos.

Caldas, L.S.; Haridasan, P. & Ferreira, M.E. 1998. Meios nutritivos. Pp. 87-132. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília, Embrapa/CNPq.

Corrêa, M.P. 1984. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas I**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional.

Daugusch, A. & Pastore, G. 2005. Production of vanillin: a biotechnological opportunity. **Química Nova** 28: 642-645.

Dutra, A.S. & Medeiros-Filho, S. 2009. Dormência e germinação de sementes de albícia (*Albizia lebeck* (L.) Benth). **Revista Ciência Agrônômica** 40(3): 427-432.

Dutra, A.S.; Medeiros-Filho, S. & Diniz, F.O. 2007. Dormência, substrato e temperatura para germinação de sementes de albícia (*Albizia lebeck* (L.) Benth). **Revista Ciência Agrônômica** 38(3): 291-296.

Endres, L. & Mercier, H. 2000. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **Journal of Plant Physiology** 15: 205-212.

George, E.F. & Sherrington, P.D. 1984. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley, Exegetics.

George, E.F.; Puttock, D.J.M. & George, H.J. 1987. **Plant culture media: formulations and uses**. Edington. Exegetics.

Griesbach, R.J. 2002. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. Pp. 458-465. In: Janick, J. & Whipkey, A. (Eds.). **Trends in New Crops and New Uses**. Alexandria, ASHS Press.

Hoehne, F.C. 1945. Orchidaceae. Pp. 1-389. In: Hoehne, F.C. **Flora Brasílica** 12(2).

Kalimuthu, K.; Senthilkumar, R. & Murugalatha, N. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr.: a tropical orchid. **Current Science** 91: 1401-1403.

Knorr, D.W.; Romagnoli, L.G. & Stevens, C.P. 1997. **Rapid germination of orchid seeds from immature capsule**. United States Patent.

Knudson, C.L. 1950. Germination of Seeds of *Vanilla*. **American Journal of Botany** 37: 241-247.

Knudson, C.L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin** 14: 214-217.

Krikorian, A.D. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Pp. 41-78. In: Roca, W.M. & Mroginski, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Labouriau, L.G. & Agudo, M. 1987. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 59: 37-56.

- Lugo, H.L. 1955. The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Botany* **42**: 679-684.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C. & Oliveira, S.A. 1997. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato.
- Medeiros-Filho, S.; Silva, M.A.P. & Santos-Filha, M.E.C. 2005. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul var. *ferrea* em casa de vegetação e germinador. *Revista Ciência Agronômica* **36**(2): 203-208.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B. 1991. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. *Journal of Plant Physiology* **138**: 195-199.
- Murashige, T. & Skoog, F. A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Nagao, E.O.; Pasqual, M. & Ramos, J.D. 1994. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. *Bragantia* **53**: 25-31.
- Pan, R.C. & Chen, J.X. 1994. Effects of nitrate-nitrogen and ammonium-nitrogen on growth and development in *Cymbidium sinensis*. *Acta Botanica Yunnanica* **16**: 285-290.
- Pasqual, M. 2001. Introdução: fundamentos básicos. In: **Curso de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV)**. Lavras, UFLA/FAEPE.
- Pedroso-de-Moraes, C. & Fontana, C.A.D. 2005. Apontamentos sobre *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Boletim CAOB* **60**: 99-101.
- Pedroso-de-Moraes, C.; Diogo, J.A.; Pedro, N.P.; Canabrava, R.I.; Martini, G.A. & Marteline, M.A. 2009a. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Revista Brasileira de Biociências* **7**: 67-69.
- Pedroso-de-Moraes, C.; Santos, N.S.; Massaro, R.; Cordeiro, G.M. & Souza-Leal, T. 2009b. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard. (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Ensaios e Ciência* **13**: 57-65.
- Pompelli, M.F. 2006. Germinação de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Floresta e Ambiente* **13**: 1-9.
- Porras-Alfaro, A. & Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* **99**: 510-525.
- Powell, C.L.; Caldwell, K.I.; Littler, R.A. & Warrington, I. 1988. Effect of temperature regime and nitrogen fertilizer level on vegetative and reproductive bud development in *Cymbidium* orchids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **113**: 552-556.
- Rego-Oliveira, L.V. & Faria, R.T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum Agronomy* **27**: 1-5.
- Rodríguez, L.; González, R.; Díaz, A.; Fajardo, E.; Sánchez, E.; Hernández, J.; Castañeira, M.A.; De la Cruz, G. & González, J. 2005. **Producción y recuperación de orquídeas silvestres cubanas**. Disponível em: www.dama.gov.co. (Acesso em 3/12/2010).
- Sakuta, M.; Takagi, T. & Komamine, A. 1987. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum* **1**: 459-463.
- Sorace, M.; Faria, R.T.; Damasceno-Júnior, C.V.; Gomes, G.P.; Barbosa, C.M.; Vieira, F.G.N.; Silva, G.L.; Takahashi, L.S.A. & Schnitzer, J.A. 2008. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Semina* **29**: 775-782.
- Stancato, G.C. & Faria, R.T. 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae): effects of macro and microelements. *Lindleyana* **11**: 41-43.
- Wen, Z.Q. & Hew, C.S. 1993. Effects of nitrate and ammonium on photosynthesis nitrogen assimilation and growth of *Cymbidium sinense*. *Journal of the Singapore National Academy of Science* **20**: 21-23.
- Yule, T. S. & Dias, E. S. 2009. Germinação, desenvolvimento inicial e anatomia de plântulas de *Echinopsis calochlora* K. Shumann (Cactaceae), uma espécie endêmica da Morraria do Urucum. *GeoPantanal* **41**: 32-44.
- Zar, J.H. 1999. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River. Prentice Hall.