

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

LUCIANI MARCIA SCHERER

**CITRONELA DE JAVA (*Cymbopogon winterianus* Jowitt): EFEITO
DA SAZONALIDADE E DE REGULADORES VEGETAIS SOBRE A
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
FEVEREIRO/2007

LUCIANI MARCIA SCHERER

**CITRONELA DE JAVA (*Cymbopogon winterianus* Jowitt): EFEITO
DA SAZONALIDADE E DE REGULADORES VEGETAIS SOBRE A
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Mestrado, área de concentração: Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. VANDEIR FRANCISCO
GUIMARÃES

Co-orientador (a): Dra. ANDRÉA MARIA
TEIXEIRA FORTES

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
FEVEREIRO/2007

Dedico este trabalho aos meus pais Egidio e Marli e ao meu irmão Luciano, que junto comigo acreditaram que esta seria mais uma GRANDE conquista em minha vida.

Amo vocês, sempre!

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor e Pastor, a quem devo toda minha vida e gratidão, por ter me sustentado diante das lutas e a cada manhã me renova na sua presença.

A pessoa, que em todos os momentos, sendo eles de tristeza, dificuldades ou alegria extrema, sempre, sempre esteve comigo, fazendo parte de mim e fazendo o melhor por mim, meu amor Alvaro Caregnato Salvaro. Acima de tudo, um grande amigo, sempre acreditou e me convenceu de que eu poderia vencer mais esta etapa da minha vida!!!!

Ao Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães a quem devo a orientação pelo trabalho e principalmente pela paciência nas horas em que eu não entendia nada da tal estatística!!

À Prof^a Dra. Márcia de Moraes Echer pelas sugestões que contribuíram muito para a melhoria deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Andréa Maria T. Fortes, por ter me apresentado o "mundo científico" durante a graduação e ter me dado o "empurrão inicial" para mais esta conquista. Agradeço também pela co-orientação neste trabalho.

A minha colega Elisiane Inês Dall'Oglio Chaves, companheira de trabalho, que muito me ensinou e me proporcionou bons momentos de risadas, histórias e muito trabalho!!!!

A todos os colegas do Mestrado!

A todos os funcionários da Unioeste, a Noili e Lisete, aos professores, colegas de laboratório de Fitopatologia e Cultura de Tecidos Vegetais, muito obrigada!

A minha companheira dos velhos tempos de graduação, apartamento e agora companheira de msn, Gracieli, dedico com carinho.

Agradeço também pela gentileza da Prof^a. Dra. Marisa Alves Nogueira do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Unioeste, Campus de Cascavel e ao técnico do laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia, Fernando Marcos Leithardt, pela ajuda na destilação da citronela, muito obrigada mesmo!!!!!!

Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante este curso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. AS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS	4
2.2. CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA CITRONELA DE JAVA (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt)	6
2.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CITRONELA DE JAVA (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt)	8
2.4. OS ÓLEOS ESSENCIAIS	11
2.5. CULTURA DE TECIDOS	14
2.6. A VARIAÇÃO SAZONAL E O BALANÇO HORMONAL ENDÓGENO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. ASSEPSIA	25
3.2. REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO	26
3.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. ALTURA DOS EXPLANTES	32
4.2. NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE	38
4.3. PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALO	46
4.4. PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO	50
4.5. PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO	54
4.6. PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL	55
5. CONCLUSÕES	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Altura dos explantes no meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962), no inverno em função de doses crescentes de: a) Ácido Indlilbutírico (IBA) e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. * Significativo pelo teste F ($P < 0,05$); ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$) 35
- Figura 2: Número de brotações por explante no meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), no outono, em função de doses crescentes de Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2005. ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$). ... 40
- Figura 3: Número de brotações por explante no meio de cultura (Murashige e Skoog, 1962), no inverno, em função de doses crescentes de Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$); Obs: O número de brotações por explante foi corrigido pela equação (raiz $(x+0,5)$), para efeito de análise estatística. 42
- Figura 4: Número de brotações por explante no meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962), no verão, em função de doses crescentes de: a) Ácido Indlilbutírico (IBA) e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2006. *Significativo pelo teste F ($P < 0,05$); ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$); Obs: O número de brotações por explante foi corrigido pela equação (raiz $(x+0,05)$), para efeito de análise estatística. 43
- Figura 5: Porcentagem de formação de calo nos explantes em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), no inverno, em função de doses crescentes de: a) Ácido Indlilbutírico (IBA) e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. Obs: A porcentagem de formação de calo foi corrigida pela equação (raiz $(x+0,5)$), para efeito de análise estatística. 48
- Figura 6: Porcentagem de formação de calo nos explantes em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), no verão (a) e no outono (b), em função de doses crescentes de Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. 49
- Figura 7: Porcentagem de oxidação nos explantes em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), no inverno, em função de doses crescentes de: a) Ácido Indlilbutírico e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005... 52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Estação e período em que foram coletados os explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) para o experimento de regeneração e multiplicação *in vitro*. Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2005. 24
- Tabela 2: Tratamentos utilizados para regeneração *in vitro* de gemas apicais de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com diferentes combinações de IBA (Ácido Indlilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina). Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2005. 27
- Tabela 3: Estação e período em que foram coletados a folhas de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) para a determinação da produtividade e rendimento do óleo essencial. Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2006. 29
- Tabela 4: Dados metereológicos registrados para a região de Marechal Cândido Rondon/PR, durante o período de condução do experimento..... 32
- Tabela 5: Resumo do quadro de análise de variância para a altura média dos explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido Indlilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* nas quatro estações do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. 33
- Tabela 6: Resumo do quadro de análise de variância para o número de brotações por explante de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) cultivada em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido Indlilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* nas quatro estações do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. 39
- Tabela 7: Número de brotações por explante de citronela no meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962), coletados e propagados *in vitro* na primavera, em função de doses crescentes de Ácido Indol Butírico (IBA) e Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2006. 45
- Tabela 8: Resumo do quadro de análise de variância para a porcentagem de formação de calo em explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido Indlilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. 46

Tabela 9: Resumo do quadro de variância para a porcentagem de oxidação em explantes de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido Indililbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados <i>in vitro</i> em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005.....	50
Tabela 10: Resumo do quadro de análise de variância para porcentagem de contaminação em explantes de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido Indililbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados <i>in vitro</i> em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005.	54
Tabela 11: Produtividade e média do rendimento do óleo essencial de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) coletada em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2006.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

IBA- Ácido indolilbutírico

BAP- Benzilaminopurina

NAA- Ácido naftalenoacético

DAI- Dias após a inoculação

RESUMO

A citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) é uma planta aromática de grande valor econômico e também muito conhecida no mundo inteiro devido a sua propriedade repelente atribuída ao seu óleo essencial, rico em citronelal. A propagação *in vitro* é uma boa forma de multiplicar a citronela, visto que a divisão de touceiras comumente empregada facilita a contaminação das mudas. No entanto, existem relatos de que a citronela não apresenta bons resultados na propagação *in vitro* quando coletada em determinadas condições sazonais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da sazonalidade sobre a propagação *in vitro* da citronela de Java, utilizando diferentes concentrações de IBA e BAP, bem como avaliar o rendimento do óleo essencial para cada estação. Os explantes foram coletados em cada uma das estações do ano e inoculados em meio MS acrescido de combinações de IBA e BAP. Ao final de 30 dias foram avaliadas as variáveis: altura (cm), número de brotações, formação de calo, oxidação e contaminação de explantes. Nas condições realizadas, foi observada uma boa taxa de multiplicação durante o verão, sendo necessária a adição somente de 1,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura, concomitante a isto não houve oxidação nesta estação. A altura dos explantes somente apresentou resultados significativos no inverno. Tanto no outono, como no inverno e no verão houve formação de calo na base dos explantes, sendo que no verão houve também o aumento no número de brotações por explante. A oxidação se deu de forma mais intensa na primavera (100% de oxidação). Para a contaminação de explantes não houve resultados significativos para nenhuma estação, sendo, portanto, independente das condições sazonais. A extração do óleo essencial foi realizada em cada estação do ano utilizando um aparelho de Clevenger. O maior rendimento do óleo essencial foi obtido no inverno, com média 1,37% de óleo, sendo este o momento em que as plantas matrizes se encontravam plenamente floridas. No entanto, as condições normais de florescimento da citronela na região sul são durante a primavera e início do verão. Na primavera e verão o rendimento do óleo essencial foi de 0,77 e 0,76% respectivamente. No outono foi constatado o menor rendimento, com 0,57% de óleo essencial.

Palavras-chave: estações do ano, micropropagação, óleo essencial

ABSTRACT

Citronella of Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) is an aromatic plant of great economical value, it is also well known in all over the world due to repellent characteristics to its essential oil in citronellal. The propagation *in vitro* is a good method to multiply citronella, due to the fact that the division of the citronella roots ordinarily used facilitates the cutting contamination. However, there are reports that citronella does not present good results in the propagation *in vitro* when collected in determined seasonal conditions. Therefore, the aim of this paper was to evaluate the effect of the seasonally about the propagation *in vitro* of citronella of Java, being used different concentration of IBA and BAP, as well as evaluating the income of the essential oil for each season. The explants were collected in each season of the year and inoculated in MS in addition to combination of IBA and BAP. At the end of 30 days the following variants had been evaluated: Height (cm), number of shootings, formation of callus, oxidation and contamination. In the realized conditions, was observed a good multiplication rate during the summer, being just necessary the addition of $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ of BAP in the medium culture, commonly to this it did not have oxidation in this season. The height only presented significant result in the summer. It had formation of callus in the base of the explants either in the autumn or in the winter and in the summer, but in the summer it had a concomitant increase in the number of shootings. The oxidation was higher in the spring. (100% of oxidation). The contamination did not present significant results in any season, therefore, independent from seasonal condition. The extraction of the essential oil was accomplished in each season of the year by in Clevenger appliance. The great income of the essential oil was gotten in the winter with 1,37% of oil, when the plants were totally bloomy. Although the normal conditions of bloom of citronella in the south region is during the spring and in the beginning of the summer. The spring and the summer had 0,77 and 0,76% income of essential oil, respective. In the autumn presented a lesser income, with 0,57% of essential oil.

Key-words: seasons of the year, micropropagation, essential oil

1. INTRODUÇÃO

A citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) é uma planta aromática de grande valor econômico e também muito conhecida no mundo inteiro. Sua utilização mais conhecida é como repelente contra insetos devido ao alto teor de citronelal. Além disso, seu uso na perfumaria também é muito apreciado, sendo usado como ponto de partida para a síntese de diversos princípios ativos (CASTRO & CHEMALE, 1995).

A espécie também pode ser utilizada no combate de erosões do solo, pois produz grande quantidade de massa verde, que protege o solo contra o impacto das gotas da chuva. Outras aplicações desta espécie se dão na indústria, como desinfetante e bactericida e também no tratamento de cólicas em animais (CASTRO & CHEMALE, 1995).

Segundo os autores, a propagação da citronela se dá por divisão de touceiras, pois as sementes não cumprem sua função reprodutora, não sendo viável este meio de propagação. No entanto, a divisão de touceiras apresenta um sério problema devido ao alto índice de contaminação das plantas por diferentes patógenos.

Na busca por alternativas para facilitar a propagação de certas espécies vários estudos sobre micropropagação *in vitro* têm sido realizados. Esta é uma técnica que visa cultivar células, órgãos e/ou tecidos isolados da planta mãe, sob condições controladas. Desta forma, se torna uma importante ferramenta, visto que apresenta vantagens como produção massal de plantas livres de vírus e outros patógenos. Além disso, a micropropagação permite o cultivo de espécies de ciclo

longo em curto período de tempo, visto que as condições controladas de luz e temperatura favorecem o desenvolvimento contínuo da espécie.

No entanto, como a propagação vegetativa, a micropropagação apresenta limitações, como por exemplo, a necessidade de ajustes no balanço de nutrientes e na adição de reguladores vegetais. Desta forma, sendo cada espécie única quanto à necessidade de nutrientes, é necessário o ajuste de um protocolo específico para a espécie em estudo, objetivando o máximo desenvolvimento da planta. O estado fisiológico das plantas matrizes também deve ser observado visto que, plantas bem nutridas e sem sintomas de estresse hídrico fornecem explantes melhores (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

De modo geral, o crescimento e desenvolvimento das plantas é fortemente influenciado por condições climáticas como pluviosidade, temperatura e fotoperíodo. Na primavera e verão, com temperaturas mais elevadas, dias mais longos e maiores taxas de pluviosidade, o crescimento e desenvolvimento são favorecidos. Já no outono e inverno, o balanço hormonal endógeno não se apresenta favorável ao desenvolvimento da planta, culminando com a dormência das gemas.

Em se tratando de uma espécie de interesse econômico devido ao seu óleo essencial, a escolha da época correta para a colheita da citronela se torna imprescindível, visto que a qualidade e o rendimento deste óleo podem variar devido às condições ambientais (GOMES & NEGRELLE, 2003).

Ao elaborar um protocolo de multiplicação e regeneração de citronela *in vitro*, Zigiotto (2004) percebeu que a espécie apresenta dificuldades de propagação em alguns períodos do ano.

Na região Oeste do Paraná existe a produção comercial da citronela, no entanto, esta enfrenta problemas devido à contaminação por um fungo do gênero

Fusarium, que causa grandes prejuízos aos produtores da região, que muitas vezes necessitam erradicar a cultura da área de produção. Os problemas com contaminação ocorrem devido ao método de plantio da citronela, a divisão de touceiras, que acaba se disseminando por toda a cultura ¹.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da sazonalidade sobre a micropropagação da citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), utilizando diferentes concentrações de IBA (Ácido indolilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina), bem como avaliar o rendimento do óleo essencial em cada estação.

¹ Comunicação pessoal do Sr. Pedro Toaldo, Destilaria Maripá, Município de Maripá-PR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS

A utilização das plantas pelo homem tanto para fins alimentares como para fins terapêuticos data de antes de Cristo. As plantas na arte de curar representam uma forma de tratamento muito antiga, relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações através de sucessivas gerações (CORRÊA et al., 1998).

Com o advento da revolução industrial, logo houve o aumento da produção de remédios quimioterápicos, pois se acreditava que a cura das doenças por estes remédios era mais rápida (CORRÊA et al., 1998).

Segundo os mesmos autores, apesar do rápido crescimento na produção de remédios quimioterápicos, alguns médicos mantiveram o emprego de ervas *in natura*. Deste modo, tomou corpo a fitoterapia, ramo da alopatia que utiliza plantas medicinais como base na terapêutica.

Baseando-se na evolução histórica do uso de plantas medicinais e aromáticas, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1978, passou a reconhecer a fitoterapia como terapia alternativa de eficácia comprovada (VIEIRA, 1992). A partir daí, iniciou-se uma gama de estudos acerca de plantas medicinais e aromáticas. De acordo com a OMS, 80% da população fazem uso de alguma planta medicinal ou aromática, dos quais 30% são por indicação médica (ROCHA, 2002). As plantas aromáticas têm seu uso difundido nas terapias alternativas, como a aromaterapia, na qual se aplicam os óleos essenciais para reequilibrar disfunções físicas, emocionais e energéticas.

De acordo com Rocha (2002), o mercado mundial de plantas medicinais e aromáticas tem crescido expressivamente, devido ao grande interesse da população mundial por formas de terapias alternativas. O mercado mundial de fitoterápicos está avaliado em US\$ 12,4 bilhões, deste montante, cerca de US\$ 355 milhões são gerados por medicamentos produzidos a partir de espécies brasileiras.

Recentemente, têm-se discutido a inserção de plantas medicinais e aromáticas no mercado agrícola, visando estimular a produção por parte de pequenos, médios e grandes produtores. Já existe no Brasil, na Região Sul, cooperativas de pequenos agricultores que produzem plantas medicinais e aromáticas, em especial a camomila. Este produto já disponível no mercado interno passou também para alguns países do Mercosul, dentro dos mais exigentes padrões de qualidade (ROCHA, 2002).

Segundo Ming (1999), ainda são deficientes os estudos acerca de pré-processamento e armazenamento de plantas medicinais e aromáticas, o que impossibilita alcançar os padrões de qualidade máximos exigidos pelo mercado internacional.

Com a maior difusão das espécies medicinais e aromáticas, torna-se importante o estudo de técnicas de propagação que aumentam sua produção com a máxima qualidade. A partir deste propósito surge a micropropagação. De acordo com Gratapaglia & Machado (1998), a atividade comercial de micropropagação, hoje, concentra-se principalmente na limpeza clonal para a multiplicação de espécies ornamentais e arbustivas, no entanto, atualmente as espécies herbáceas, com destaque para as plantas medicinais e aromáticas vêm sendo micropropagadas com grande sucesso.

2.2. CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA CITRONELA DE JAVA (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)

A citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) é originária da Índia, e foi introduzida no Brasil em meados do século XVIII.

É uma planta Liliopsida, pertencente à família *Poaceae* (CRONQUIST, 1988; GOMES & NEGRELLE, 2003), que representa uma das maiores famílias de plantas englobando cerca de 500 gêneros e aproximadamente 8.000 espécies essencialmente herbáceas, denominadas genericamente de gramíneas (UNIVERSITY OF HAWAI, 2003).

O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 30 espécies de gramíneas perenes aromáticas, sendo a maioria destas nativas da região tropical do Velho Mundo (TRIPPLEBROOKFARM, 2003).

A citronela apresenta duas espécies distintas: *Cymbopogon nardus* var. *lenabatu* (citronela do Ceilão) e *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela de Java). Acredita-se que ambas as formas originaram-se no Ceilão, sendo a primeira cultivada principalmente nessa ilha, enquanto a segunda é mais encontrada em Java, Haiti, Honduras, Taiwan, Guatemala e República Popular da China. Provavelmente todos os tipos de citronela cultivados originaram-se de *Cymbopogon confertiflorus* Stapf., conhecida por “maragrass” e que ocorre naturalmente no Sri Lanka (SAHOO & DEBATA, 1995).

Até o início do século XIX, a citronela do Ceilão era a mais utilizada na produção de óleo, mas gradativamente o tipo Java veio a dominar o mercado devido a sua maior concentração de óleo essencial (BARSOTTI, 2005).

A citronela de Java é uma erva perene, herbácea, cespitosa, de 0,80 a 1,20m de altura. Os colmos são eretos lisos, semilenhosos de cor verde-clara e

entrenós longos. Possui caule rizomatoso e curto, semi-subterrâneo, nodoso, com inúmeras raízes fortes, fibrosas e longas. Deste rizoma emergem brotações achatadas firmadas pelas bainhas compridas de inúmeras folhas (CASTRO & CHEMALE, 1995).

A espécie é composta por folhas planas, inteiras, lanceoladas, estreitas e longas (0,50-1,00m), invaginantes, de bordos ásperos e cortantes, nervuras paralelas e ápice acuminado (CASTRO & RAMOS, 2003). Possui aroma intenso que lembra o eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*) (CASTRO & CHEMALE, 1995).

As flores, no caso de gramíneas comumente chamadas floretas, são reunidas em inflorescências do tipo panícula, formada por racemos curtos e geminados (CASTRO & RAMOS, 2003). As floretas da citronela são protegidas por um único par de brácteas secas e paleáceas, as glumas. Estas se separam um pouco expondo as floretas presas a um eixo central, a raquilha. Cada floreta é rodeada pela pálea e pela lema (par de brácteas) (RAVEN et al., 2001). Segundo Castro & Chemale (1995); Castro & Ramos (2003), a citronela floresce na primavera e no início do verão, porém não produz sementes viáveis.

A citronela adapta-se bem em clima tropical ou subtropical, não suportando frio ou geada. No seu período de crescimento é exigente em chuvas, porém, na colheita o excesso de chuvas pode baixar o teor de óleo essencial. É uma cultura exigente em luz (intensidade) e em calor. Desenvolve-se bem em solos areno-argilosos a francos, permeáveis e férteis, preferindo solos altos, secos e sem umidade excessiva (CASTRO & CHEMALE, 1995).

Blank et al. (2004) mencionam que a propagação desta espécie se dá por meio da divisão de touceiras e as mudas devem ser transplantadas diretamente no local desejado, pois a espécie não se desenvolve bem em bandejas de poliestireno

e tubetes de 288 cm³ (AMANCIO et al., 2003). Além disso, é importante que as mesmas possuam algumas raízes aderidas e aproximadamente 3 perfilhos. Os autores observaram também que ao deixar de 3 a 6 cm de lâmina foliar as mudas obtiveram bom desenvolvimento. Para um maior rendimento do óleo essencial Choudhury & Ghosh (1995), recomendam a colheita na altura de corte de 30 cm.

A citronela apresenta problemas quanto a contaminação por *Fusarium*, um gênero de fungo que também ataca o capim-limão (*Cymbopogon citratus*) ocasionando grandes perdas aos produtores destas espécies. Em se tratando de espécies medicinais e aromáticas o uso de produtos químicos para o combate de pragas é desaconselhável, visto que os mesmos podem interferir na composição química dos princípios ativos das plantas em questão. Tal fato é justificado pela ausência de produtos registrados para tais espécies (MARTINS et al., 2000).

Normalmente as plantas medicinais apresentam boa resistência ao ataque de pragas, no entanto, qualquer desequilíbrio que possa ocorrer a resistência fica prejudicada. Um fator que pode gerar o desequilíbrio é o estado nutricional das plantas (MARTINS et al., 2000). Portanto, a monitoração do ambiente onde as plantas são cultivadas e o conhecimento a respeito das exigências nutricionais e dos tratamentos culturais é de extrema importância para a obtenção de plantas com qualidade fitoquímica e sanitárias.

2.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CITRONELA DE JAVA (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)

O uso da citronela se dá em diversos setores e sem dúvida o mais conhecido é a propriedade repelente contra insetos, que se deve ao elevado teor de

citronelal. A citronela de Java é a espécie que possui maiores teores do citronelal (LÁSZLÓ, 2000).

Além do citronelal, a citronela é constituída pelo geraniol, juntos eles produzem um aroma rosa-floral cítrico. Além destes, contribuem na constituição da planta grupos menores como camphene (tipo cânfora), borneol (tipo camomila) e methyleugenol, todos combinando num aroma muito peculiar, lembrando uma vegetação campestre úmida (SIMON, 1990).

Além de seu uso como repelente, a citronela pode ser uma boa opção para higienizar ambientes e também eliminar vermes e bactérias de frutas e legumes. As folhas da citronela eram utilizadas como cataplasma para febre e dores e para acelerar curas, podendo também ser utilizadas no tratamento de LER (lesão por esforço repetitivo). Além disso, na China a citronela também é utilizada para dores reumáticas (LÁSZLÓ, 2000).

Na aromaterapia é utilizada para aumentar a acuidade mental, no combate a enxaquecas e dores de cabeça, além de ser um condicionador cutâneo. Propriedades antidepressivas, anti-sépticas, tônicas e estimulantes também foram verificadas (LÁSZLÓ, 2000).

Segundo Tawatsin et al. (2001), o óleo de citronela associado a 5% de vanilina numa pesquisa laboratorial repeliu três espécies de mosquitos: o *Aedes aegypti*, o *Culex quin-quefasciatus* e o *Anopheles*, por mais de 8 horas. Foram eficazes contra o *A. aegypti*, mosquito causador da dengue, velas com 3% de óleo essencial de citronela e incensos a 5%. Coleiras com citronela também têm sido eficazes para afastar pulgas, carrapatos e mosquitos de cachorros.

Labinas & Crocomo (2003) observaram que o óleo essencial de citronela de Java também apresenta ação inseticida e de repelência sobre lagartas de

Spodoptera frugiperda, uma espécie que causa grandes prejuízos as lavouras de milho.

Martins (2006) realizou experimentos com diversas concentrações do óleo essencial de citronela sobre teleóginas e larvas do carrapato *Boophilus microplus*, bem como frente à postura e a eclosão de seus ovos e observou que na concentração de 10% o óleo essencial de citronela inibiu a postura das teleóginas e também a eclosão dos ovos. Foram testados também separadamente os constituintes do óleo essencial: o citronelal, o geraniol e o citronelol e os estudos indicaram forte ação acaricida do citronelal e do geraniol, parecendo haver uma ação compartilhada entre ambos.

A citronela também pode ser utilizada para combater cólicas em animais e, além disso, sua beleza exótica pode harmonizar ambientes, ajudando também no combate a erosões do solo (CASTRO & CHEMALE, 1995). Além destas propriedades, a citronela é utilizada na culinária chinesa e seu bagaço é aproveitado como ração animal, sendo provado que animais que se alimentam deste bagaço desenvolvem uma maior resistência a doenças (BARSOTTI, 2005).

Apesar do preço oscilante, freqüentemente baixo, a demanda na produção da citronela ainda têm sido elevada e os preços conseguidos permitem ainda o cultivo desta espécie em escala econômica (CASTRO & RAMOS, 2003).

Deste modo, o emprego de técnicas viáveis no sentido custo/produção tem se mostrado interessantes na busca por melhores preços na produção. Na Índia, já foram realizados experimentos intercalando culturas de legumes com citronela de Java, no intuito de aumentar a biomassa e o rendimento do óleo essencial e os resultados mostraram-se positivos (RAO, 2000).

2.4. OS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os aromas têm sido parte da vida do homem há vários séculos. Os egípcios utilizaram material aromático no processo de mumificação dos corpos, na cosmética e na medicina. Os chineses, indianos, hebreus, árabes, gregos e romanos, no decorrer da história também fizeram uso das essências de plantas aromáticas na medicina, culinária e em cerimônias religiosas (CARDOSO et al., 2005).

Estas substâncias são conhecidas como óleos essenciais e se destacam ainda nos dias atuais, graças às suas características nobres. Os óleos essenciais são matérias-primas de origem natural, extraídos de diversas espécies vegetais, a partir das suas folhas, frutos, caule e raízes. Estes compostos naturais possuem intensa propriedade fragrante e aromatizante, sendo largamente utilizados como matéria-prima na produção de fragrâncias para as indústrias de perfumaria, cosmética e higiene pessoal, bem como a aromatização de alimentos e bebidas (GIRARD, 2005).

As denominações atribuídas a este óleo devem-se às suas características físico-químicas. Como evaporam quando expostos ao ar, em temperaturas comuns, sua principal característica, são chamados óleos voláteis e por apresentarem aroma intenso e agradável constituindo verdadeiras “essências”, óleos essenciais. Por fim, devido ao fato de serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, por exemplo, podem ser denominados de óleos etéreos (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000; VITTI & BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias, que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita em algumas famílias de plantas, gêneros ou mesmo espécies (QUEIROZ, 1993). Estas substâncias

secundárias estão relacionadas com a imobilidade das plantas, visto que elas não podem escapar de pressões ambientais pelo movimento, sendo sua única defesa a estrutura física e composição química. Já o metabolismo primário, nas plantas é responsável por processos metabólicos normais, como a fotossíntese, a respiração e o crescimento (EDWARDS & WRATTEN, 1981).

As características físicas dos óleos voláteis são comuns, apesar de apresentarem constituições químicas diferentes. São geralmente insolúveis, ou muito pouco solúveis em água, solubilizando-se em álcool, éter e em muitos solventes orgânicos. Apresentam odores característicos, alto índice de refração e são opticamente ativos (ROBBERS et al., 1997)

De acordo com a família e espécie a que pertencem, os elementos voláteis podem estar concentrados em órgãos anatômicos específicos. Os óleos essenciais localizam-se em estruturas especiais de secreção, como cavidades, canais (bolsas) esquizógenos ou lisígenos, canais oleíferos, pêlos glandulares e células parenquimáticas diferenciadas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (SIMÕES et al., 2000; SIANI et al., 2000).

Além da variação de acordo com o órgão de localização, outros fatores podem interferir na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal, tais como: a época de coleta; condições climáticas e de solo, localização geográfica; ciclo vegetativo da espécie e o processo de obtenção (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000; SIANI et al., 2000).

Chalchat et al. (1994) extraíram óleo em diferentes estádios de floração da *Artemisia annua* e verificaram que no pico da floração o rendimento foi maior,

ficando na ordem de 0,5%. Francis (1971) verificou na extração do óleo de gerânio (*Pelargonium graveolens*) que o volume de óleo tende a aumentar no pico da floração.

Segundo Girard (2005), em gerânio, um aumento na temperatura máxima reduz o conteúdo do óleo, aumentando, no entanto a percentagem de citronelol e seu éster formiato. Thappa et al. (2004), observaram em plantas de *Echinacea pupurea* L. que tanto a temperatura como a umidade afetam o índice e a composição do óleo essencial.

Para as plantas, os óleos essenciais são de grande importância, pois, por meio de sua volatilidade, que age como sinal químico, as plantas conseguem se defender dos animais.

Dessa forma, considera-se a existência de funções ecológicas dos óleos essenciais, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento de temperatura (CARDOSO et al., 2005).

Segundo os mesmo autores, pode-se citar o exemplo das plantas com polinização noturna ou crepuscular, que possuem aroma muito intenso nesses horários, já que o estímulo visual não é possível. Espécies pertencentes ao gênero *Datura* e *Brugmansia* (Solanaceae), conhecidas como trombeteira ou dama-da-noite, apresentam perfume notável à noite e podem atrair morcegos e mariposas.

As espécies como *E. globulus* Lasbill, *E. camaldulensis* Dehnh, *Artemisia absinthium* L. e outras, geram um efeito inibitório na germinação de sementes por meio de seus óleos, de forma que outras plantas são totalmente inibidas de se desenvolver num raio de 1 a 2 metros dela. Estudos indicam que o 1,8-cineol e a cânfora, entre outras substâncias, seriam uma das responsáveis por esse efeito.

Outros estudos indicam que a toxicidade de alguns componentes dos óleos voláteis constitui uma proteção contra predadores e infestantes. O mentol e a mentona são inibidores de crescimento de vários tipos de larvas. Além disso, alguns óleos essenciais podem causar irritações em alguns predadores fazendo-os desistir do ataque.

Os óleos essenciais são empregados para diversas finalidades, no entanto, apesar de apresentar várias características benéficas, não podem ser descartados os efeitos tóxicos acarretados por estas substâncias, que podem acarretar desde uma simples reação cutânea a efeitos convulsivantes e psicotrópicos (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000).

Dentre as espécies produtoras de óleos essenciais que contribuem significativamente no volume mundial comercializado, pode-se destacar a menta (*Mentha piperita*), a citronela de Java (*C. winterianus* Jowitt), o capim-limão (*C. citratus*), o eucalipto (*Eucalyptus sp.*), a rosa (*Rosa damacena*), o gerânio (*Pelargonium graveolens*), a lavanda (*Lavandula officinalis*), a camomila (*Chamomilla recutita*), o sândalo (*Santalum album*), a manjerona (*Origanum majorana*) e sálvia (*Salvia officinalis*) (GIRARD, 2005).

2.5. CULTURA DE TECIDOS

O termo cultura de tecido de plantas é definido por George (1993) como a ciência do crescimento de células, tecidos ou órgãos isolados de uma planta mãe em um meio artificial sob condições controladas de temperatura e luminosidade.

A aplicação mais prática da cultura de tecidos é a micropropagação, chamada assim devido ao tamanho dos seus explantes (TORRES et al., 1998).

As técnicas de cultura de tecidos constituem excelente instrumento de trabalho à disposição de pesquisadores das mais diferentes áreas do conhecimento científico. O sucesso de um sistema de micropropagação depende, no entanto, de um grande número de variáveis, uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência (capacidade do tecido ou células de gerar órgãos e outras estruturas da planta) das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático, ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A regeneração completa das plantas pode ser derivada de três principais formas, que são a partir de um ápice caulinar ou gema lateral pré-existente, a partir da indução de novos ápices caulinares (organogênese) e ainda a partir da indução de embriões somáticos (GEORGE, 1993).

Zigiotto (2004) e Dall'Oglio (2006) utilizaram ápice caulinar ao micropropagar a citronela e obtiveram bons resultados. Reis et al. (1999) conseguiram boas taxas de multiplicação para o capim limão (*C. citratus*) também utilizando o ápice caulinar. Saha & Ghosh (2003) utilizaram pedaços de folhas de citronela como explantes para regeneração *in vitro* e os autores relatam seus resultados como sendo satisfatórios. Barthakur & Bordoloi (1989) relatam o uso de segmentos nodais para regeneração *in vitro* da citronela, no entanto, Dall'Oglio (2006) não obteve resultados significativos

com explantes nodais em condições de cultivo semelhante às condições do presente trabalho.

Dentre as várias técnicas de cultura de tecidos, a organogênese apresenta muitas vantagens quando comparada à propagação clonal via métodos convencionais (enraizamento de estacas e enxertos, por exemplo), onde destaca-se a possibilidade de obter uma rápida e elevada multiplicação de plantas, partindo-se de um único explante (MERKLE et al., 1990).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o processo de micropropagação divide-se em três estágios. No estágio I, realiza-se a seleção de explantes e a desinfestação total do mesmo seguido da cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. Esta etapa apresenta uma grande dificuldade quanto à obtenção de tecidos descontaminados sem conduzi-los à morte, quando isolados. São determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta matriz para o sucesso dessa etapa do trabalho, principalmente no que se refere aos microrganismos endógenos.

No estágio II, promove-se a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação. Embora o objetivo desta fase seja produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante. Outro aspecto essencial é a qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois isto vai determinar o sucesso na fase de enraizamento.

No estágio III, ocorre a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato

ou solo, processo este também chamado de aclimatização. Nesta etapa, as espécies herbáceas apresentam grande sucesso.

De acordo ainda com os autores, o enraizamento pode ser realizado *in vitro* ou ainda *in vivo*. No primeiro, as plantas são enraizadas em meio asséptico e após são transplantadas para o substrato. No segundo, as partes aéreas são manipuladas como microestacas e todo processo de enraizamento se dá em substrato.

A qualidade das partes aéreas determina, em geral, o sucesso do enraizamento. Partes aéreas em geral não enraízam bem e necessitam de uma fase intermediária de alongamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Os meios de cultura devem fornecer as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, e controlam em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso os meios de cultura se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998).

Diversas formulações de meios básicos têm sido muito utilizadas no início do cultivo. Não há uma formulação padrão, mas o meio (MS) Murashige & Skoog (1962), com suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para diversas espécies. Sua composição é de macro e micronutrientes, vitaminas, fonte

de açúcar (geralmente sacarose) e outros compostos orgânicos como aminoácidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Dependendo da espécie estudada, algumas variações no meio de cultura são necessárias, como por exemplo, as modificações feitas por Grewal et al., (1980) ao estudar a micropropagação de *E. citriodora*. Nesta cultura, ao reduzir pela metade as concentrações de nitrato de amônia e de potássio do meio MS, notou-se que a taxa de multiplicação dobrou e, que, ao dobrar a concentração de cloreto de cálcio, a taxa triplicou (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Além das variações dos sais minerais, também pode ser necessária a regulação na concentração de sacarose, visto que esta pode possuir efeito sobre a multiplicação e o crescimento do explante. Concentrações de 2 a 4% são mais comuns, abaixo desta faixa, pode ocorrer clorose nas culturas e, acima dela, pode ocorrer deterioração das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Aos constituintes básicos do meio de cultura, podem ser adicionados ainda os reguladores vegetais, os quais têm por finalidade suprir possíveis deficiências endógenas dos explantes, bem como auxiliar no seu desenvolvimento.

Os hormônios vegetais são compostos produzidos pelas plantas em pequenas quantidades, mas que produzem efeitos significativos nos locais de produção ou em outros sítios de ação, sendo responsáveis por muitos, senão todos, os aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2004). Além dos hormônios que as plantas produzem naturalmente, existem os análogos sintéticos, também conhecidos como reguladores vegetais que possuem vasta aplicação na agricultura e silvicultura moderna. O seu aparecimento permitiu a possibilidade de se cultivar tecidos vegetais *in vitro* e definiu o sucesso da micropropagação clonal de plantas.

De acordo com Taiz & Zeiger (2004), os hormônios vegetais podem ser divididos em dois grupos: os estimuladores do crescimento (auxinas, giberelinas e citocininas) e ainda os inibidores do crescimento (etileno e ácido abscísico). Neste trabalho somente serão estudadas as auxinas e citocininas.

A auxina foi o primeiro hormônio descoberto e, provavelmente, o mais conhecido entre todos os hormônios vegetais e tem como função principal regular o alongamento das células vegetais, induzir a formação do sistema radicial e também é responsável pelas respostas de crescimento das plantas a estímulos unidirecionais, conhecidos como tropismos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Em meados de 1930, foi determinado que a auxina fosse o ácido indolilacético (IAA). Este hormônio é sintetizado principalmente no meristema apical e folhas jovens, é transportado em sentido polarizado, a partir do meristema apical até as extremidades das raízes (TAIZ & ZEIGER, 2004). O IAA pode ser degradado na planta por meio da foto-oxidação e pela oxidação enzimática realizada pelo sistema IAA-oxidase (WACHOWICZ & CARVALHO, 2002).

Mais tarde, outras auxinas foram descobertas em vegetais superiores e passou-se a produzir em laboratórios diferentes auxinas sintéticas, como: o ácido naftaleno-acético (NAA) e o ácido indolilbutírico (IBA).

Na micropropagação *in vitro*, cada auxina produz efeitos diferentes (CALDAS et al., 1998). Por exemplo, o IAA é considerado uma auxina instável, que se degrada facilmente pela luz ou pela atividade microbiana. Essa instabilidade, aliada à sua inativação ou destruição metabólica nas células a torna uma auxina relativamente “fraca” quando comparada ao 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético), uma auxina sintética muito utilizada por sua ação herbicida. Em seus estudos, Reinert & White (1956) observaram maior crescimento de calo normal e tumoroso de *Picea*

glauca em meio suplementado com 2,4-D na concentração de 0,05 mg .L⁻¹ , do que com NAA nessa mesma concentração.

As diferenças em metabolismo e estabilidade das auxinas podem contribuir para as diferenças observadas na resposta *in vitro*, onde o 2,4-D freqüentemente induz a formação de calo e pode ser importante em sistemas de embriogênese somática, enquanto IAA é ineficaz. Já o IBA é freqüentemente, a melhor auxina para indução de raízes *in vitro* (CALDAS et al., 1998), sendo que não é destruído pelo sistema IAA-oxidase e tem boa estabilidade à luz, com ação localizada e não é tóxico, enquanto o NAA é um composto mais tóxico que o IBA, tendo que ser utilizado em concentrações menores, é totalmente estável à luz e também não é destruído pelo sistema IAA-oxidase (HARTMANN et al., 2002)

Em seus estudos com *Catharanthus roseus*, Souza & Miranda (2002) observaram que as raízes se diferenciavam de forma eficiente quando o balanço entre IBA e BAP era favorável ao IBA.

Hu & Wang (1983), afirmam, no entanto, que as concentrações de auxina freqüentemente devem ser mais baixas que as concentrações de citocininas, mantendo um balanço auxina/citocinina menor que um. Quando a concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, ocorre uma formação demasiada de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Já no caso da citronela, Zigiotto (2004), observou que não houve enraizamento na presença de reguladores, e sim, após a repicagem do explantes de um meio contendo reguladores para outro meio básico (MS).

Considerando-se que cada espécie apresenta comportamento *in vitro* distinto, é válido e necessário o estudo do ajuste de protocolo para a espécie que se

deseja cultivar, visando reduzir perdas excessivas devido a erros na aplicação de reguladores vegetais.

As citocininas são substâncias reguladoras de crescimento, que promovem divisão celular, alongamento e diferenciação celular, retardam a senescência das plantas, promovem a quebra da dominância apical e induzem a proliferação de gemas axilares (TOMBOLATO & COSTA, 1998). O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

A citocinina BAP (Benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies, seguida da cinetina (KIN), que também é empregada em experimentos dependendo, no entanto, da espécie a ser estudada (TOMBOLATO & COSTA, 1998).

Segundo ainda os autores, na micropropagação, é fundamental o balanço hormonal entre citocininas e auxinas no controle da morfogênese e formação de órgãos. Na ausência de raízes deve-se aumentar a concentração de auxina e diminuir a concentração de citocinina. Se o objetivo é aumentar a parte aérea deve-se então, aumentar a concentração de citocinina e diminuir a concentração de auxina.

Para que ocorra a formação de parte aérea e de raízes, deve-se investigar o melhor balanço entre esses dois hormônios, que varia de espécie para espécie. Contudo segundo Tombolato & Costa (1998), deve-se cuidar das concentrações utilizadas, pois as citocininas em excesso causam vitrificação dos explantes.

Em estudos de multiplicação *in vitro* com ameixeira “Santa Rosa”, Rogalski et al. (2003) verificaram que o maior número de brotos por explante foi obtido na

concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ enquanto concentrações maiores que $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ inibiram o desenvolvimento de brotos.

Com a citronela, Zigiotta (2004) também obteve bons resultados com relação à brotação dos explantes na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

2.6. A VARIAÇÃO SAZONAL E O BALANÇO HORMONAL ENDÓGENO

A variação sazonal consiste em um conjunto de fatores que alteram o metabolismo vegetal. Por exemplo, a variação da temperatura durante o ano provoca mudanças de rotas biossintéticas nos vegetais, implicando em diferentes tipos e quantidades de certas substâncias no vegetal (SILVA, 2004). A principal alteração ocorre no metabolismo de ácidos graxos, especialmente daqueles que compõem a parede celular (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Em se tratando de espécies medicinais e aromáticas Simões et al. (1999) relatam que há épocas específicas em que as plantas contêm maior quantidade de princípio ativo no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano.

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos, e estes por sua vez, podem estar relacionados às condições sazonais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Além disso, segundo Ming (1992), em se tratando de plantas medicinais e aromáticas há uma preocupação quanto à manutenção e riqueza dos princípios ativos contidos, pois estes são influenciados por fatores externos, como temperatura, luz,

pluviosidade, solo, dentre outros, e também por fatores técnicos, como forma de plantio, tratamentos culturais e época de colheita.

Para Grattapaglia & Machado (1998), a retirada de explantes deve ser feita de preferência a partir de brotações novas, que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta, após o final do período de dormência, durante os meses mais quentes do ano (primavera e verão).

Em seus estudos, Altman & Goren (1974) verificaram que gemas de *Citrus* coletadas no início da primavera ou verão brotaram em menor tempo e não dependiam da aplicação exógena de hormônios, enquanto as coletadas no final do outono e durante o inverno brotaram em tempo cinco vezes superior. Laliberte & Lalonde (1988), trabalhando com *Larix X Eurolepis*, concluíram que a data da coleta dos explantes teve efeito pronunciado sobre: 1) sua taxa de sobrevivência; 2) número de subculturas até o estabelecimento de uma cultura contínua e vigorosa; e 3) número de culturas até atingir uma grande porcentagem de calos com potencial regenerativo.

Silveira & Cottignies (1994), citado por Noleto & Silveira (2004), relataram em estudos realizados com *Fraxinus excelsior L.* que apenas os explantes coletados no período de dormência foram capazes de brotar, mostrando que a melhor época de colheita para propagação *in vitro* varia de espécie para espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos 4 experimentos com a citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), um em cada estação do ano, sendo todos realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos da UNIOESTE- *Campus* de Marechal Cândido Rondon, PR.

O material vegetal utilizado nos experimentos foi obtido na Fazenda São Roque, situada no interior do município de Marechal Cândido Rondon-PR. A cultura está implantada no local há 4 anos e o produtor apenas fornece mudas para o comércio local, não havendo interesse na obtenção do óleo essencial. Nenhum tipo de trato cultural é realizado nas plantas matrizes de citronela.

Foram coletadas as plantas que não apresentavam nenhum sintoma visual de doenças durante todo o período de condução dos experimentos. As coletas foram realizadas em cada estação do ano, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Estação e período em que foram coletados os explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) para o experimento de regeneração e multiplicação *in vitro*. Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2005.

Estação	Coleta
Outono	Primeira quinzena do mês de maio/2005
Inverno	Primeira quinzena do mês de agosto/2005
Primavera	Primeira quinzena do mês outubro/2006
Verão	Primeira quinzena do mês de janeiro/2006

Após a coleta no campo, foi realizada uma parte do toailete do material. A touceira foi dividida, retirando-se o excesso de palhada, a fim de facilitar o transporte até o laboratório. Em seguida, as plantas foram levadas para o laboratório, onde se

realizou a retirada das folhas e também a extração dos explantes (gema apical), com cerca de 5 cm de comprimento. A partir daí, os explantes passaram por três etapas:

3.1. ASSEPSIA

Para a assepsia dos explantes foram adotados os critérios utilizados por Czepak et al. (2003), que trabalhando com capim-limão (*C. citratus*), optaram pela imersão dos explantes em hipoclorito de sódio por 30 minutos. Trabalhando com citronela de Java (*C. winterianus* Jowitt), Zigiotto (2004) também utilizou o tempo de imersão de 30 minutos em hipoclorito de sódio, obtendo desta forma, resultados satisfatórios em relação à assepsia dos explantes.

De acordo Czepak et al. (2003) e Zigiotto (2004), utilizou-se a seguinte metodologia para a assepsia dos explantes de citronela:

- Os explantes já extraídos foram colocados em solução de água destilada com algumas gotas de Tween 80;
- Imersão dos explantes em hipoclorito de sódio 20%, durante 10 minutos;
- Imersão em álcool 70%, durante 5 minutos;
- Imersão em hipoclorito de sódio 20%, durante 30 minutos;
- Imersão em álcool 70%, durante 3 minutos;
- Tríplice lavagem em água destilada e autoclavada
- Após essas etapas, os explantes foram mantidos imersos em água destilada e autoclavada enquanto a inoculação foi realizada.

3.2. REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO

Para essa etapa, foram utilizados vidros de 250 mL específicos para cultura de tecidos, com tampas plásticas, contendo 30 mL do meio de cultura previamente autoclavado a 120 °C, durante 20 minutos. O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), constituído de macro e micronutrientes, EDTA-Férrico, vitaminas e uma fonte de carbono (sacarose).

Ao meio de cultura MS, foram acrescentadas algumas combinações de Benzilaminopurina (BAP) e Ácido indolilbutírico (IBA), sendo estes respectivamente, uma citocinina, que tem função de induzir a formação de grande número de brotações e elevar a taxa de alongamento e multiplicação celular; e uma auxina, que serve para induzir a formação de raízes e alongamento celular.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x4), sendo quatro doses de IBA e quatro doses de BAP, com 8 repetições por tratamento, sendo um explante por tratamento, totalizando 16 tratamentos. Desta forma, para cada estação do ano, o experimento de regeneração e multiplicação consistiu dos tratamentos dispostos na Tabela 2.

Após a assepsia anteriormente mencionada, os explantes foram preparados para inoculação. Neste momento cortaram-se as extremidades dos mesmos e retirou-se a porção de tecido que envolvia a gema com o intuito de retirar a parte oxidada devido ao processo de desinfestação.

Tabela 2: Tratamentos utilizados para regeneração *in vitro* de gemas apicais de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com diferentes combinações de IBA (Ácido indolilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina). Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2005.

Tratamentos	Concentrações em mg L ⁻¹
T1	0 IBA X 0 BAP + MS
T2	0 IBA X 1 BAP + MS
T3	0 IBA X 2 BAP + MS
T4	0 IBA X 3 BAP + MS
T5	0,1 IBA X 0 BAP + MS
T6	0,1 IBA X 1 BAP + MS
T7	0,1 IBA X 2 BAP + MS
T8	0,1 IBA X 3 BAP + MS
T9	0,2 IBA X 0 BAP + MS
T10	0,2 IBA X 1 BAP + MS
T11	0,2 IBA X 2 BAP + MS
T12	0,2 IBA X 3 BAP + MS
T13	0,3 IBA X 0 BAP + MS
T14	0,3 IBA X 1 BAP + MS
T15	0,3 IBA X 2 BAP + MS
T16	0,3 IBA X 3 BAP + MS

Em seguida, os explantes com cerca de 1 cm, foram inoculados nos vidros em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com álcool 70% e hipoclorito de sódio 20%. Neste procedimento os instrumentos que foram utilizados passaram por uma esterilização com álcool 70%, a fim de se evitar a contaminação dos explantes e do meio de cultura. Cada vidro recebeu um explante. Em seguida os vidros foram devidamente fechados com tampa plástica e vedados com filme plástico para evitar o contato do ambiente interno com o externo, garantindo deste modo o grau máximo de assepsia.

Posteriormente, os vidros com os explantes foram levados para a sala de crescimento, onde permaneceram no escuro total durante 15 dias, a fim de se evitar a oxidação e estresse dos explantes, pois nas plantas, estes não estavam expostos à luz (GRATTAPALGIA & MACHADO, 1998).

Após o período de regeneração de 15 dias no escuro, os explantes foram expostos à luz (fotoperíodo 16 horas claro e 8 horas escuro), dando início a fase de multiplicação, que seguiu por mais 15 dias, onde ao final foi realizada a avaliação do experimento.

Em ambas as avaliações foram mensuradas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes contaminados, porcentagem de explantes oxidados, presença de calo, número de brotos por explante e altura média dos explantes.

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para melhor interpretação dos resultados, após a análise de variância empregou-se a análise de regressão. Para os testes estatísticos utilizou-se o programa computacional SAEG 5.0 da Universidade Federal de Viçosa.

3.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

A etapa de extração do óleo essencial da citronela foi realizada no Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel - PR.

Para a extração do óleo essencial da citronela foram utilizadas amostras obtidas da mesma localidade que o experimento de regeneração e multiplicação. A

coleta também foi realizada em cada estação, sendo que foram coletadas 6 repetições para cada estação, conforme a Tabela 3:

Tabela 3: Estação e período em que foram coletados a folhas de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) para a determinação da produtividade e rendimento do óleo essencial. Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2006.

Estação	Coleta
Verão	Primeira quinzena do mês de março/2006
Outono	Primeira quinzena do mês de maio/2006
Inverno	Primeira quinzena do mês agosto/2006
Primavera	Primeira quinzena do mês de outubro/2006

Foi realizada a hidrodestilação, através de um aparelho de Clevenger, utilizando-se a técnica II da Farmacopéia Brasileira IV ed (1988)

Para a destilação, foi utilizado um balão de fundo redondo de 1 L, sobre uma manta aquecedora. Neste, foram colocados 50g de matéria fresca de citronela e um volume de água destilada suficiente para destilação durante 4 horas. Sobre o tubo graduado do aparelho de Clevenger adicionou-se o volume de 0,5 mL de xilol, um solvente utilizado para separar a água do óleo. Ao início da fervura da água contida no balão foi realizada a leitura do volume de xilol contido no tubo graduado, prosseguindo após, a destilação do material. Ao final de 4 horas, foi realizada uma nova leitura no tubo graduado, determinando o volume do óleo.

A determinação da produtividade do óleo essencial foi calculada com auxílio da fórmula utilizada por Czepak (2000). Além disso, como neste experimento o material vegetal foi coletado a partir de uma cultura pré-existente em uma

propriedade particular, os dados referentes à produtividade média de matéria fresca da citronela foram então obtidos para validação da fórmula utilizada:

$$R = \frac{\text{L de óleo}}{\text{Kg de matéria fresca}} \times 100$$

O rendimento do óleo foi obtido através da relação $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca produzida, estabelecendo deste modo a porcentagem de rendimento do óleo essencial. Em seguida calcularam-se as médias, desvio padrão e o erro padrão da média, visando maior confiabilidade dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor apresentação dos resultados as estações foram avaliadas em conjunto para cada variável estudada.

Durante a condução do experimento (maio/2005 a janeiro/2006 para micropropagação, e fevereiro/2006 a outubro/2006 para extração do óleo essencial), foram coletados dados meteorológicos (Tabela 4) referentes a cada estação em que o ensaio foi conduzido. Vale ressaltar que o experimento da primavera 2005 foi desprezado devido ao alto índice de contaminação de causas endógenas. Outro experimento para primavera foi conduzido no mês de outubro de 2006.

Uma questão relevante deste trabalho é o fato de os experimentos terem sido montados em anos diferentes (regeneração e multiplicação em 2005 e determinação da produtividade e do rendimento do óleo essencial em 2006), impedindo uma discussão em conjunto. Além disso, as condições climáticas se mostraram bastante diferenciadas em 2006, culminando inclusive com o florescimento atípico da citronela em julho.

De acordo com a Estação Meteorológica do Paraná (SIMEPAR) o ano de 2006 apresentou precipitações abaixo da normal climatológica, ocasionando um quadro crítico de estiagem, acompanhado de temperaturas elevadas. Durante o inverno as temperaturas se alternaram entre períodos frios e temperaturas relativamente altas para a estação (SIMEPAR, 2006).

Neste experimento, as etapas de subcultivos e enraizamento não foram realizadas devido ao alto índice de contaminação, provavelmente de causas endógenas. Zigiotta (2004) e Dall'Oglio (2006) realizaram a micropropagação da

citronela e verificaram que o enraizamento se dá em meio de cultura desprovido de reguladores vegetais, ou seja, o meio MS simples.

Tabela 4: Dados meteorológicos registrados para a região de Marechal Cândido Rondon/PR, durante o período de condução do experimento.

Mês/Ano	Precipitação (mm)	Temp. média máxima (°C)	Temp. média mínima (°C)
Mai/2005	189,6	27	15
Jun/2005	221,0	25	17
Jul/2005	42,8	23	11
Ago/2005	126,8	27	13
Set/2005	141,4	21	12
Dez/2005	51,2	36	19
Jan/2006	117,2	36	21
Fev/2006	57,4	29	19
Mar/2006	140,4	31	18
Abr/2006	86,2	27	17
Mai/2006	12,8	23	11
Jun/2006	53,4	25	13
Jul/2006	15	25	13
Ago/2006	83,2	25	13
Set/2006	198,4	27	15
Out/2006	157,4	31	19

Fonte: Sistema Meteorológico do Paraná- SIMEPAR; CPTEC/INPE

4.1 ALTURA DOS EXPLANTES

Em relação a variável altura média dos explantes, observa-se através da Tabela 5 que apenas no inverno as doses de IBA e BAP acrescentadas ao meio de cultura resultaram em respostas significativas. Em nenhuma estação do ano houve efeito na interação IBA*BAP, demonstrando a independência de ambos os reguladores vegetais, para esta variável.

Tabela 5: Resumo do quadro de análise de variância para a altura média dos explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido indolilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* nas quatro estações do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005.

		Quadrado Médio			
F.V.	G.L.	Outono/05	Inverno/05	Verão/05	Primavera/06
IBA	3	1,8071 ns	12,5297**	3,1061 ns	1,4121 ns
BAP	3	1,3564 ns	8,7295**	1,7854 ns	0,3411 ns
IBA*BAP	9	1,6349 ns	3,2088 ns	1,3468 ns	0,1413 ns
Resíduo	112				
Total	127				
C.V.		42,25	45,00	39,13	32,10

* significativo a 5% pelo teste F ($P < 0,05$); ** significativo a 1% pelo teste F ($P < 0,01$); ns= não significativo ao teste F.

Em geral, a micropropagação pode ser realizada em qualquer estação do ano, no entanto, seu sucesso depende de fatores como, por exemplo, as condições climáticas em que o material vegetal é coletado. Ono & Rodrigues (1996) relatam que as variações sazonais modificam o estado morfofisiológico da planta-mãe, alterando seus níveis hormonais endógenos e nutricionais, o que pode favorecer seu desenvolvimento e enraizamento.

A adição de reguladores vegetais pode ser necessária em condições desfavoráveis ao desenvolvimento da planta, como por exemplo, o outono e inverno, onde a precipitação, as temperaturas e o fotoperíodo são menores, culminando com a dormência das gemas e a paralisação do crescimento vegetativo. Deste modo, esperava-se que no outono, a adição dos reguladores vegetais ao meio de cultura favorecesse o crescimento do explante, no entanto, nenhum resultado significativo foi observado.

Vale ressaltar que, segundo o Decreto nº 4682, publicado no Diário Oficial nº 6958 de 19/04/2005, houve um longo período de estiagem que teve início no mês de dezembro de 2004 e se estendeu até o início do outono de 2005, culminando com a declaração de situação de emergência em vários municípios da região oeste do Paraná, inclusive no município de Marechal Cândido Rondon-PR (PARANÁ, 2005).

Além disso, a ocorrência de chuvas no mês de maio de 2005 só foi registrada no período posterior a coleta dos explantes para a condução do experimento.

Outra consideração relevante é o fato da citronela geralmente, em função dos reguladores vegetais adicionados ao meio de cultura, apresentar formação de calo na base do explante e a partir destes calos surgirem os brotos. Deste modo, o crescimento em altura se dá de forma mais lenta, sendo que possivelmente o crescimento seria maior se a permanência no meio de cultura fosse aumentada, o que pode ter reduzido os efeitos dos reguladores vegetais adicionados ao meio de cultura. Vale ressaltar que as avaliações dos explantes foram realizadas aos 30 dias após a inoculação (DAI). Dall'Oglio (2006) obteve resultados significativos em relação ao variável altura dos explantes de citronela aos 60 DAI.

No inverno, os explantes apresentaram resultados significativos para a variável altura de explante em função das doses de reguladores vegetais adicionadas ao meio de cultura. Na Figura 1 é apresentada a curva e a equação da regressão referente a esta estação.

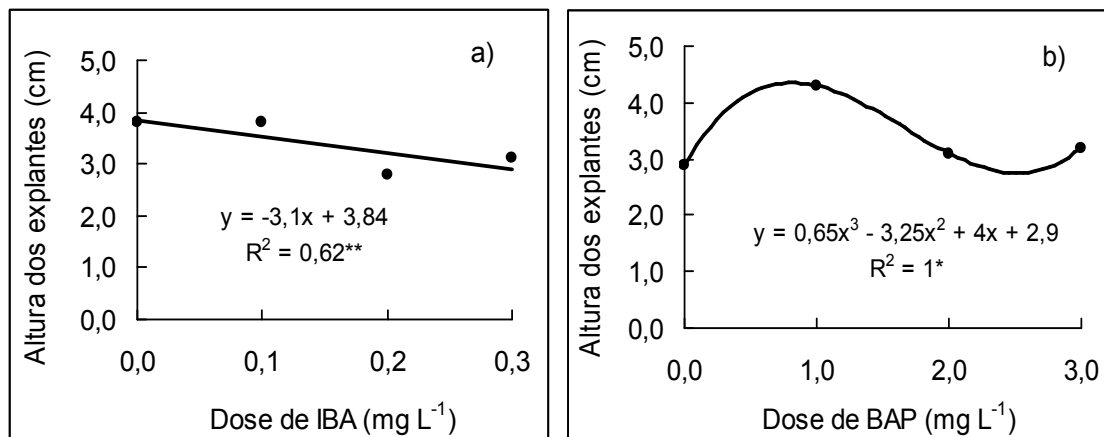


Figura 1: Altura dos explantes no meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962), no inverno em função de doses crescentes de: a) Ácido indolilbutírico (IBA) e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. * Significativo pelo teste F ($P < 0,05$); ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$)

Observando-se a Figura 1 (a), nota-se resposta linear decrescente para a altura média dos explantes em função do aumento da concentração de IBA no meio de cultura.

Ainda na Figura 1 (a) pode-se perceber através da altura média alcançada pela testemunha (3,9 cm) que durante o inverno a concentração de IBA endógena foi suficiente para auxiliar no desenvolvimento do explante em altura, possivelmente ocasionado pelo feito fisiológico das auxinas no alongamento celular (TAIZ & ZEIGER, 2004). Acrescentando-se auxina no meio de cultura houve inibição do alongamento celular, evidenciando que a concentração deste regulador vegetal ficou acima do ideal para o alongamento do explante.

Embora nem sempre necessárias no meio de multiplicação, muitos autores utilizam auxinas para tal fim. Hu & Wang (1983), constataram que 48% dos meios de multiplicação apresentados na literatura continuam auxina. Para multiplicação de clones de *Eucalyptus*, foi verificado que as partes aéreas se alongaram com a adição de IAA ou IBA (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Porém, em se tratando de espécie herbácea, os resultados alcançados neste trabalho para o inverno de 2005 concordam com os resultados alcançados por Zigiotto (2004), onde a concentração de IBA se mostrou indiferente para a altura dos explantes de citronela. Em seu trabalho, a autora ainda relata que ocorreu formação de raízes na testemunha (MS sem reguladores), confirmando os autores Taiz & Zeiger (2004) que relatam que as auxinas são os únicos reguladores vegetais que aumentam a formação de primórdios radiculares, no entanto, algumas espécies formam raízes apenas com o nível endógeno de auxina.

Observando-se a Figura 1 (b) nota-se que a presença de BAP no meio de cultura é importante para a micropropagação da citronela durante o inverno. Ao observar a curva de regressão e a equação encontrou-se a concentração de 0,81 mg L⁻¹ de BAP como sendo a dose ideal para o máximo crescimento dos explantes de citronela, resultando em altura de 4,35 cm.

Vale a pena lembrar que as temperaturas normais para o mês de julho na região são amenas, no entanto, conforme a Tabela 4 pode-se perceber uma elevação na temperatura durante o inverno de 2005. Contudo, no período que antecedeu a coleta dos explantes a temperatura baixou consideravelmente, devido a uma forte massa de ar frio, comum durante o inverno na Região Sul do Brasil.

Kerbauy (2004) relata que a diminuição de temperatura ocasionou aumento na concentração endógena de citocininas na orquídea *Phalaenopsis* e, também, em outra orquídea tropical, *Denbrobium*. Desta forma, o período de frio a que as plantas matrizes foram submetidas pode ter contribuído para o balanço hormonal endógeno, fazendo com que uma quantidade menor de citocinina seja suficiente para estimular o desenvolvimento dos explantes de citronela.

No verão a variável altura de explantes não apresentou resultados significativos o que pode ser atribuído ao fato da citronela encontrar-se em plena atividade vegetativa, com formação de novas gemas e emissão de folhas novas, boas fontes de auxina endógena. Além disso, as plantas matrizes se encontravam em pleno florescimento, o que comprova um balanço hormonal endógeno entre auxina/citocinina favorável (KERBAUY, 2004).

Debiasi et al. (2004), trabalhando com micropropagação de gengibre obtiveram maior altura dos explantes em meio sem reguladores vegetais, ou seja, o explante possuía um balanço hormonal endógeno suficiente para promover o crescimento dos explantes.

Zuffelato-Ribas & Rodrigues (2001) destacam que o balanço hormonal endógeno sofre variações ao longo do ano devido às variações sazonais, auxiliando no desenvolvimento em uma estação e paralisando ou diminuindo o desenvolvimento em outra. No entanto, mesmo com a aplicação de reguladores vegetais a relação endógena é mantida. Desta forma, o efeito que se espera dos reguladores vegetais pode variar, estimulando em uma estação e até inibindo em outra época do ano (IRITANI et al., 1986).

Na primavera também não houve efeito significativo dos reguladores vegetais no crescimento dos explantes. Devido a isso, faz-se necessária a consideração de que durante a condução deste experimento as plantas matrizes já se encontravam em plena floração, sendo esta precocemente ocorrida no mês de julho de 2006, pois, segundo Castro & Chemale (1995) e Castro & Ramos (2003), a citronela floresce na primavera e no início do verão.

Silva (2003) afirma que em cada espécie vegetal, os hormônios podem exercer distintas funções no controle do desenvolvimento e função dos órgãos florais

e sua concentração endógena pode variar ao longo do período de floração. No entanto, os estudos acerca deste assunto têm desconsiderando os vários mecanismos que afetam a fisiologia da planta, principalmente os de ordem hormonal.

Em micropropagação de *Strelitzia* as diferentes concentrações de BAP acrescidas ao meio de cultura influenciaram no tamanho dos brotos formados, de modo que quanto maior a concentração do regulador, menor a altura das brotações (PAIVA et al., 2004).

Outra questão relevante neste trabalho e já mencionada anteriormente é o período compreendido entre a inoculação dos explantes e a avaliação. Na propagação *in vitro* de gengibre, os explantes só demonstraram resposta no crescimento na segunda avaliação aos 30 DAI e no momento da primeira avaliação, aos 15 DAI, nenhum tratamento havia apresentado resultados positivos (DEBIASI et al., 2004).

4.2. NÚMERO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE

De acordo com a Tabela 6, os reguladores vegetais tiveram efeito significativo sobre a multiplicação dos explantes de citronela em todas as estações do ano. No outono e no inverno foi observado efeito significativo apenas com a adição de BAP ao meio de cultura. Já no verão, houveram efeitos significativos isolados da adição de IBA e BAP ao meio de cultura. Apenas na primavera observou-se interação significativa entre IBA e BAP em relação ao número de brotações por explante.

Tabela 6: Resumo do quadro de análise de variância para o número de brotações por explante de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) cultivada em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido indolilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* nas quatro estações do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005.

Quadrado Médio.					
F.V.	G.L.	Outono/05	Inverno/05	Verão/05	Primavera/06
IBA	3	0,2519 ns	0,2924 ns	4,1870*	0,8159 ns
BAP	3	2,7436**	2,2823*	0,2821**	0,4745 ns
IBA*BAP	9	0,1803 ns	0,1211ns	0,1682 ns	0,1640*
Resíduo	112				
Total	127				
C.V.		30,5	35,9	24,8	29,5

* significativo a 5% pelo teste F ($P < 0,05$); ** significativo a 1% pelo teste F ($P < 0,01$); ns= não significativo ao teste F; Obs: O número de brotações por explante foi corrigido pela equação ($\text{raiz}(x+0,05)$), para efeito de análise estatística

Na análise das médias para o número de brotações por explante foi possível utilizar a análise de regressão apenas para a resposta desta variável às doses de BAP no outono (Figura 2), inverno (Figura 3) e verão (Figura 4 b) e para respostas às doses de IBA, apenas no verão (Figura 4 a). Os resultados referentes à interação IBA x BAP para a primavera são apresentados sob a forma de tabela (Tabela 7), pois sua visualização em forma de gráfico não se apresentou adequada.

Durante o outono e inverno a adição de IBA ao meio de cultura não resultou em efeito significativo para o número de brotações por explante. Resultado semelhante foi alcançado por Zigiotto (2004), trabalhando com explantes de citronela de Java coletados no inverno.

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, na Índia, Barthakur & Bordoloi (1989) trabalhando com citronela de Java obtiveram resultados significativos, porém utilizando outra auxina, o NAA (Ácido naftalenoacético) e outro tipo de explante, a gema nodal. No entanto, os autores não mencionam ao longo do

trabalho a época em que coletaram os explantes. Na literatura não se encontram dados referentes à sazonalidade e coleta de explantes para a micropropagação. Dessa maneira, fica evidente a importância de estudos específicos para cada região, com reguladores vegetais e épocas do ano, visando obter um protocolo de produção específico para cada região.

Para o BAP, no outono, houve efeito significativo dos resultados, permitindo o estudo de regressão conforme a Figura 2.

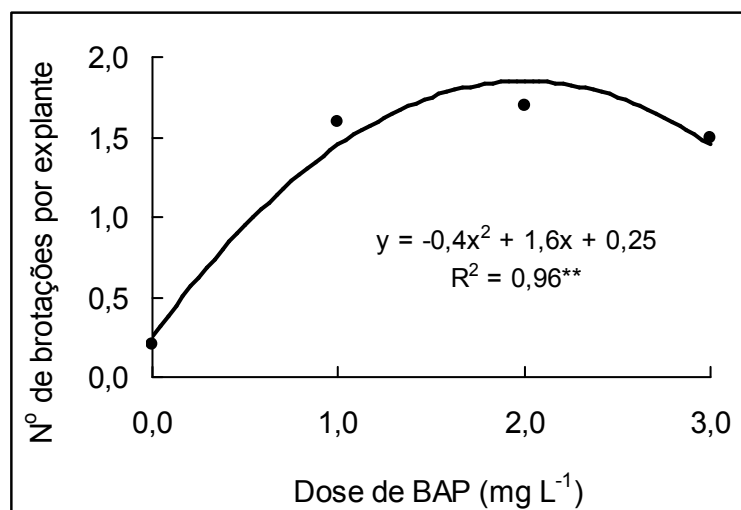


Figura 2: Número de brotações por explante no meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), no outono, em função de doses crescentes de Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR, UNIOESTE, 2005. ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$).

Na Figura 2 fica evidente o efeito polinomial quadrático da adição de BAP ao meio de cultura sobre a indução de brotações em explantes de citronela de Java. Nesta figura confirma-se a importância da citocinina na indução de brotações para esta espécie.

A dose ideal de BAP no meio de cultura estimada para esta variável é de $1,99 \text{ mg L}^{-1}$, resultando em 1,84 brotos por explante de citronela.

Diniz et al. (2004), alcançaram resultados significativos com a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP em *Heliconia stricta* Huber. No entanto, estes verificaram ainda que, a concentração de 4,0 mg L⁻¹ também não diferiu estatisticamente das concentrações menores testadas. Para casos como este, podem-se utilizar concentrações menores, que proporcionaram resultados numericamente semelhantes às concentrações elevadas, diminuindo custos com o produto utilizado.

Através destes resultados obtidos para a formação de brotos, pode-se supor que o balanço hormonal endógeno não era favorável, pois a testemunha apresentou uma formação de brotos mínima quando comparada aos demais tratamentos.

Levando-se em consideração o ambiente em que as plantas matrizes foram coletadas e diante dos resultados alcançados para a variável altura dos explantes (item 4.1), pode-se concluir que para a micropropagação da citronela, coletada no outono, a utilização da citocinina BAP faz-se necessária para auxiliar na multiplicação e emissão de novos brotos na espécie.

Na Figura 3 são apresentados os resultados referentes ao número de brotações por explante em função da presença de BAP no meio de cultura durante o inverno. Nesta estação também houve efeito polinomial quadrático para o número de brotações por explante em resposta ao BAP.

A análise da equação da regressão aponta a concentração de 1,97 mg L⁻¹ de BAP como sendo a melhor dose para proporcionar uma boa taxa de multiplicação dos explantes de citronela, resultando em 1,52 brotos por explante.

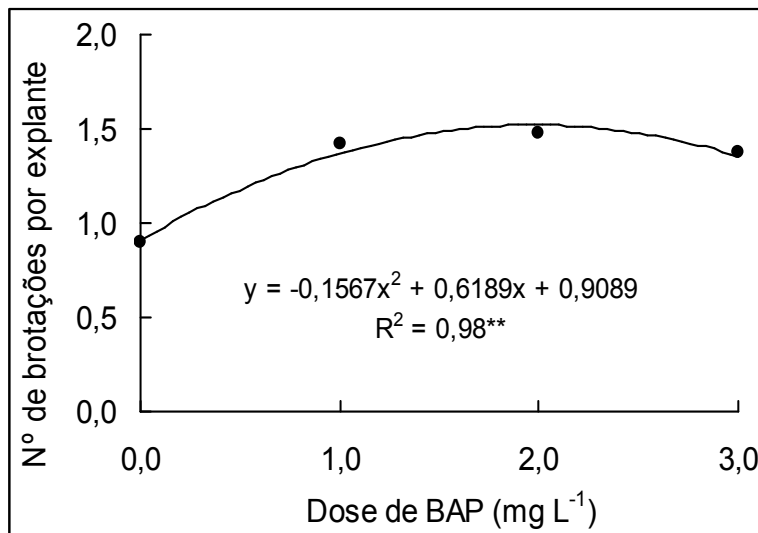


Figura 3: Número de brotações por explante no meio de cultura (Murashige e Skoog, 1962), no inverno, em função de doses crescentes de Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$); Obs: O número de brotações por explante foi corrigido pela equação (raiz $(x+0,5)$), para efeito de análise estatística.

Trabalhando com micropropagação de capim-limão (*C.citratu*s), Reis et al., (1999) também obtiveram bons resultados na brotação dos explantes utilizando a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Saha & Gosh (2003), trabalhando com citronela de Java, utilizando pedaços de folhas, também conseguiram bons resultados utilizando BAP em concentrações que variaram de $0,5$ a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, no meio de cultura.

As Figuras 4 (a e b) referem-se ao número de brotações por explante em função das concentrações de IBA e BAP presentes no meio de cultura no verão.

Verifica-se na Figura 4 (a) uma resposta linear decrescente do número de brotações por explante em função de doses crescentes de IBA acrescentadas ao meio de cultura, enquanto que na Figura 4 (b), na mesma estação (verão), para a resposta à adição de BAP ao meio de cultura, houve um comportamento polinomial quadrático para esta variável. Neste caso o máximo de número de brotações por

explante foi atingido com a dose de $1,73 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, resultando em 2,87 brotos por explante.

Dall'Oglio (2006) também trabalhando com citronela de Java, concluiu que a adição do IBA ao meio de cultura não se justifica para a formação de brotações, pois o mesmo não acrescentou resultados significativos à variável citada.

Em estudos de micropropagação com *Brachiaria*, o meio de cultura foi suplementado somente com citocinina para induzir brotações, e a auxina foi adicionada posteriormente para manutenção da planta *in vitro*, garantindo o sucesso do protocolo de micropropagação (CABRAL et al., 2003).

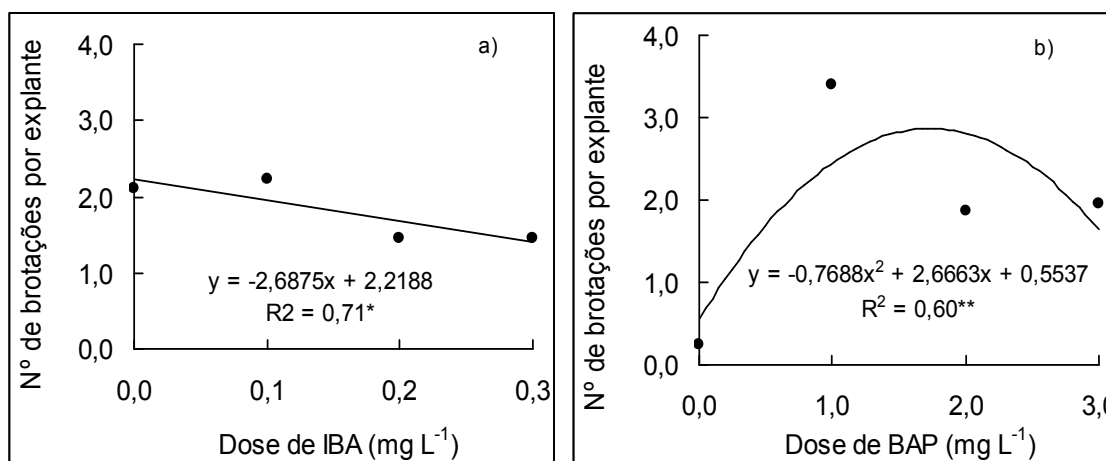


Figura 4: Número de brotações por explante no meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962), no verão, em função de doses crescentes de: a) Ácido indolilbutírico (IBA) e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2006. *Significativo pelo teste F ($P < 0,05$); ** Significativo pelo teste F ($P < 0,01$); Obs: O número de brotações por explante foi corrigido pela equação (raiz $(x+0,05)$), para efeito de análise estatística.

No entanto, pode-se observar que a testemunha, sem regulador vegetal proporcionou bom número de brotações na estação do verão, o que leva a sugerir uma concentração endógena de auxina favorável nas plantas matrizes,

principalmente, em folhas novas e meristemas em desenvolvimento (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Resultados semelhantes foram encontrados por Krapiec et al. (2003) com *Cattleya walkeriana* Gardner, onde a presença de IBA nas concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ induziram uma boa formação de brotos.

Já em relação ao BAP, pode-se observar na Figura 4 (b) que sua concentração endógena para o verão não foi suficiente para induzir a formação de brotações, ficando evidente a necessidade de adição deste regulador.

Neste experimento a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP resultou em um número superior de brotações por explante quando comparado às demais concentrações, diferentemente do que aconteceu no outono e no inverno, onde as concentrações 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ não resultaram em diferença estatística para esta variável. A dose ideal de BAP calculada para a multiplicação dos explantes foi 1,73 mg L⁻¹, resultando em 2,87 brotações por explante.

De acordo com Kerbauy (2004), houve aumento na concentração endógena de citocinina na orquídea *Phalaenopsis* quando estas passaram por um período de baixas temperaturas. No entanto, no presente experimento, na época de coleta dos explantes (janeiro/2006) as temperaturas encontravam-se elevadas (Tabela 4) e a precipitação referente a este mês foi relativamente baixa, o que leva a sugerir que a temperatura possa ter ocasionado a diminuição dos teores endógenos de citocininas.

Para a primavera, pode-se observar através da Tabela 7, que a interação IBA*BAP mostrou-se significativa, demonstrando que ambos os reguladores agiram conjuntamente. Quando avaliados separadamente, ambos não apresentaram efeitos significativos em relação à formação de brotos por explante.

Tabela 7: Número de brotações por explante de citronela no meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962), coletados e propagados *in vitro* na primavera, em função de doses crescentes de Ácido Indolilbutírico (IBA) e Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2006.

Concentração de BAP no meio de cultura	Concentração de IBA no meio de cultura			
	0,0 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	0,2 mg L ⁻¹	0,3 mg L ⁻¹
0,0 mg L ⁻¹	0,25 a A	0,63 ab A	0,63 a A	0,38 a A
1,0 mg L ⁻¹	0,50 a A	0,50 ab A	0,50 a A	0,25 a A
2,0 mg L ⁻¹	0,87 a A	0,25 b A	0,50 a A	0,75 a A
3,0 mg L ⁻¹	0,63 a A	1,25 a A	0,38 a A	0,25 a A
Média	0,56	0,66	0,5	0,40
CV (%)	29,48			

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 7, na primavera, a melhor combinação de reguladores vegetais é 3,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de IBA, o que neste trabalho produziu em média 1,25 brotos por explante.

Krapiec et al. (2003), trabalhando com *Cattleya walkeriana* Gardner, utilizaram combinações de dois tipos de auxinas, o ácido naftalenoacético (NAA) e o ácido indolilbutírico (IBA), e dois tipos de citocininas, benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (KIN), sendo todos combinados em doses de 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹. A melhor combinação relatada pelos autores foi a de IBA e BAP, concordando com os resultados deste trabalho. No entanto, os autores não mencionam qual foi a melhor dose de cada regulador.

Bhin et al. (1990) conseguiram multiplicar um grande número de brotos em *Agave cantala* combinando duas auxinas (NAA e IBA) juntamente com uma citocinina (KIN), sendo as doses utilizadas de 0,075 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente, obtendo assim, resultados satisfatórios.

4.3 PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALO

Neste estudo, houve formação de calo nos explantes coletados em todas as estações do ano, exceto na primavera, onde não houve resultados significativos em relação a esta variável. Pode-se sugerir que isto ocorreu devido ao balanço endógeno, e mesmo que tenha sido realizada a aplicação exógena de reguladores vegetais, tal balanço foi mantido (ZUFFELATO-RIBAS & RODRIGUES, 2001). Observa-se na Tabela 8 que a presença de IBA no meio de cultura somente influenciou na formação de calo durante o inverno (Figura 5 a).

Tabela 8: Resumo do quadro de análise de variância para a porcentagem de formação de calo em explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido indolilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005.

F.V.	G.L.	Quadrado Médio			
		Outono/05	Inverno/05	Verão/05	Primavera/06
IBA	3	0,9114 ns	0,2500*	0,6250 ns	0,2864 ns
BAP	3	1,4661*	4,4375*	6,8125 **	0,7812 ns
IBA*BAP	9	0,6336 ns	0,1875 ns	0,9722 ns	0,2171 ns
Resíduo	112				
Total	127				
C.V.		26,65	19,44	11,27	11,08

* significativo a 5% pelo teste F ($P < 0,05$); ** significativo a 1% pelo teste F ($P < 0,01$); ns= não significativo ao teste F

Segundo Debiasi (2000), o emprego de gemas apicais e laterais proporciona índices relativamente baixos de variação somaclonal e atribui-se ao balanço endógeno de auxina e citocinina um dos principais fatores responsáveis pela determinação do tipo de gema que irá se originar. Deste modo, a presença

excessiva de reguladores vegetais no meio de cultura, principalmente as auxinas, pode favorecer a formação de calo na base do explante (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), em algumas espécies a formação de calo é indesejável, visto que interfere na homogeneidade genética das plantas. Na micropropagação da citronela a formação de calo pode ser considerada um aspecto favorável, pois a partir do calo surgem as brotações, também chamadas de afilhos, resultando em “tufos” que posteriormente podem ser divididos e subcultivados.

Neste estudo, como já visto na Tabela 8, percebe-se que os explantes coletados no inverno foram influenciados significativamente pela adição de IBA no meio de cultura. Na figura 5 (a) verifica-se que houve resposta linear crescente à adição de IBA no meio de cultura para a formação de calo. Com a dose máxima utilizada ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$) obteve-se em média, 65,63% de explantes que formaram calo, sendo que a testemunha apresentava 46,88% de explantes com calo. No entanto, observando-se o item 4.2, discutido anteriormente, nota-se que mesmo com a formação de calo, não houve influência do IBA sobre a indução de brotação dos explantes (Tabela 6).

Zigiotto (2004) em seu trabalho com citronela também alcançou resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Em relação à influência do BAP em explantes coletados no inverno, nota-se na Figura 5 (b), que houve uma resposta polinomial quadrática para a porcentagem de formação de calo em função da adição de BAP ao meio de cultura. A dose de BAP que resultou em máxima porcentagem de calo foi de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, resultando em 87,5% de explantes que formaram calo. Esta resposta está condizente com a

resposta obtida para este regulador vegetal em relação ao número de brotos por explante, discutido anteriormente (item 4.2, Tabela 6 e Figura 3), confirmando o potencial de multiplicação do calo. No entanto, a fidelidade genética do material propagado pode ser prejudicada (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

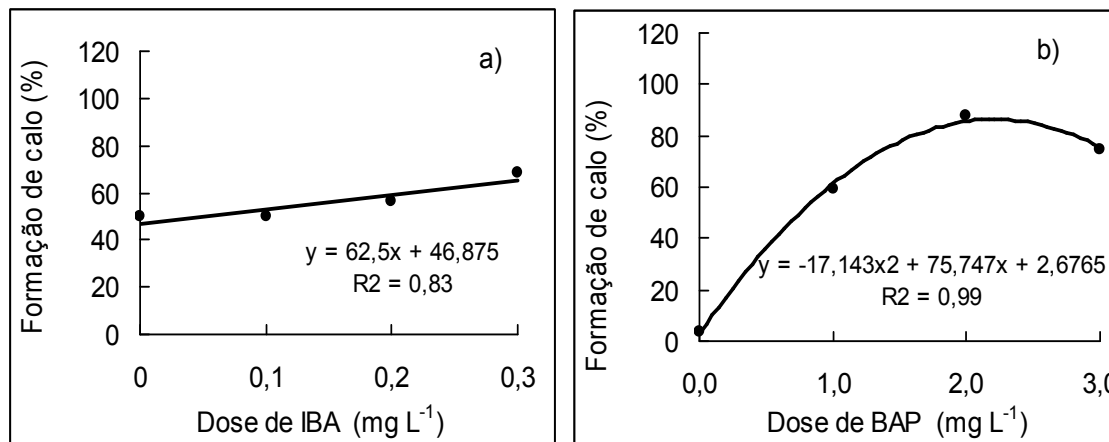


Figura 5: Porcentagem de formação de calo nos explantes em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), no inverno, em função de doses crescentes de: a) Ácido indolilbutírico (IBA) e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. Obs: A porcentagem de formação de calo foi corrigida pela equação (raiz(x+0,5), para efeito de análise estatística.

No caso da citronela a adição de BAP ao meio de cultura apresentou bons resultados em relação à formação de calo. No entanto, existem espécies que não apresentam resultados significativos para este regulador vegetal quando adicionado individualmente, como é o caso de *Artemisia absinthium*, onde o BAP foi adicionado nas doses de 0,88 mg L⁻¹ e 2,22 mg L⁻¹ (NIN et al., 1996). Quando adicionada em conjunto as citocininas BAP e KIN resultaram em formação intermediária de calo e quando a auxina NAA foi adicionada individualmente, proporcionou a maior porcentagem de formação de calo (SILVA et al., 2003).

Tanto para o verão (Figura 6 a) quanto para o outono (Figura 6 b) houve resposta à adição de BAP ao meio de cultura para a formação de calo nos explantes. Deste modo fica evidente a necessidade de BAP no meio de cultura para a indução de calo, bem como a emissão de novas brotações.

Nas duas estações (verão e outono) houve uma resposta polinomial quadrática para esta variável, sendo que no verão a dose ideal de BAP foi de 2,47 mg L⁻¹, resultando na máxima porcentagem de formação de calo, enquanto que no outono a dose ótima foi de 2,16 mg L⁻¹ de BAP, resultando em 49,17% de formação de calo.

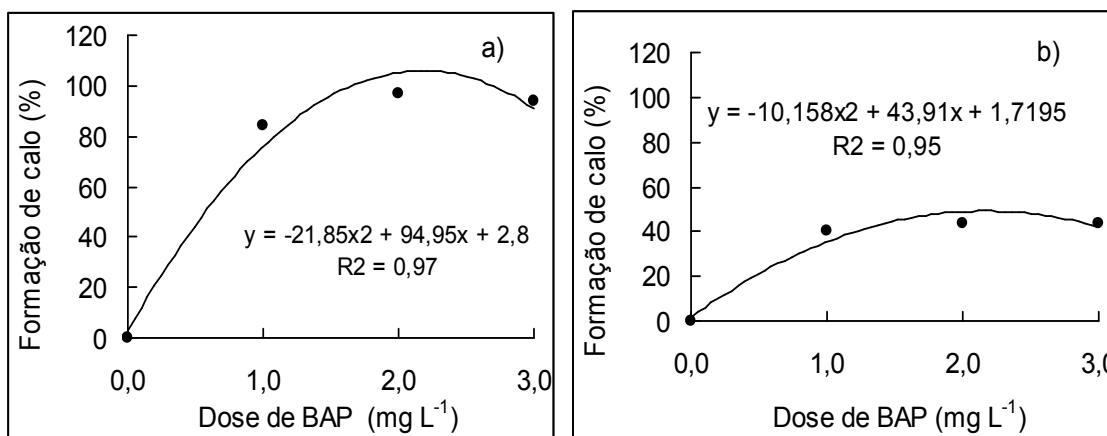


Figura 6: Porcentagem de formação de calo nos explantes em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), no verão (a) e no outono (b), em função de doses crescentes de Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. Obs: A porcentagem de formação de calo foi corrigida pela equação (raiz(x+0,5)), para efeito de análise estatística.

Em *Castanea molissima* a presença excessiva de BAP no meio de cultura inibiu a formação de brotos e induziu a formação de calo na base do explante (QI GUANG et al., 1986).

No presente trabalho, a presença de BAP também favoreceu a formação de calo, no entanto, resultou em maior número de brotações por explante, principalmente no inverno, onde as plantas matrizes encontravam-se em condições de desenvolvimento lento.

4.4. PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO

De acordo com a Tabela 9, somente no inverno e na primavera houve a oxidação dos explantes. No inverno houve efeito significativo do IBA e do BAP para esta variável e na primavera foi observada a oxidação de 100% dos explantes.

Tabela 9: Resumo do quadro de variância para a porcentagem de oxidação em explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido indolilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005.

		Quadrado Médio			
F.V.	G.L.	Outono/05	Inverno/05	Verão/05	Primavera/06
IBA	3	0,6250 ns	0,2161*	0,7031 ns	**
BAP	3	0,2083 ns	0,1536*	0,7031 ns	**
IBA*BAP	9	0,1388 ns	0,7031 ns	0,3559 ns	**
Resíduo	112				
Total	127				
C.V.		7,57	10,59	9,90	**

* significativo a 5% pelo teste F ($P < 0,05$); ns= não significativo ao teste F; ** ausência de variância, 100% de oxidação.

Um problema freqüentemente encontrado no cultivo *in vitro* é o escurecimento dos tecidos lesados do explante causado pela oxidação de

compostos fenólicos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984) o que prejudica o crescimento dos explantes, além de ser um fator de redução da taxa de multiplicação (CARNEIRO, 1997).

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado. Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000).

Segundo Sato et al., (2001) esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, podendo causar sua morte, além de escurecer o meio de cultura.

Uma das razões para a oxidação dos explantes pode ter sido o baixo índice pluviométrico registrado no período de inverno na região de Marechal Cândido Rondon, onde no mês de julho de 2005 choveu apenas 42,8 mm. Além disso, as plantas matrizes de citronela se localizavam em área ensolarada. Abreu (2002) trabalhando com *Hypericum brasiliense*, uma espécie encontrada no Sul e Sudeste, observou que a concentração de compostos fenólicos aumentou com o déficit hídrico, bem como em temperaturas noturnas em torno de 10°C. A autora relata ainda que existem fatores interno e externos que controlam a produção dos compostos fenólicos, como hormônios, luz, nutrientes e água.

Observando-se a Figura 7 (a), pode-se perceber que houve uma resposta polinomial quadrática com a dose mínima de 0,13 mg L⁻¹ de IBA, resultando em 81,25% de oxidação.

Ao contrário do que aconteceu com o IBA, observa-se na Figura 7 (b) em relação à concentração de BAP, que a testemunha apresentou 100% de oxidação,

enquanto os demais tratamentos apresentaram redução na porcentagem de oxidação. A concentração que apresentou menor porcentagem de oxidação foi a de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, com 84,38% de oxidação.

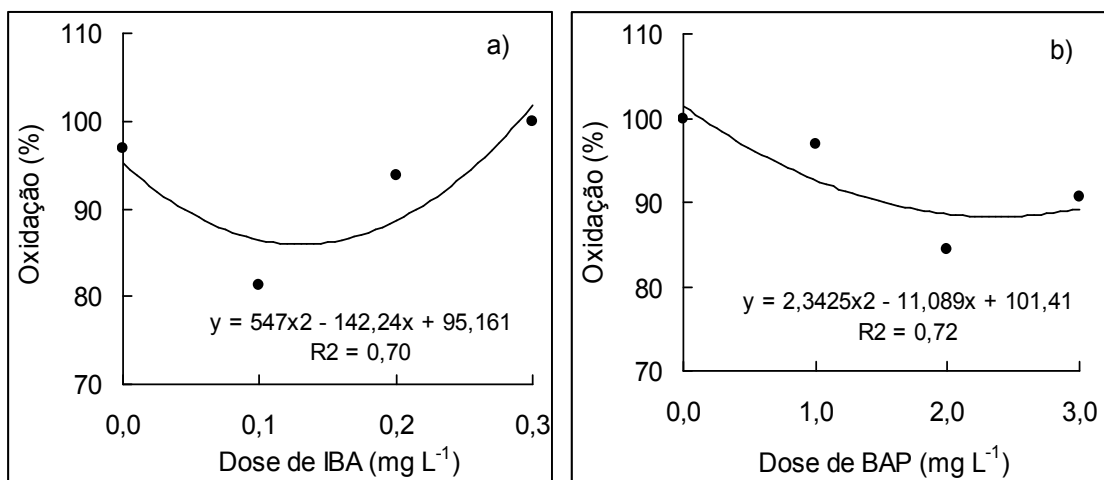


Figura 7: Porcentagem de oxidação nos explantes em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), no inverno, em função de doses crescentes de: a) Ácido indolilbutírico e b) Benzilaminopurina (BAP), aos 30 DAI. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005. Obs: A porcentagem de formação de calo foi corrigida pela equação (raiz(x+0,5)), para efeito de análise estatística.

Resultados distintos foram encontrados por Paiva et al. (2004), onde a oxidação do meio de cultura contendo explantes de *Strelitzia* não sofreu interferência com a adição de BAP ao meio de cultura. Já Cai & Butler (1990) observaram o aumento da oxidação dos explantes de sorgo em meio de cultura devido à adição da citocinina BAP.

Getachew (1999) relata que algumas classes de metabólitos secundários parecem ter importância na proteção de plantas contra estresses ambientais, como o estresse hídrico. Tal fato também é confirmado por Honner (1988). O autor ainda

relata que plantas que crescem em pleno sol produzem três vezes mais taninos do que plantas que se desenvolvem na sombra.

Na literatura encontram-se relatos sobre a concentração de compostos fenólicos relacionada ao estágio fenológico da planta. Em plantas lenhosas como a *Leucena leucocephala*, Deotale et al. (1994) relatam que o teor de taninos era maior em folhas herbáceas. Já Masoodi (1985) também trabalhando com espécies lenhosas, porém frutíferas, relata que a concentração de taninos aumentava conforme ocorria a maturação das folhas.

Na literatura encontram-se opções para o controle da oxidação, como a lavagem dos explantes em água corrente para auxiliar na lixiviação dos compostos fenólicos; a utilização de substâncias antioxidantes como o ácido ascórbico, o ácido cítrico, o PVP (polivinilpirrolidone) e o carvão ativado, seja no meio de cultura ou na forma de banhos. Pode-se também incubar os explantes inicialmente no escuro, o que foi realizado neste trabalho e também há a opção de se realizar a transferência freqüente dos explantes, eliminando as porções escuras e renovando o meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Relatos com a concentração de metabólitos secundários em citronela não foram encontrados na literatura, dessa forma, supõe-se que o aumento ocorrido no inverno e na primavera seja resultante de fatores externos a que as plantas estavam submetidas, ou seja, a variação sazonal.

4.5. PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO

De acordo com a Tabela 10, pode-se observar que em nenhuma das estações houve resultados significativos quanto à porcentagem de contaminação em função da adição de reguladores.

No entanto, houve contaminação em todas as estações do ano e a provável causa é a contaminação endógena das plantas matrizes, visto que estas estavam expostas a vários microorganismos presentes no ambiente. No momento da coleta dos explantes, estes não apresentavam nenhum sintoma visual de doença. Grattapaglia & Machado (1998) relatam que em alguns casos não se percebe a contaminação das plantas visualmente.

Tabela 10: Resumo do quadro de análise de variância para porcentagem de contaminação em explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em função de doses crescentes de IBA (Ácido indolilbutírico) e BAP (Benzilaminopurina) coletados e propagados *in vitro* em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2005.

F.V.	G.L.	Quadrado Médio			
		Outono/5	Inverno/05	Verão/05	Primavera/06
IBA	3	0,6250 ns	0,1536 ns	0,1770 ns	0,2968 ns
BAP	3	0,4166 ns	0,7812 ns	0,1354 ns	0,2786 ns
IBA*BAP	9	0,1180 ns	0,8420 ns	0,2534 ns	0,2369 ns
Resíduo	112				
Total	127				
Média geral (%)		75,56	80,82	90,93	100
C.V.		19,95	26,29	28,08	17,06

ns= não significativo ao teste F

Apesar de se realizar uma desinfestação dos explantes, diversos organismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfetantes e

devem ser controlados ainda na planta matriz, pois as contaminações endógenas representam sério problema no estabelecimento das culturas *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), fazendo-se necessário o aprimoramento nas técnicas de assepsia para o cultivo *in vitro*.

Uma alternativa para controlar os problemas de contaminação é cultivar as plantas matrizes em ambiente protegido conciliado com tratamentos químicos que visam à proteção e garantia de sanidade das plantas matrizes, sendo uma recomendação para a citronela de Java.

Neste experimento não foi possível a identificação dos patógenos encontrados nos explantes cultivados *in vitro*. Alguns produtores de capim-limão (*C. citratus* (DC) Stapf) e citronela de Java (*C. winterianus* Jowitt) da região Oeste do Paraná relatam que um grande problema para essas culturas é a proliferação do fungo do gênero *Fusarium*, que ataca as touceiras devido às mesmas serem muito grandes e fechadas, ocorrendo excesso de umidade em seu interior e a ineficiente incidência de raios solares.

Na espécie de *C. citratus* (DC) Stapf. verificou-se contaminação por *Fusarium* (CZEPAK et al., 2003), além do aparecimento de fungos de ferrugem das folhas e pulgões ou cochonilhas na base das folhas ou nos rizomas (CASTRO & RAMOS, 2002).

4.6. PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

De acordo com a Tabela 11, pode-se perceber aumento na produtividade do óleo essencial da citronela e no rendimento do óleo durante o inverno.

Resultados distintos foram observados por Singh et al. (1994), onde as maiores concentrações de óleo essencial de citronela de Java foram encontradas em plantas coletadas no período do outono. Devido a isso, é importante o estudo da ecofisiologia da planta na região onde se deseja cultivá-la para fins comerciais, pois o clima de uma região pode ser favorável ao desenvolvimento das plantas e pode ser desfavorável em outra.

Tabela 11: Produtividade e média do rendimento do óleo essencial em folhas de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) coletada em cada estação do ano. Marechal Cândido Rondon/PR-UNIOESTE, 2006.

Estação	Produtividade do óleo (Kg ha ⁻¹)	Rendimento de óleo (%)
Verão 2005/06	1,140	0,76 ± 0,1
Outono 2006	0,855	0,57 ± 0,2
Inverno 2006	2,055	1,37 ± 0,3
Primavera 2006	1,155	0,77 ± 0,1

Costa et al. (2004), no município de São Cristóvão-SE, obtiveram maior rendimento do óleo essencial de citronela no verão, outono e na primavera, com rendimento médio de 132,60, 119,08 e 135,29 L ha⁻¹, respectivamente. Independente da época, os autores mencionam que o melhor horário de coleta é durante as primeiras horas da manhã. Os autores mencionam ainda que a época que obtiveram o menor rendimento do óleo foi durante o inverno (38,39 L ha⁻¹), período de chuvas naquela região (Sergipe). Estes resultados discordam dos resultados encontrados neste trabalho, onde o maior rendimento foi obtido no inverno (1,37%).

Os autores relatam ainda que as condições climáticas da região, chuva moderada (100 mm) e temperatura moderada (20 a 30°C) permitem o desenvolvimento da citronela durante o ano todo. Sarma (2002) também relata estas condições como sendo ideais para o rendimento do óleo essencial de citronela.

Vale a pena ressaltar que as condições climáticas podem variar de um ano para o outro, sendo assim, em um ano o inverno pode ser rigoroso e em outro mais brando. Além disso, na região sul do Brasil as estações são bem definidas, o que ocasiona a redução na velocidade de desenvolvimento das plantas em períodos não favoráveis ao crescimento e a retomada do crescimento quando as condições voltam a ser favoráveis.

Durante o período de extração do óleo essencial neste experimento (março de 2006 a outubro de 2006) as condições climáticas variaram de modo que no inverno as temperaturas chegaram a 30°C. E conforme mencionado anteriormente neste trabalho, o ano de 2006 apresentou também um quadro crítico de estiagem (SIMEPAR, 2006). Na Tabela 4 da página 32 deste trabalho, pode-se verificar que a precipitação no mês de julho foi de 15 mm, tornando o clima quente e seco, o que proporcionou um maior rendimento do óleo essencial desta espécie.

Outro fato a ser considerado é o florescimento da citronela, que na região sul ocorre no final da primavera e início do verão (CASTRO & RAMOS, 2003). Durante a condução deste experimento, a citronela encontrou-se com a inflorescência totalmente desenvolvida já no mês de julho, sendo notória a influência da temperatura sobre o florescimento da citronela.

Chiris (1925) avaliou a produção do óleo essencial na parte aérea de menta e observou que no início do florescimento o rendimento era elevado, diminuindo a seguir. Guenter (1943) também observou que o rendimento máximo de óleo

essencial em folhas de *Ocimum gratissimum* foi obtido durante o florescimento e também diminuiu a seguir.

Chalchat et al. (1994) extraíram óleo em diferentes estágios de floração de *Artemisia annua* e verificaram que no pico da floração o rendimento foi maior, ficando na ordem de 0,5 %.

Estes resultados concordam com os resultados encontrados neste trabalho, onde no inverno quando a planta floresceu o rendimento do óleo essencial foi maior e na primavera (época normal para o florescimento da citronela) o rendimento do óleo foi menor.

Apesar de a citronela ser uma espécie muito conhecida, não foram encontrados na literatura dados de anos anteriores referentes à época de colheita e rendimento do óleo essencial na região sul do Brasil, deste modo a comparação fica prejudicada, contudo os dados são de grande valia.

Dias & Oliveira-Filho (1996) relatam que uma das maiores preocupações dos pesquisadores é em relação a fatores externos que acabam acionando respostas endógenas nas plantas, muitas vezes indesejadas.

Novos experimentos com citronela visando estimar a produtividade e rendimento do óleo essencial seriam interessantes. Além disso, o monitoramento da precipitação e da temperatura, bem como o estudo fenológico, principalmente a observação do início do florescimento da espécie poderiam fornecer dados importantes para a implantação comercial da cultura.

No presente trabalho, mesmo com uma precipitação deficiente, a citronela apresentou bom rendimento do óleo essencial no inverno. Shabih Fatima et al. (2002) observaram o comportamento de duas espécies de citronela, *C. martinii* e *C. winterianus* submetidas à estresse hídrico e constataram que a espécie *C.*

winterianus teve seu rendimento do óleo essencial diminuído além de que as concentrações do citronelal, principal constituinte do óleo essencial de citronela, também apresentaram decréscimo.

Baseando-se nos resultados encontrados neste trabalho, fica evidente a importância de estudos acerca de variações sazonais e micropropagação, o que visa atender o mercado atual de plantas medicinais e aromáticas que exige qualidade fitossanitária das plantas, bem como dos princípios ativos nelas encontrados.

5. CONCLUSÕES

- Para o verão a dose de $1,73 \text{ mg L}^{-1}$ produziu 2,87 brotos por explantes de citronela propagados *in vitro*. A adição de IBA, não tem seu uso justificado para a multiplicação dos explantes nesta estação;
- A multiplicação da citronela de Java durante o verão não apresenta problemas com a oxidação dos explantes, fator este limitante para a cultura de tecidos vegetais;
- A formação de calo na base dos explantes de citronela de Java proporcionou um maior número de brotações em explantes coletados no verão
- A sazonalidade não influencia a porcentagem de contaminação de explantes apicais de citronela de Java propagados *in vitro*.
- O maior rendimento do óleo essencial se deu no inverno, período em que ocorreu o florescimento da espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N. de **Isolamento e produção de substâncias de interesse farmacológico de *Hypericum brasiliense* Choisy**. Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia (Tese de Doutorado), Campinas/SP, 2002. 167p.

ALTMAN, A.; GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of *Citrus* bud culture. **Acta Horticulturae**, n.78, p.51-60, 1977.

AMANCIO, V.F.; NASCIMENTO, A.P.B.; SILVA, P. de A.; CARVALHO FILHO, J.L.S. de; SANTOS NETO, A.L. dos; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M.C.; BLANK, A.F. Efeito de recipientes e composições de substratos na produção de mudas de capim-citronela. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.2, p.1-4, 2003. Suplemento2, CD-ROM.

ANDERSON, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, p.343-347, 1984.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. de Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

ARIMURA, C.T.; FINGER, F.L.; TEIXEIRA, J.B. Interação ANAxBAP no desenvolvimento *in vitro* de gengibre. **Acta Horticulturae**, v.569, p.289-291, 2002.

BARSOTTI, D. **Campo limpo**. 2005. Disponível em:
<<http://www.acampolimpo.com.br/repelentes.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2005.

BARTHAKUR, M.; BORDOLOI, D.N. *In vitro* regeneration of Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Herba Hungarica**, v.28, n.3, p.21-26, 1989.

BHIN, L.T.; MUOI, L.T.; OANH, H.T.K.; THANG, T.D.; PHONG, D.T. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.23, p. 67-70, 1990.

BLANK, A.F.; ANDRADE, L.G.; CARVALHO-FILHO, J.L.S.de; SANTANA-FILHO, L.G.M. de; AZEVEDO, V.G.; OLIVEIRA, A. dos S.; MENDONÇA, M. da C.; SILVA-MANN, R. Influência de número de perfilhos e comprimento da folha no plantio de capim-citronela. In: 44º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2004, v.22, Campo Grande, MS.

CABRAL, G.B; PIRES, M.V.V.; LACERDA, A.L.; CARNEIRO, V.T. de C. **Introdução *in vitro*, micropropagação e manutenção de plantas de *Brachiaria* sp.** Comunicado Técnico, n.101, Brasília-D.F. Embrapa/Cenargem, 2003.

CAI, T.; BUTLER, L. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, p.101-110, 1990.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos.** In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.87-132

CAPTAN, E.; OTUKI, M.F.; VIANA, A.M. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.1, p.25-34, março 2001.

CARDOSO, M.G.; GAVILANES, M.L.; MARQUES, M.C.S.; SHAN, A.Y.K.V.; SANTOS, B.R.; OLIVEIRA, A.C.B.de; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, A.P.S. **Óleos essenciais.** Disponível em http://www.editora.ufla.br/boletim/pdfextensao/bol_62.pdf Acesso em 12 dez. 2005.

CARNEIRO, I.F. **Adequação de técnicas de cultura *in vitro* da obtenção de mudas de bananeira (*Musa AAB*) cultivar Maçã.** 1997. 106p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo.** Guaíba, p. 177-179, 1995.

CASTRO, L.O. de; RAMOS, R.L.D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Staupf., capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin) Hack., capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L) Nash, vetiver.** Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 31p. (Boletim FEPAGRO, 11).

CHALCHAT, J.C.; GARRY R.P. e LAMY J.. Influence of harvest time on yield and composition of *Artemisia annua* oil produced in France. **Journal of Essential Oil Research**. v.6, p.261-268, 1994.

CHIRIS, E.A. The cultivation of mints. **Parfums de France**, Mitcham, v.19, p.151-159, 1925.

CHOUDHURY, S.N.; GHOSH, A.C. Effect of clipping height on the oil content of Java citronella (*C. winterianus*). **Indian Journal of Agronomy**, v.40, n.3, p.486-490, 1995.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais : do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, 2. ed., 1998.

COSTA, A.G.; CARVALHO FILHO, J.L.S. de; SANTANA FILHO, L.G.M.; OLIVEIRA, A.dos S.; SANTOS, M da F.; BLANK, A.F. Influência da época, do horário de colheita e da secagem de folhas no teor e rendimento de óleo essencial de capim citronela. In: 44º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2004, v.22, Campo Grande, MS.

CRONQUIST, A. **The evolution and Classification of Floewening Plants**. The New York Botanical Garden Bronx, New York, 2. ed, p. 279, 1988.

CZEPAK, M.P.; DIAZ, H.V.; GUIMARÃES, V.F.; ZIGIOTTO, D.C.; CAMPANA, H.H.F.; CAMPANA, A.P.F. Protocolo para produção *in vitro* de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) livres da infecção de *Fusarium spp.* In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, 2003. p.117

DALL'OGGIO, E.I. **Estabelecimento *in vitro* de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)**. Marechal Cândido Rondon, 2006, 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

DEBIASI, C. **Efeitos de antiauxinas sobre a dominância apical em gemas de bananeira *in vitro* cvs. Grand Naine (AAA), Nanicão (AAA) e Enxerto (AAB)**. Florianópolis, 2000. 100p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. de C. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.1, p.61-65, jan-mar, 2004.

DEOTALE, R.D.; KENE, D.R.; BAKALE, V.L.; PATIL, B.N. Biochemical changes in subabul (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wilt) foliage by application of fertilizers and hormones. **Advances in Agricultural Research in India**, v.1, p.134-145, 1994.

DIAS, H.C.T.; OLIVEIRA FILHO, A.T. de Fenologia de quatro espécies arbóreas de uma floresta estacional semidecídua montana em Lavras, MG. **Revista Cerne**, v2, n1, p.01-16, Lavras-MG, 1996.

DINIZ, J.D.N.; GOMES, S.O.; INNECO, R.; ALMEIDA, J.L. e COSTA, J.T.A. Avaliação dos efeitos da quebra da dominância apical e do BAP na multiplicação *in vitro* de *Heliconia stricta* Huber. **Revista Ciência Agronômica**, vol. 35, Número Especial, out. 2004: 232-237.

DRUART, P. La micropropagation em arboriculture fruitiere. **Le Fruit Belge**, v.49 n.396, p. 292-298, 1981.

EDWARDS, P.J.; WRATTEN, S.D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: EPU, 1981. 71p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu São Paulo, 1988.

FRANCIS, M.J.O. In: Goodwin T. W. (ed.), **Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry**. Academic Press, London, 29 p, 197

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Exegetic Limited, 1993. 574p.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture, handbook and diretory of commercial laboratories**. Everley: Exegetics, 1984. 709 p.

GETACHEW, G. **Tannins in tropical multipurpose tree species: localization and quantification of tannins using histochemical approaches and the effect os tannins on *in vitro* rumen fermentation**. Stuttgart: Veralg Ulrich E. Gauer, 1999, 186p.

GIRARD, E.A. **Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em floresta ombrófila mista**.

Curitiba, 2005, 60p. Universidade Federal do Paraná-UFPR. Dissertação de Mestrado.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão acadêmica**, Curitiba, V.4, n.2, p.137-144, jul-dez./2003.

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

GREWAL, S.; AHUJA, A.; ATAL, C.K. *In vitro* proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Indian Journal of Biology**, v.18, p.775-777, 1980.

GUENTER, E. **The essential oil: individual essential oils of the plant family Labiateae**. New York: D. Von Nostrand, v3, 777p., 1943.

GUPTA. P.K. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 6, p. 33-39, 1986.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIS JUNIOR, F.T; GENEVE, R.L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7 ed. New York: Englewood Clippings, 880p., 2002.

HASEGAWA, P.M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 105, p. 216-220, 1980.

HONNER, J.D. Adstringency of Douglas-fir foliage in relation to phenology and xylem pressure potential. **Journal of Chemical and Ecology**, v.14, n.4, p.1227-1237, 1988.

HU, Y.; WANG, P.J. **Meristem, shoot tip and bud culture**. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.; (ed.) Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.

IRITANI, C.; SOARES, R.V.; GOMES, A.V. Aspectos morfológicos da aplicação de reguladores do crescimento nas estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Acta Biológica Paranaense**. Curitiba, v.15, p.21-46, 1986

- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
- KRAPIEC, P.V.; MILANEZE, M.A.; MACHADO, M.F.P.S. Efeito de combinações de diferentes reguladores de crescimento a partir da indução de botões de plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá-PR, v.25, n.1, p.179-182, 2003.
- LABINAS, A.M.; CROCOMO, W.B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum**, Maringá-PR, v.24, n.5, p.1402-1404, 2003
- LALIBERTE, S.; LALONDE, M. Sustained caulogenesis in callus cultures of *Larix X Eurolepis* initiated from short shoot buds of a 12-year-old tree. **American Journal of Botany**, v.75, p.767-777, 1988.
- LÁSZLÓ, F. **Capins: capim cidreira, limão e gengibre, palmarosa, jamrosa e citronela**. Disponível em: <http://www.aromalandia.org/capins.htm>. Acesso em 15 abr 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Plantarum, 2002. 515p.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 220p.
- MARTINS, P.M. **Influência da temperatura da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf.)**, Viçosa-MG.:UFV, 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- MARTINS, R.M. **Estúdio *in vitro* de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em la garrapata *Boophilus microplus***. Disponível em: http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v8_n2_2006/resumo12_v8_n2_2006.pdf. Acesso em 10 ago. 2006.
- MASSOODI, M.A. Growth response of *Lymantria obfusata* Walker in relation to tannin content in different host foliages. **Indian Journal of Entomology**, v.47, n.4, p.422-426, 1985.
- MERKLE, S.A.; PARROTT, W. A.; WILLIAMS, E. G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: BHOJWANI, S. S. (ed). **Developments in**

Crop Science, 19, Plant Tissue Culture: Applications & limitations, Amsterdam-Oxford-Tokyo, Elsevier, p. 67-101, 1990.

MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia Alba* (Mill) N. E. Br.-Verbenaceae**. Curitiba: UFPR, 1992, 206 p. (Tese mestrado).

MING, L.C. Mesa redonda sobre plantas medicinais no ensino de 3º .In: **Congresso sul-brasileiro de Plantas Mediciniais**, 1, 1999, Maringá-PR.

MIRANDA, P. **Segredos e Virtudes das Plantas Mediciniais**. 1998. Disponível em: <http://www.winbr.com/abc/medicina.htm>.

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

NACHTIGAL, J.C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R.A.; MAZZINI, A.R.A. de. Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indol butírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas, v.16, n.1, p.229-235, 1994.

NIN, S.; MOROSI, E.; SCHIFF, S.; BENNICI, A. Callus cultures of *Artemisia absinthium* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 45, n. 1, p. 67-72, Apr. 1996.

NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de Copaíba. **Revista biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, julho/dezembro, 2004. p.109-130

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal:UNESP, 1996. 81p.

PAIVA, P.D. de O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M.; PAIVA, L.V. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, set.out., 2004.

PARANÁ (Estado). Casa Civil do Governo do Estado do Paraná. **Decreto nº 4682. Diário Oficial nº6958 de 19/04/2005**. Disponível em: <http://celepar7cta.pr.gov.br/SEEG/sumulas>. Acesso em 10 out 2006.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação da laranja Valencia através da cultura de tecido de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 2, n.6, p.723-726, 1989.

PREVISÃO CLIMÁTICA PARA O INVERNO/2006. Disponível em: <http://www.simepar.br/tempo/clima/inverno2006.htm>. Acesso em 12 out 2006.

QI-GUANG, Y.; READ, P.E.; FELLMAN, C.D.; HOSIER, M.A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on chinese chestnut cultured *in vitro*. *Hort Science*, v.21, p.133-134, 1986.

QUEIROZ, F. **Estudo da cinética da extração do óleo essencial de capim-limão com dióxido de carbono líquido.** Campinas, SP: Unicamp, 1993. 156 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, 1993.

QUOIRIN, M.; BOXUS, P.; GASPAR, T. Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants. **Physiologie Vegetale**, v.12, p.165-174, 1974.

RAJESWARA RAO, B.R. Biomass yield and essential oil yield variations in Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), intercropped with food legumes and vegetables. **Journal Agronomy & Crop Science**, n.185, p.99-103, 2000.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 906 p.

REINERT, J.; WHITE, P.R. The cultivation *in vitro* of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*. **Physiologia Plantarum**, v.9, p.177-189, 1956.

REIS, A.F.; LATADO, R.R.; TULMANN NETO, A. Micropropagação de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). In: 7 Simpósio de Iniciação Científica da USP, 1999, São Paulo. Anais do 7 Simpósio de Iniciação Científica da USP, 1999.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia.** São Paulo: Premier, 1997. 327p.

ROCHA, R.P. **Avaliação do processo de secagem e produção de óleo essencial de guaco.** UFV. Viçosa, 2002. 57p.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. da. Multiplicação *in vitro* da ameixeira "Santa Rosa": efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 365-367, agosto 2003.

SAHOO, S.; DEBATA, B.K. Recent advances in breeding and biotechnology of aromatic plants: *Cymbopogon* Species. **Plant Breeding Abstracts**, V.65, n.12, 1995.

SALGADO, P.R. **Fenóis totais no cafeeiro em razão das fazes de frutificação e do clima.** Piracicaba/SP, 2004. 60 p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". (Dissertação de Mestrado)

SARMA, T.C. Variation in oil and its major constituents due to season and stage of the crop in Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.). **Journal of Spices and Aromatic Crops**. 2002, public. 2003, 11:2, 97-100.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, V.C. de Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SELBY, C.; HARVEY, B.M.R. The influence of natural and *in vitro* bud flushing on adventitious bud production in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bud and needle cultures. **New Phytologist**, v.100, p.549-562, 1985.

SHABIH FATIMA, A.H.; FAROOQI, A.; SHARMA, S. Physiological and metabolic responses of different genotypes of *Cymbopogon martini* and *C. winterianus* to water stress. **Plant growth regulation**, n.37, p.143-149, 2002.

SIANI, A.C; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos Essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; SALES, J.F.; DIVINO, S. de P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja **Ciência e agrotecnologia**., Lavras. v.27, n.3, p.541-547, maio/jun., 2003.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VIZZOTTO, V. J.; GIORGI, E.; MACEDO, S. G.; MARQUES, L.F. **Plantas medicinais, caracterização e cultivo**. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 71p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 68).

SILVA, J.A.B.; LAGOA, A.M.M.A.; MACHADO, E.C. Teores de ácido abscísico (ABA) e ácido 3-indol-acético (AIA) em órgãos florais de laranjeiras com clorose variegada dos citros (CVC). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 9., 2003, Atibaia. **Resumos...** Atibaia: IAC, UNICAMP, USP, 2003, p. 240.

SILVA, P.C. de S.C. **Efeitos da variação sazonal na produção de compostos ativos em *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray, utilizando ensaio com microorganismos.** Piracicaba, 2004 (Dissertação Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

SILVA, P.A.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.de F.; BARRETO, M.C.de V. Efeitos da adubação orgânica e mineral na produção de biomassa e óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 1, p.05-09, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 1999.

SIMON, J. E. Essential oils and culinary herbs. In: Janick and J. E. Simon (Eds). **Advances in New Crops.** Timber Press, Portland, OR.P.472-483. 1990

SINGH, A.K.; NAQVI, A.A.; RAM, G.; KAMLA, S.; SINGH, K. Effect of hay storage on oil yield and quality in three *Cymbopogon* species (*C. winterianus*, *C. martinii* and *C. flexuosus*) during different harvesting seasons. **Journal of Essential Oil Research**, v.6, n.3, p. 289-294, 1994.

SOUSA, C.M.; MIRANDA, R.M. Efeito do tipo de explante e da relação AIB/BAP na micropropagação de *Catharanthus roseus*. **Revista. Universidade Rural- Série. Ciência da Vida**, Suplemento. Seropédica –RJ. V.22, n.2, p.217-222, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2004.

TAWATSIN, A.; WRATTEN, S.D.; SCOTT, R.R.; THAVARA, U.; TECHADAMRONGSIN, Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, v.26, n.1, p.76-82, 2001.

THAPPA R.K.; BAKSHI, S.K.; DHAR, P. L.; AGARWAL, S.G.; KITCHLU, S.; KAUL, M.K. Significance of changed climatic factors on essential oil composition of *Echinacea purpurea* under subtropical conditions. **Flavour and Fragrance Journal.** Índia. v.5, n.19, p. 452-454, 2004.

THORPE, T.A. Morphogenesis and Regeneration. In: VASIL I.K.; THORPE T.A. (ed). **Plant Cell and Tissue Culture**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 1994. p.17-36.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Boletim técnico n. 174. Campinas, Instituto Agronômico, 1998. 72p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, v.1, p.183-242. 1998.

TRIPPLEBROOKFARM. *Cymbopogon nardus*. Citronela grass. Disponível em : http://www.tripplebrookfarm.com/splants/namesearch_frameset.html. Acesso em 06 fev. 2006.

UNIVERSITY of HAWAII. Botany Department. Poaceae (Gramineae). Disponível em: <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/po.htm> . Acesso em 06 fev. 2006.

VIEIRA, L.C. **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. 347 p.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O.; **Óleo essencial de Eucalipto** São Paulo, 2003. 26p. Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. (Documentos,17)

WACHOWICZ, C.M.; CARVALHO, R.I.N. **Fisiologia Vegetal: Produção e pós-colheita**. Curitiba: Editora Universitária Champagnat, 2002, 424p.

ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. **Action of growth regulators**. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J., ed. Tissue culture in forestry. 2. ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.231-255.

ZIGIOTTO, D.C. **Micropropagação de Citronela (*Cymbopogon winterianus*)**. Marechal Cândido Rondon, 2004. Monografia (conclusão de curso). Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, p.34-38, 1985.

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. **Estaquia: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos**. Curitiba: [K. C. Zuffellato-Ribas], 2001. 39p.