

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

ELISIANE INÊS DALL'OGLIO

ESTABELECIMENTO "IN VITRO" DE CITRONELA DE JAVA
(*Cymbopogon winterianus* Jowitt)

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ
SETEMBRO / 2006

ELISIANE INÊS DALL'OGGIO

ESTABELECIMENTO "IN VITRO" DE CITRONELA DE JAVA
(*Cymbopogon winterianus* Jowitt)

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. VANDEIR
FRANCISCO GUIMARÃES

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ
SETEMBRO / 2006



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon – CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 – Centro – Cx. P. 1008 – <http://www.unioeste.br>
Fone/Fax (45) 3254-3216 – CEP 85960-000 – Marechal Cândido Rondon – PR

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Bióloga ELISIANE INÊS DALL’OGLIO. Aos dezenove dias do mês de setembro do ano de 2006, às 14 horas, sob a presidência do Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães, em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Dissertação da Bióloga Elisiane Inês Dall’Oglio, aluna do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Mestrado com área de concentração em “PRODUÇÃO VEGETAL”, visando à obtenção do título de “MESTRE EM AGRONOMIA”, constituída pelos membros: Dr^a. Márcia **de Moraes Echer**; Prof^a. Dr^a. **Andréa Maria Teixeira Fortes** (Unioeste/CCBS) e Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador – Unioeste).

Iniciados os trabalhos, a candidata submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: “Estabelecimento “in vitro” de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt).”

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Dr^a. Márcia **de Moraes Echer** Aprovada
Prof^a. Dr^a. **Andréa Maria Teixeira Fortes** Aprovada
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador) Aprovada

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de “MESTRE EM AGRONOMIA”, área de concentração: “PRODUÇÃO VEGETAL”. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora e por mim, Secretária.

Marechal Cândido Rondon, 19 de setembro de 2006.

Dr^a. Márcia **de Moraes Echer**

Prof^a. Dr^a. **Andréa Maria Teixeira Fortes**

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador)

Noili Batschke – Secretária

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos adorados familiares e amigos que fizeram parte dessa longa caminhada que parecia sem fim, principalmente pelas dificuldades pessoais de toda ordem, que me atropelaram, porém essas, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em uma larga estrada, margeada de flores, frutos e belas árvores.

Dessa forma, dedico algumas palavras àqueles que fizeram parte deste trabalho direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

À Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade concedida, pela força renovada todos os dias, que me ajudaram em mais esta fase da minha vida.

Aos meus pais, Alice e Luiz Antônio Dall'Oglio pela sólida formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado, apoiando e incentivando-me em todos os momentos.

Principalmente a você mãe que sempre agiu com paciência, compreensão e amor para comigo, não me deixando cair nem desistir dos meus objetivos, o meu eterno agradecimento.

Ao meu amado marido Uriel Ruela Chaves pelo companheirismo ao longo dessa jornada, o qual sempre esteve ao meu lado, me ajudando e acreditando em mim, por sua compreensão e encorajamento a prosseguir mesmo quando parecia impossível.

Ao meu irmão Eder Dall'Oglio que mesmo de longe, sempre acompanhou esta caminhada e acreditou que ela fosse concretizada.

À minha avó de saudosa memória, Ignez Tonin Citadin, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de vida.

A minha tia avó Mercedes Ângela Gehlen pela hospitalidade, pela disposição de servir e principalmente pela oportunidade de convivência, a qual me proporcionou um aprendizado que levarei para vida toda.

Ao meu querido orientador, professor Dr. Vandeir Francisco Guimarães, minha eterna gratidão pela confiança em mim depositada, pela colaboração com o meu trabalho e, sobretudo por possibilitar reflexões que contribuíram significativamente para o meu crescimento como pesquisadora.

À Profª. Drª. Márcia de Moraes Echer pela amizade e exemplo de perseverança que me ajudaram a não desistir.

À Profª. Suzana Stefanello pela amizade, apoio e encorajamento durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Renato Stangarlin como coordenador da pós-graduação e professor sempre ajudando de forma positiva e segura.

A Prof. Vanda Pietrowski pela colaboração no empréstimo da câmara fotográfica durante a realização do trabalho.

Ao amigo Darci da Fontoura pela amizade, pelas idas e vindas de Toledo / Rondon e principalmente pela agradável convivência durante esses dois anos, além da colaboração na tradução do resumo.

A amiga Luciani Márcia Scherer pela ajuda e colaboração na realização do meu experimento, cuja convivência interativa me permitiu ensinar e aprender.

A amiga Daniela Cristiane Zigiotta por ter possibilitado a continuação deste trabalho.

Aos colegas do curso, pelo agradável convívio, que oportunizou trocas de experiência, tanto de vida quanto de profissão.

O meu muito obrigada a fantástica equipe de professores pela paciência, disponibilidade e eficiência em estimular o processo de aprendizagem. Da mesma forma, agradeço o empenho dos funcionários da instituição, em destaque à secretária Noili Batschke e ao laboratorista e colega Gilmar Franzener que sempre providenciaram excelente suporte em todos os momentos.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade única concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - que me concedeu uma bolsa durante o segundo ano do mestrado, fato este que muito contribuiu para a conclusão do mestrado.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	15
2.2 CITRONELA DE JAVA (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt).....	17
2.2.1 Caracterização Botânica e Centro de Origem.....	17
2.2.2 Cultivo da Citronela de Java	19
2.2.3 Importância Econômica da Citronela de Java	20
2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 EXPERIMENTO 1: ASSEPSIA DE EXPLANTES DE <i>C. winterianus</i>	28
3.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE TIPOS DE EXPLANTE DE <i>C. winterianus</i> PARA O CULTIVO “IN VITRO”	31
3.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DE REGULADORES VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO “IN VITRO” DE <i>C. winterianus</i> E A ACLIMATAÇÃO DAS PLÂNTULAS	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 EXPERIMENTO 1: ASSEPSIA DE EXPLANTES DE <i>C. winterianus</i>	36

4.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE TIPOS DE EXPLANTE DE <i>C. winterianus</i> PARA O CULTIVO “IN VITRO”	39
4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DE REGULADORES VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO “IN VITRO” DE <i>C. winterianus</i> E A ACLIMATAÇÃO DAS PLÂNTULAS	47
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

1	Assepsia de explantes de <i>Cymbopogon winterianus</i>	30
2	Tipos de explantes de <i>Cymbopogon winterianus</i> para o cultivo “in vitro”	32
3	Plântulas de <i>Cymbopogon winterianus</i> cultivadas “in vitro” prontas para a fase de aclimação.....	34
4	Aclimação de plântulas de <i>Cymbopogon winterianus</i> cultivadas “in vitro”..	35
5	Percentagem de contaminação e percentagem de oxidação de explantes apicais de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) em função do tempo de exposição à solução de hipoclorito de sódio a 0,5%	36
6	Número de brotações por explantes de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) em função da concentração de BAP na solução nutritiva e do tipo de explante utilizado, independente da concentração de IBA no meio de cultura	39
7	Multiplicação dos explantes de <i>Cymbopogon winterianus</i> cultivados “in vitro”, após subcultivos. Plântulas de <i>C. winterianus</i> comprometidas pela permanência em meio de cultura	49
8	Plântulas de <i>Cymbopogon winterianus</i> durante a fase de aclimação	51

LISTA DE TABELAS

1	Número de brotações por explantes de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 1,0 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP)	40
2	Percentagem de explantes de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) que formaram calo, em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 1,0 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP)	42
3	Número de brotações por explantes de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 2,0 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP)	43
4	Percentagem de explantes de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) que formaram calo, em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 2,0 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP)	45
5	Número de brotações por explantes e altura do explante de citronela de Java (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt) em função da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 2,0 mg L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e do tempo após a inoculação	47

RESUMO

A citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) é uma planta aromática muito utilizada na fabricação de repelentes contra mosquitos por conter óleo essencial rico em citronelal. A utilização da cultura de tecidos, como forma de propagação de plantas medicinais tem aumentado significativamente, pois os métodos convencionais de propagação limitam o potencial de uso de algumas plantas. Sendo assim, um protocolo regenerativo para a citronela de Java foi estabelecido com o objetivo de se obter uma técnica alternativa para a propagação dessa cultura. Para isso foram realizados quatro experimentos envolvendo a avaliação do tempo de assepsia, do tipo de explante, do efeito de reguladores vegetais na propagação “in vitro” da citronela de Java, bem como a aclimação das plântulas micropropagadas. Os resultados obtidos revelaram que a utilização do hipoclorito de sódio (0,5%) por 30 minutos promoveu índice satisfatório de assepsia. Os explantes com maior potencial ao desenvolvimento “in vitro” foram os ápices caulinares. Verificou-se que o emprego da citocinina benzilaminopurina (BAP) é indispensável para o sucesso do estabelecimento “in vitro” da citronela de Java, podendo ser utilizado na concentração de 2,0 mg L⁻¹. No entanto, a utilização do ácido indolbutírico (IBA) nas diferentes concentrações testadas não apresentou resultados que justifique seu emprego, tanto na multiplicação quanto no enraizamento das plântulas de citronela de Java. O enraizamento foi evidenciado quando as plântulas micropropagadas foram inoculadas somente em meio de cultura MS. Foi constatado que na testemunha (sem regulador vegetal) houve uma organogênese direta, não sendo verificada nos demais tratamentos. Na aclimação das plântulas micropropagadas verificou-se que a utilização do método “floating”, foi fundamental para a sobrevivência das plântulas, tendo sido observado alto índice de sobrevivência.

Palavras-chave: propagação “in vitro”, ápices caulinares, benzilaminopurina, ácido indolbutírico.

ABSTRACT

Establishment "in vitro" of citronella of Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)

Citronella of Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) is an aromatical plant with large usage in the manufacture of mosquito repellents because it contains essential oil rich in citronelal. The application of tissue culture on a large scale in medicinal plants production has increased significantly, since the conventional methods of propagation limit the potential use of some plants. Due that, one citronella of Java protocol was established with the objective of getting an alternative technique for the propagation of that culture. Four experiments were conducted to evaluate the asepsis time, the explant type, the effect of vegetal regulators on the "in vitro" propagation of citronella of Java, as well as the micro-propagated seedling acclimatization. The gotten results had disclosed that the use of sodium hypochlorite (0.5%) during 30 minutes promoted a satisfactory asepsis index. The shoot tips explants type showed greater potential for the "in vitro" development. It was verified that the use of benzilaminapurine (BAP) cytokynin is indispensable to succeed in the citronella of Java "in vitro" establishment, being able to be used in the concentration of 2.0 mg L⁻¹. However, the use of indolbutyric acid (IBA) in the different tested concentrations did not present any results that justify its use, neither in the citronella of Java multiplication nor in the root establishment. The root establishment was evidenced when micro-propagated seedlings had been inoculated only in MS culture medium. It was verified that the check (without vegetal regulator) had a direct organogenesis, while such event was not verified in the other treatments. In the micro-propagated seedling acclimatization it was verified that the use of the floating method, it was essential for the seedlings survival, resulting in high survival index.

Key words: "in vitro" propagation, shoot tips, benzylamino purine, indol butyric acid.

1 INTRODUÇÃO

A citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) é uma planta aromática muito utilizada na fabricação de repelentes contra mosquitos por conter óleo essencial rico em citronelal e geraniol (SIMON, 1990). As sementes dessa planta medicinal não cumprem sua função reprodutora, não sendo viável esse meio de propagação, mas sim por meio da divisão de touceiras, sendo isso um agravante devido ao alto índice de contaminação das plantas por diferentes patógenos (CASTRO & CHEMALE, 1995).

Nos últimos anos, técnicas biotecnológicas têm sido empregadas como alternativa para auxiliar na obtenção de plantas livres de patógenos. Uma das técnicas utilizadas é a da cultura de tecidos que permite a obtenção de plantas em curto espaço de tempo, sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais controlados. Esta técnica se baseia, principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese somática) que regeneram numa planta completa (TORRES et al., 2000 e CID, 2001).

A micropropagação é a propagação vegetativa “in vitro” de maior aplicação prática dentro da cultura de tecidos, por ser utilizada principalmente na limpeza clonal e em plantas de difícil multiplicação pelos métodos convencionais. Esta técnica permite a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes, em curto período de tempo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Porém, para maximizar o desenvolvimento “in vitro” de uma determinada espécie são necessários ajustes no balanço de nutrientes e reguladores vegetais, bem como nas condições de cultivo (CALDAS et al., 1998).

O desenvolvimento de protocolo regenerativo, destacando a cultura da citronela de Java é relevante, por sua importância econômica e problemas relacionados à incidência e aumento de contaminação por patógenos diagnosticado por pequenos produtores, na região oeste do Paraná, destacando-se os fungos de solo.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou desenvolver um protocolo regenerativo para citronela de Java por meio da técnica de propagação “in vitro”, avaliando o tempo de assepsia, o tipo de explante, o efeito de reguladores vegetais na propagação “in vitro” da citronela de Java, bem como a aclimação das plântulas micropropagadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

O uso das plantas medicinais é tão antigo quanto à história da humanidade, sendo encontrado em todas as populações e grupos étnicos conhecidos. Recorrer às virtudes curativas de alguns vegetais foi uma das primeiras manifestações do homem, marcando um antigo desejo de compreender e utilizar a natureza como um recurso terapêutico (RIBEIRO, 1995).

Em todas as fases de desenvolvimento das civilizações, houve sempre uma estreita relação entre o homem e as plantas consideradas curativas, por isso a história da utilização das plantas medicinais e aromáticas pelo homem, pode ser dividida em quatro períodos distintos: o da Antigüidade; o das civilizações clássicas dos gregos e romanos; outro da Idade Média que inclui as grandes explorações e o colonialismo; e a dos tempos modernos (GIACOMETTI, 1989 e SIMÕES et al., 1989).

Com base na evolução histórica do uso de plantas medicinais e aromáticas, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1978, passa a reconhecer a fitoterapia como terapia alternativa de eficácia comprovada (OLIVEIRA & AKISUE, 2000).

Desta forma, a fitoterapia representou por muito tempo a principal forma terapêutica realizada de maneira empírica pela população. Contudo, a partir dela foram descobertos os princípios ativos, ou seja, os componentes químicos existentes

na planta que conferem sua ação terapêutica peculiar usados na medicina tradicional (CORRÊA et al., 1998).

Na busca por novas substâncias terapêuticas a pesquisa científica vem se utilizando de vários processos como, a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, a extração, isolamento e purificação de novos compostos (principalmente de origem vegetal). Entretanto, as plantas medicinais e aromáticas não devem servir apenas como matéria-prima para ponto de partida na descoberta de novas moléculas, mas sim um recurso natural potencialmente ativo como fitoterápico padronizado e eficaz (CORRÊA JUNIOR et al., 1991 e OLIVEIRA & AKISUE, 2000).

As plantas aromáticas, além de fornecedoras de óleos voláteis ou essenciais, são também medicinais e estão presentes no cotidiano das pessoas. Elas têm sido continuamente usadas na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, por delas serem extraídas substâncias voláteis que conferem ou modificam sabor em alguns alimentos, compõem perfumes e outros cosméticos, e também como medicamentos analgésicos, antissépticos, sedativos, expectorantes, estimulantes, estomáquicos, entre outros (CRAVEIRO et al., 1981 e SILVA, 2004).

Essas substâncias voláteis que são conhecidas como óleos essenciais, são sintetizadas em um grande número de plantas como subproduto do metabolismo secundário em resposta às necessidades ecológicas e de desenvolvimento da planta (VOLÁK & STODOLA, 1990).

Os vegetais são mais ricos em essência quando o tempo é estável, quente e ensolarado, estes óleos são extraídos de plantas frescas ou secas, normalmente através da destilação por arraste com vapor d'água de flores, folhas, cascas, frutos e sementes de plantas aromáticas, sendo que os mais conhecidos e utilizados são

constituídos basicamente por duas classes de compostos, os terpenos (mais abundantes) e os fenilpropenos (VOLÁK & STODOLA, 1990 e SILVA, 2004).

O Brasil mantém um comércio externo de plantas medicinais e aromáticas bastante expressivo e muitas destas espécies têm sido exportadas com base na exploração puramente extrativista. Dias (1993) ressalta que as espécies nativas e exóticas de valor econômico e de grande demanda interna e externa, devem ser alvo de estudos visando seu cultivo.

Devido a isso, mais recentemente o estudo das plantas medicinais e aromáticas está sendo abordado também sob o enfoque agrícola, servindo como alternativa de produção para pequenos, médios e grandes produtores. Já existem no Brasil, na Região Sul, cooperativas de pequenos produtores de plantas medicinais, que estão colocando seu produto no mercado interno e em alguns países do Mercosul, dentro dos melhores padrões de qualidade (MING, 1999).

2.2 CITRONELA DE JAVA (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)

2.2.1 Caracterização Botânica e Centro de Origem

A citronela, como é conhecida popularmente no Brasil, é uma espécie da família Poaceae, pertencente ao gênero *Cymbopogon*, a qual apresenta duas espécies distintas, *Cymbopogon nardus*, conhecida como citronela do Ceilão, e *Cymbopogon winterianus*, conhecida como citronela de Java. A citronela do Ceilão provavelmente se originou como uma forma distinta de outra espécie selvagem,

chamada *Cymbopogon confertiflorus*, e a citronela de Java por sua vez é outra variação da mesma citronela do Ceilão (CRONQUIST, 1988 e CASTRO & RAMOS, 2002).

A planta é perene, herbácea, cespitosa, medindo em torno de 0,80 a 1,20 metros de altura, sendo seu caule rizomatoso, curto, semi-subterrâneo e nodoso, possui raízes fortes, fibrosas e longas. Deste rizoma emergem brotações achatadas firmadas pelas bainhas compridas de inúmeras folhas planas, inteiras, lanceoladas, estreitas, longas (0,50 - 1,00m), invaginantes, de bordos ásperos e cortantes, com nervuras paralelas e ápice acuminado. Possui aroma intenso que lembra a planta *Eucalyptus citriodora* (CASTRO & CHEMALE, 1995 e CASTRO & RAMOS, 2002).

Suas flores são complexas, com brácteas protetoras, reunidas numa grande inflorescência em panícula formada por racemos curtos, germinados e protegidas pelas glumas. Possuem dois tipos de flores: uma andrógina e uma masculina ou neutra. As andróginas estão em espiguetas sésseis e protegidas por uma bráctea. Ao contrario do que ocorre com o capim-limão, a citronela floresce no Rio Grande do Sul, no início do verão, porém suas sementes são inviáveis. Em geral as sementes não cumprem sua função reprodutora, não sendo viável esta forma de propagação para esta espécie. No entanto, seus frutos são constituídos de cariopses oblongas envolvidas pelas glumas, com hilo puntiforme segundo descrição de Castro & Chemale (1995).

O *Cymbopogon winterianus* Jowitt é originário da Índia e foi introduzido no Brasil em meados do século XVIII, sendo que 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).

2.2.2 Cultivo da Citronela de Java

Segundo Castro & Chemale (1995) a citronela de Java é cultivada no Leste Asiático para a produção de óleo essencial usado em perfumaria. No Brasil é mais cultivada na fronteira com o Paraguai e Argentina e em zonas tropicais brasileiras, pois se adapta melhor em clima tropical ou subtropical, não suportando frios ou geadas. No seu período de crescimento é exigente em chuvas, no entanto, o excesso de chuvas na colheita pode baixar o teor de óleo essencial, sendo também exigente em luz (intensidade e horas) e calor. É cultivado a pleno sol, vegetando em solo areno-argiloso a francos, permeáveis e férteis, preferindo solos altos, secos, sem umidade excessiva.

A propagação desta espécie se dá por meio da divisão de touceiras, ou seja, simplesmente a separação das touceiras da planta para serem transplantadas no local definitivo, onde as mudas devem trazer algumas raízes aderidas, sendo que não se deve deixar secar as raízes. Recomenda-se plantar no mesmo dia em que foram arrancadas do solo, aproveitando os dias encobertos para o plantio, também se faz necessário uma poda da parte aérea em qualquer época do ano, para estimular o seu desenvolvimento (BLANCO, 2000). De acordo com Choudhury & Ghosh (1995), a colheita deve ser feita a altura de corte de 30 c.m, por produzir o mais alto valor de matéria seca e rendimento em óleo essencial de citronela.

As espécies medicinais e aromáticas normalmente apresentam alta resistência ao ataque de pragas e doenças, mas, por algum desequilíbrio, este pode ocorrer em níveis prejudiciais, sendo que num ambiente equilibrado, com plantas bem nutridas, a possibilidade de ataque diminui. O uso de produtos químicos (agrotóxicos) é condenado para o cultivo de espécies medicinais, isto se justifica

pela ausência de produtos registrados para estas espécies, conforme exigência legal, e pelas alterações que tais produtos podem ocasionar nos princípios ativos, por isso nunca devem ser usados defensivos agrícolas que não sejam naturais (MARTINS et al., 2000).

O mais indicado a ser feito é o processo de rotação de culturas e a associação de plantas que repelem alguns insetos (CORRÊA et al., 1998). Na cultura da citronela não se conhece a ocorrência de pragas e doenças segundo Castro & Chemale (1995). Porém em alguns países, principalmente da Ásia tem-se verificado a presença de algumas doenças e pragas (ALAM et al., 1992; ALAM et al., 1994; ALAM & SATTAR, 2000; RAO et al., 2004; SINGH et al., 1997 e SONTAKKE et al., 1991).

Na espécie de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., verificou-se contaminação por *Fusarium spp* (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).

2.2.3 Importância Econômica da Citronela de Java

Nas últimas décadas, a procura por produtos naturais tem envolvido não só os naturalistas, mas também pesquisadores e todos aqueles que procuram investigar e divulgar os benefícios desses produtos. Por isso, tem havido um grande incremento no número e na quantidade empregada destas substâncias nas indústrias. Dentre os fatores que provocaram este incremento, é importante destacar a exigência do mercado por produtos livres de poluentes e contaminantes, ou seja,

considerados naturais. Desta forma, a demanda por óleos essenciais, provindo de plantas aromáticas, está em expansão no cenário mundial (VERLET, 1993).

A citronela por ser uma planta aromática, ficou bem conhecida por fornecer a matéria-prima, ou seja, óleo essencial, para a fabricação de repelentes contra insetos. Porém, bem antes do advento dos sprays inseticidas químicos a citronela do Ceilão, já era utilizada contra os insetos, no entanto os mosquitos não fazem distinção entre as espécies de citronela, pois sua aversão na verdade é ao citronelal, constituinte que está em maiores níveis na citronela de Java, sendo este o princípio ativo responsável pelo potencial repelente da planta (BARSOTTI, 2005).

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).

De acordo com o artigo Curiosidades do mundo natural (2002), a citronela de Java tem um aroma agradável, que lembra um pouco o do eucalipto. Devido a isso, tem sido usada na aromaterapia, pois os terapeutas passaram a pesquisar mais a fundo suas qualidades a nível físico e mental e constataram que ela funciona como antidepressivo, anti-séptico, desodorante, tônico e estimulante; e também em produtos de perfumaria.

No entanto, o mesmo cheiro que agrada tanto aos homens é insuportável aos insetos, característica que faz dela um repelente natural, pois afasta os insetos sem matá-los, não poluindo o ambiente, desta maneira não afeta o equilíbrio ecológico (BARSOTTI, 2005).

Devido suas propriedades repelentes, esta planta que se parece com o capim, quando plantada em local ensolarado e com passagem de vento, o cheiro se espalha e espanta os insetos. A citronela pode ser utilizada para tratar a febre, assim como doenças da pele, por ter ação bactericida, fungicida e esterilizante, sendo indicada também para tratar cólicas de animais. Além de benéfica, a planta é de aparência atraente, capaz de compor um visual estético interessante e combater a erosão do solo (CITRONELA DE JAVA, 2004).

O óleo da citronela de Java é um dos mais usados em perfumaria, devido ao seu elevado conteúdo de citronelal (até 50% do volume total) e geraniol (até 45%), que são utilizados como ponto de partida para perfumes que são isolados e fracionados do óleo (SIMON, 1990).

O método industrial de extração do óleo essencial da citronela é conhecido como "arraste de vapor d'água", onde as folhas são colocadas num recipiente e passam a receber vapor d'água constantemente. A água é aquecida em uma caldeira, que ao passar pelas folhas da planta, o vapor leva junto o óleo essencial, separado da água, em seguida, por condensação (SILVA, 2004). Este óleo tem sido empregado também em inflamações articulares, reumatismo e até contra Lesão por Esforço Repetitivo (LER) tem mostrado resultado (LÁSZLÓ, 2000).

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).

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 os *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.

Ainda que outros países antes não-produtores tenham entrado no mercado mundial e seu preço oscilado, com freqüentes baixas, a demanda na produção da citronela ainda tem sido elevada, onde os preços conseguidos permitem ainda o cultivo desta cultura em escala econômica (CASTRO & RAMOS, 2002).

2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A biotecnologia vem sendo utilizada pelo homem há mais de 10.000 anos atrás, quando ao domesticarmos plantas e animais, já se introduzia mesmo sem o conhecimento das técnicas biológicas, o conceito de biotecnologia. Pois define-se como biotecnologia o conjunto de técnicas que utiliza organismos vivos ou partes desses, para solucionar problemas, produzir ou modificar produtos, aumentar a produtividade de plantas ou animais de maneira eficiente ou, ainda produzir microrganismos para usos específicos (TORRES et al., 2000).

No início do século XX desenvolveram-se as técnicas de cultura de tecidos e a partir de meados do século surgem novos horizontes com a biologia molecular que traz o conceito da “nova biotecnologia”, ou seja, a utilização de células e moléculas biológicas para solucionar problemas ou produzir novos produtos (KREUZER & MASSEY, 2002).

A biotecnologia moderna inclui um conjunto de tecnologias entre elas a da cultura de células e tecidos, a qual é uma importante ferramenta na transformação genética de plantas, pois requer o cultivo “in vitro” de células e tecidos da planta que se deseja transformar, bem como as células e tecidos transformados e regenerados em plantas que expressem o gene de interesse (BRASILEIRO & DUSI, 1999).

A cultura de tecidos é uma técnica utilizada para propagar células ou tecidos vegetais em tubos de ensaio com meio nutritivo adequado, sob condições assépticas, com fatores ambientais controlados. Nesse ambiente, as células, tecidos e órgãos se multiplicam e continuam a crescer de modo não organizado ou se regeneram numa planta inteira (TORRES et al., 2000; CID, 2001).

O princípio da cultura de tecidos está baseado na teoria da totipotencialidade, proposta por Mathias Schleiden e Theodor Schwann no ano de 1838. Esta teoria afirma que a célula é autônoma, portanto, que contém o potencial genético necessário para originar um organismo completo, neste caso uma planta completa. Imbuído desta teoria Haberlandt, em 1902, foi o primeiro a manipular um sistema de cultura “in vitro” de plantas, procurando estabelecer e consolidar um sistema de micropropagação. Infelizmente, por limitações técnicas da época, seus esforços falharam (TORRES et al., 1998).

No entanto, a técnica se difundiu por diversos países da Europa, Ásia, nos Estados Unidos e Brasil. O método baseia-se na produção de plantas mais uniformes, sadias e a uma velocidade muito maior do que os métodos convencionais, sem considerar a manutenção de quantidades consideráveis de plantas por metro quadrado dentro de frascos em laboratórios protegidos do ataque de pragas, doenças e intempéries (LEE et al., 1995 e KERBAUY, 1997).

Essa técnica tem se mostrado de enorme importância prática e potencial nas áreas agrícola e florestal, bem como no auxílio a programas de melhoramento genético, na propagação de plantas cultivadas livres de patógenos e na produção em larga escala de plantas para fins comerciais (CID, 2001). Atualmente, vem sendo amplamente utilizada como uma ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (DUVAL et al., 1998).

O grau de sucesso em qualquer tecnologia que emprega cultura de células, tecidos ou órgãos é dependente de poucos fatores. Um fator significativo é a escolha dos componentes nutricionais e reguladores de crescimento que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento “in vitro” (CALDAS et al., 1998).

As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos, estimulando a regeneração de calos, bem como, a indução e proliferação de brotações de gemas axilares ou apicais (CID, 2000). O BAP (6-benzilaminopurina) tem sido a citocinina mais eficaz na multiplicação “in vitro” em diversas espécies do gênero *Cymbopogon* (BARUAH & BORDOLOI, 1989; REIS et al., 1999; CZEPAK et al., 2003 e ZIGIOTTO et al., 2005).

Para a multiplicação da citronela de Java, o BAP atua na formação e no desenvolvimento de brotações “in vitro” com condições adequadas para a fase de enraizamento (ZIGIOTTO, 2004).

Outro fator importante a ser considerado no estabelecimento “in vitro” é o controle da contaminação por patógenos que infestam explantes usados na cultura de tecidos, devendo-se pesquisar e determinar protocolos mais eficientes levando

em consideração o agente desinfetante, a espécie que se trabalha e o tipo de explante. Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000).

Inúmeras são as substâncias com ação germicida utilizadas na desinfestação dos explantes, sendo os mais comuns o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio. As combinações dos princípios ativos desinfetantes podem variar, desta forma faz-se necessário à adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfetado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O cultivo de meristemas (BIASI et al., 1998 e ERIG & FORTES, 2002), ápices caulinares (DOMINGUES et al., 1995 e ROCHA et al., 2004) e gemas axilares (MENDANHA & TORRES, 1998 e CANTAGALLO et al., 2005) são adequados como fonte de explante, por serem considerados mais rápido, eficiente e confiável método de micropropagação, pois preserva o germoplasma “in vitro” e supera a contaminação patogênica (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Algumas espécies, no entanto, se regeneram com sucesso a partir de segmentos nodais (FLORES et al., 1998; NICOLOSO & ERIG, 2002 e ERIG & SCHUCH, 2003a). Todas estas fontes de explante podem desenvolver-se diretamente (organogênese direta) numa planta, ou passar pela fase de calo (organogênese indireta) em meio de cultura adequado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A micropropagação é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos e tem sido utilizada para multiplicar várias espécies medicinais que apresentam problemas com as sementes ou com partes vegetativas que limitam sua multiplicação em escala, ou ainda que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e suscetibilidade à doenças, algumas destas espécies são *Maytenus* spp. (PEREIRA, 1998), *Achyrocline satureioides* (IKUTA, 1998), *Myracrodruon urundeuva* (ANDRADE et al., 2000), *Echinodorus* cf. *scaber* (PEREIRA et al., 2000), *Curcuma zedoaria* (MELO et al., 2000), *Pfaffia* spp. (NICOLOSO et al., 2001 e FLORES et al., 2006), *Aloe vera* (ARAÚJO et al., 2002), *Pilocarpus microphyllus* (SABÁ et al., 2002), *Cissus sicyoides* (ABREU et al., 2003), *Ocimum basilicum* (DODE et al., 2003), *Psychotria acuminata* (LARA et al., 2003), *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (OLIVEIRA et al., 2003), *Zingiber officinale* (DEBIASI et al., 2004), *Calophyllum inophyllum* (THENGANE et al., 2006).

Outro problema comum que afeta as plantas medicinais é o declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais quando estas são cultivadas por longos períodos e submetidas à vários cortes, fazendo-se necessária a renovação e reintrodução de plantas para manter a alta produtividade desses constituintes ativos (PEREIRA, 2003).

Por essa razão nos últimos anos têm sido propagadas “in vitro” espécies como a *Mentha* (BELTRÃO, 2000; BELTRÃO et al., 2000 e BANDEIRA et al., 2006), *Cymbopogon* (BARUAH & BORDOLOI, 1989; NAYAK et al., 1996; PATNAIK et al., 1997; REIS et al., 1999 e CZEPAK et al., 2003) e citronela (BARTHAKUR & BORDOLOI, 1989; SREENATH & JAGADISHCHANDRA, 1989; SAHA & GHOSH, 2003 e ZIGIOTTO, 2004), para atender a essa demanda.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento de um protocolo regenerativo da citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) “in vitro”, através da cultura de tecidos, foram conduzidos 3 experimentos, no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Marechal Cândido Rondon, em 2005 e 2006.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas plantas matrizes de citronela de Java obtidas da Fazenda São Roque – Marechal Cândido Rondon/PR, onde as mesmas eram retiradas do campo com uma enxada, após a retirada eram enroladas em pano e trazidas ao laboratório, onde retiravam-se suas folhas, para iniciar os respectivos experimentos.

3.1 EXPERIMENTO 1: ASSEPSIA DE EXPLANTE DE *C. winterianus*

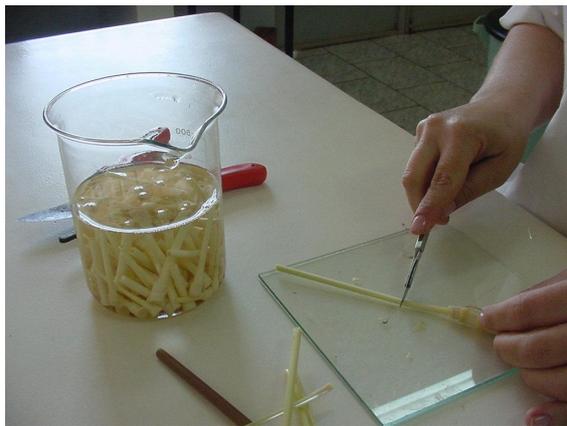
Este experimento foi conduzido no mês de Julho de 2005, para o mesmo foram empregados como fonte de explante ápices caulinares retirados de plantas matrizes de citronela de Java (Figura 1a, b), os quais passaram pelo processo de desinfestação, que constou na imersão em 100 mL de água com três gotas de tween 80 (Figura 1c).

Posteriormente os explantes, foram levados à câmara de fluxo laminar e colocados em becker com solução de etanol (70%) por 5 minutos (Figura 1d). Então foram imersos em hipoclorito de sódio (0,5%) nos tempos 15, 20, 25 e 30 minutos (Figura 1e). Após este procedimento foi realizada a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

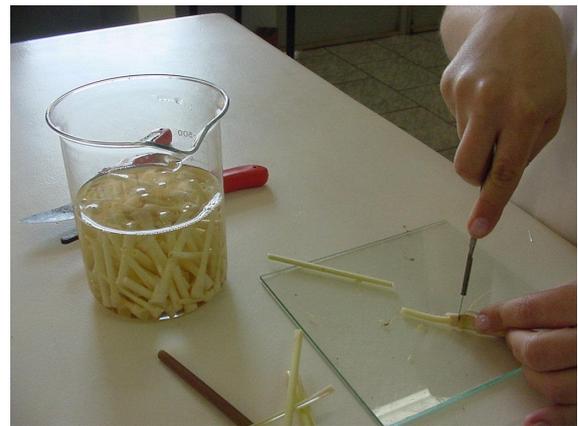
Após o processo de desinfestação os explantes foram inoculados em frascos, com cerca de 15 cm de comprimento, 6 cm de diâmetro e tampados com tampas plásticas vedadas com papel filme, contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 % de agar e pH ajustado para 5,8, antes da adição do agar (Figura 1f).

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi inteiramente casualizado com um explante por frasco e cinco frascos por tratamento. Os tratamentos constaram de uma concentração de hipoclorito de sódio e quatro tempos de exposição dos explantes à solução, totalizando 4 tratamentos. A análise estatística empregada foi análise de regressão.

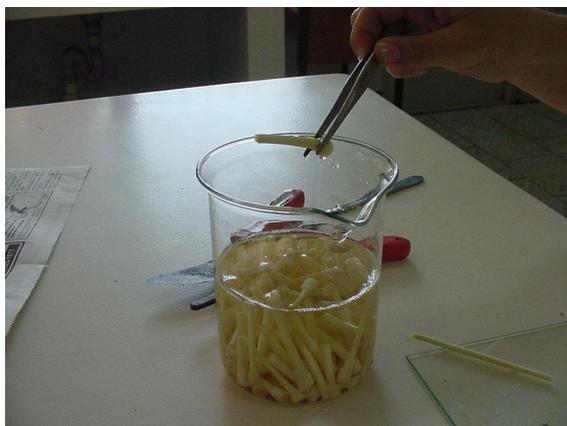
Após a inoculação, os frascos foram mantidos no escuro por 7 dias para diminuir a incidência de oxidação fenólica e então foram transferidos para a sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro e temperatura de 25 ± 2° C. As avaliações foram realizadas em intervalos de 7 dias, durante 30 dias, quanto à presença de contaminação sobre os explantes e a oxidação dos mesmos.



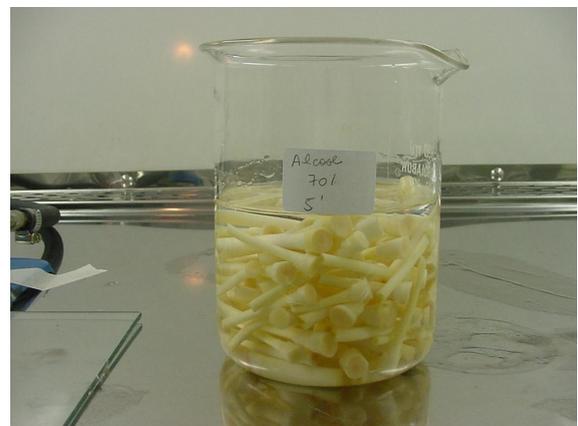
(a)



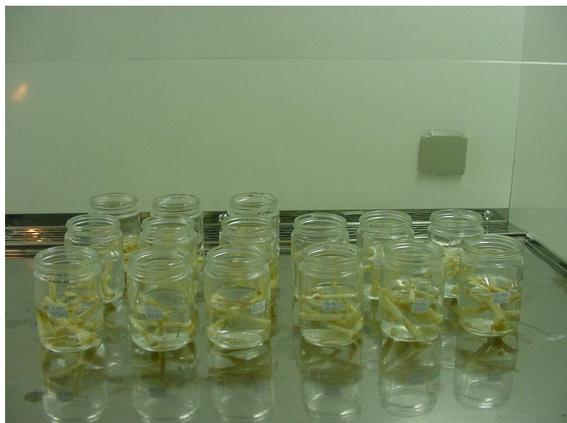
(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 1 Assepsia de explante de *Cymbopogon winterianus*. (a, b) - Extração dos ápices caulinares de citronela de Java empregados como fonte de explante para teste de assepsia. (c) - Imersão dos ápices caulinares em água com tween 80. (d) - Ápices caulinares em solução de etanol (70%) por 5 minutos. (e) - Transferência dos ápices caulinares para a solução de hipoclorito de sódio (0,5%) em diferentes tempos. (f) - Ápice caulinar inoculado no meio de cultura MS.

3.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE TIPOS DE EXPLANTES DE *C. winterianus* PARA O CULTIVO “IN VITRO”

A realização deste experimento foi em Setembro de 2005, para o mesmo foram utilizados três tipos de explantes: ápice caulinar (medindo cerca de 1,5 cm de comprimento), gema lateral (com aproximadamente 0,5 cm de comprimento) e segmento nodal (em torno de 0,5 cm de diâmetro), como mostra a Figura 2a. Os diferentes explantes passaram pelo processo de assepsia descrito no experimento 1. Optou-se pelo tempo de 30 minutos em hipoclorito de sódio (0,5%), que resultou em menor contaminação no 1º experimento.

Após o processo de desinfestação os explantes foram inoculados em frascos (com as mesmas dimensões e condições descritas no 1º experimento) contendo 30 mL de meio de cultura MS (Figura 2b) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 % de Agar, com pH ajustado para 5,8 antes da adição do Agar. Testou-se combinações de 6-benzilaminopurina – BAP (1,0 e 2,0 mg L⁻¹), ácido indolbutírico – IBA (0,0; 0,1; 0,2 e 0,4 mg L⁻¹) e um tratamento testemunha (0,0 BAP e 0,0 IBA), totalizando 9 tratamentos / explante.

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3x2x4), sendo três tipos de explante por frasco, duas concentrações de BAP e 4 concentrações de IBA adicionadas ao meio de cultura, como já descrito anteriormente. Utilizou-se cinco repetições por tratamento. Após a inoculação, os frascos foram mantidos no escuro por 7 dias para diminuir a incidência de oxidação fenólica e então transferidos para a sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro e temperatura de 25 ± 2º C.

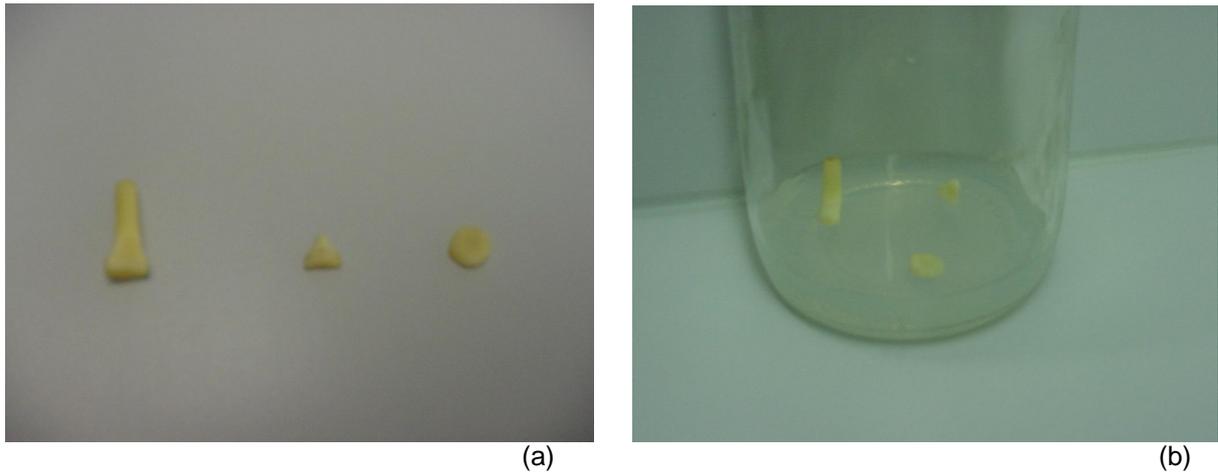


Figura 2 Tipos de explantes de *Cymbopogon winterianus* para o cultivo “in vitro”. (a) - Ápice caulinar, gema lateral e segmento nodal de *C. winterianus*, utilizados como fonte de explante para o cultivo “in vitro”. (b) - Ápice caulinar, gema lateral e segmento nodal inoculado no meio de cultura MS.

As avaliações foram realizadas após 60 dias, quanto à presença de calo e número de brotações por explante. Para a análise estatística os dados foram transformados em raiz ($x + 0,5$), e então submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa computacional SAEG 5.0 da Universidade Federal de Viçosa.

3.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DE REGULADORES VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO “IN VITRO” DE *C. winterianus* E A ACLIMATAÇÃO DAS PLÂNTULAS

Na realização desse experimento em Novembro de 2005, para verificar o efeito de reguladores vegetais na propagação “in vitro” da citronela de Java, foram empregados como fonte de explante ápices caulinares, que demonstraram através do experimento 2, ser mais promissores para o cultivo “in vitro” da citronela de Java.

Os explantes foram submetidos ao processo de desinfestação descrito no experimento 2, onde após este procedimento os mesmos foram transferidos para frascos (com as mesmas dimensões e condições descritas no 1º experimento) contendo 30 mL de meio de cultura MS, com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7% de Agar, pH ajustado para 5,8, antes da adição do Agar e suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de IBA (0,0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg L⁻¹), além da testemunha, totalizando 6 tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com um explante por frasco, cinco frascos por tratamento e seis tratamentos. Após a inoculação os frascos foram mantidos no escuro por 7 dias para então serem transferidos à sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro e temperatura de 25 ± 2º C.

As avaliações foram realizadas aos 30 dias após a inoculação (DAI), quanto ao número de brotações por explante e a altura média das brotações (cm). Após a avaliação foi realizada a repicagem das brotações e inoculadas em meio de cultura MS com BAP e IBA, e então feita novas avaliações aos 30 e 60 dias após a transferência (DAT), sendo avaliados os mesmos parâmetros.

Após o período de 60 dias as brotações multiplicadas foram transferidas para frascos contendo meio de cultura MS desprovido de regulador vegetal (meio de enraizamento), onde permaneceram por mais 30 dias. Os dados foram transformados em raiz ($x + 0,5$) para serem submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa computacional SAEG 5.0.

A fase de aclimação ocorreu após a fase de alongação da parte aérea e enraizamento das plântulas (Figura 3), sendo escolhidas através de um padrão visual, buscando a uniformidade das plântulas para a aclimação. Os frascos foram destampados permanecendo na sala de crescimento por 24 horas. Posterior a este procedimento, as plântulas foram removidas e tiveram suas raízes lavadas em água corrente para eliminar o excesso de Agar. As mesmas foram então transplantadas para bandejas de poliestireno expandido de 128 células com substrato comercial Plantimax Hortaliças.



Figura 3 Plântulas de *Cymbopogon winterianus* cultivadas “in vitro” prontas para a fase de aclimação.

Para manter a umidade relativa próxima de 100% e evitar o dessecamento das plantas, a bandeja de poliestireno ficou imersa em uma bandeja plástica com água e solução nutritiva MS (sistema “floating”), por 10 dias, dentro de uma câmara úmida obtida através de uma mini-estufa plástica (Figura 4a).

Passado este período foi retirada a bandeja com água, sendo que as plantas permaneceram nas bandejas de poliestireno dentro da mini-estufa, por mais 20 dias (Figura 4b), para então serem transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 2 litros, contendo terra e substrato comercial na proporção de 1:1, onde passaram mais 10 dias em mini-estufa, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. Após o processo de aclimação foi determinado o número de plantas que sobreviveram.

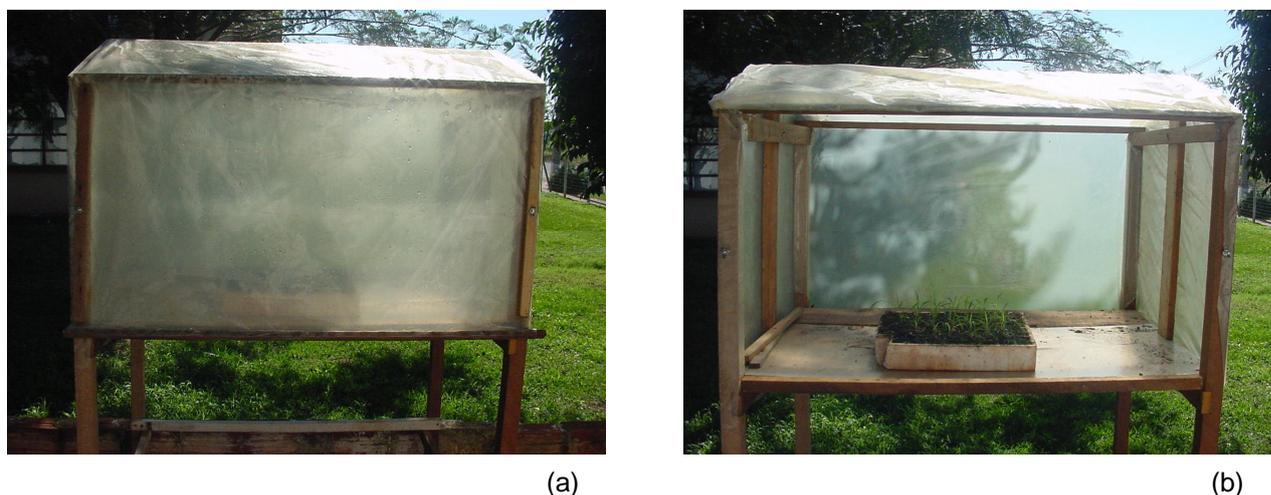


Figura 4 Aclimação de plântulas de *Cymbopogon winterianus* cultivadas “in vitro”. (a) - Mini-estufa plástica utilizada na aclimação de plântulas de *C. winterianus*. (b) - Plantas de *C. winterianus* em bandeja de poliestireno dentro da mini-estufa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1: ASSEPSIA DE EXPLANTE DE *C. winterianus*

Em relação aos métodos diferenciais de assepsia empregados, ou seja, diferentes tempos de imersão do explante apical ao hipoclorito de sódio 0,5%, pode-se verificar na Figura 5 que houve tanto para percentagem de contaminação quanto para percentagem de oxidação, um comportamento polinomial quadrático.

Nesse experimento houve uma redução do percentual de explantes contaminados em resposta ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (0,5%), sendo observado também uma correlação significativa de 64% entre a percentagem de explantes contaminados e a percentagem de explantes oxidados.

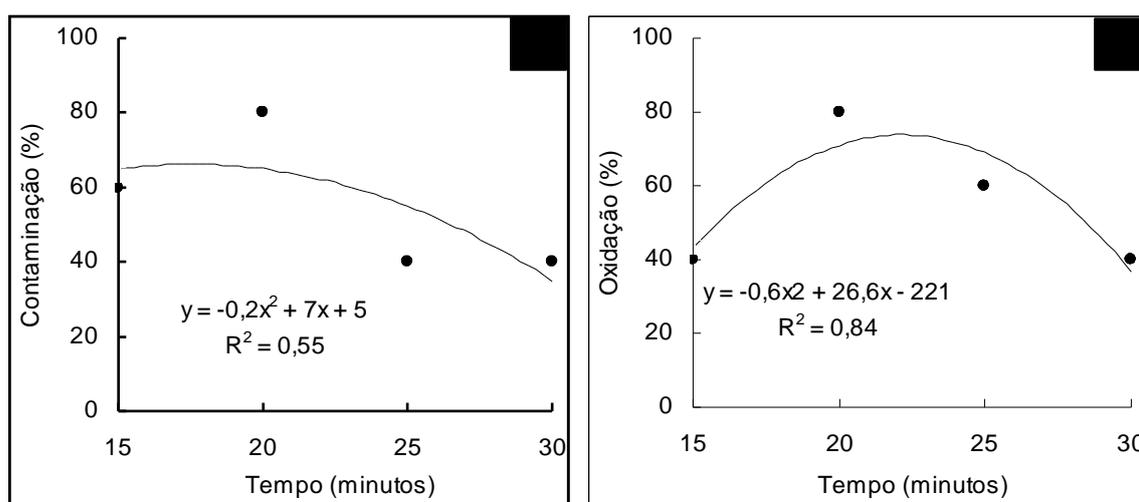


Figura 5 (a) - Percentagem de contaminação e (b) - percentagem de oxidação de explantes apicais de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em função do tempo de exposição à solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.

De maneira geral, a percentagem de explantes contaminados e oxidados foi alta, a qual pode ser atribuída à condição fitossanitária das plantas matrizes, pois segundo Grattapaglia & Machado (1998), o estado fitossanitário da planta é importante e irá determinar a facilidade em descontaminar o explante durante o isolamento. No estabelecimento “in vitro” de cultivares de pereira (*Pyrus* spp.), Erig & Fortes (2002), obtiveram contaminação por bactérias em 45,7% das gemas provenientes de plantas mantidas no campo.

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 a 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”.

Outro fator importante para o estabelecimento de uma cultura asséptica é o cuidado na manipulação de todos os instrumentos de trabalho, pois a contaminação, neste caso pode ser exógena, além de favorecer a liberação de compostos fenólicos, devido ao dano causado nas células durante a excisão (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o desenvolvimento “in vitro” e até levar os explantes à morte (CALDAS et al., 1998).

Para reduzir o índice de oxidação, pode-se utilizar de diversas técnicas durante o preparo do explante, do meio de cultura e da fase de incubação. Segundo Pasqual et al. (1997), a oxidação é menos severa em meio diluído do que em um outro com alta concentração de sais, como o meio MS. Resultado observado por Flores et al. (1998) e Utino et al. (2001), que verificando também que a adição de

substâncias antioxidantes como ácido ascórbico ao meio de cultura, minimizou a oxidação fenólica em *Maytenus ilicifolia* e *Musa* sp., respectivamente. Melo et al. (2001), também testou diferentes antioxidantes para controle da oxidação no desenvolvimento de plântulas *Syagrus oleracea* obtendo resultados satisfatórios.

A diminuição da luminosidade na câmara de fluxo laminar, durante a retirada dos explantes e a manutenção da cultura no escuro no início do cultivo é benéfica (DANTAS et al., 2002; BIANCHI et al., 2003; CHAVES et al., 2004 e ROCHA et al., 2004), pois a luz aumenta a produção de fenóis na planta. Essa alternativa foi realizada neste experimento, o que demonstra que não foi suficiente para diminuir o índice de oxidação fazendo-se necessários testes com a adição de substâncias antioxidantes como, por exemplo, ácido ascórbico, ácido cítrico e carvão ativado.

Quanto ao agente desinfetante utilizado (hipoclorito de sódio), vários são os trabalhos que demonstram resultados promissores quando comparados com outros agentes empregados (MELO et al., 2000; NICOLOSO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; ABREU et al., 2003; BIANCHI et al., 2003; ERIG & SCHUCH, 2003a; AZAD et al., 2004 e CHAVES et al., 2004) indicando ser este o mais usado, pois além de sua eficiência estar ligada à ação sistêmica nos tecidos, a relação custo-benefício é muito satisfatória.

Apesar dos altos índices de contaminação e oxidação ocorridos, o estabelecimento “in vitro” utilizando ápices caulinares de citronela, se torna viável quando o tempo de exposição dos explantes ao agente desinfetante (hipoclorito de sódio) é maior. Reis et al. (1999) e Czepak et al. (2003), obtiveram resultados satisfatórios na micropropagação de *Cymbopogon citratus*, utilizando hipoclorito de sódio no tempo de 30 minutos, justificando assim a opção pelo maior tempo testado.

4.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE TIPOS DE EXPLANTES DE *C. winterianus* PARA O CULTIVO “IN VITRO”

Na Figura 6 é demonstrado que, dos explantes testados, o ápice caulinar foi o que apresentou maior número de brotações por explante de citronela, nas diferentes concentrações de BAP utilizadas, independente da concentração de IBA empregada. A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP resultou em percentagem de 74% no número de brotações, quando comparado com 1,0 mg L⁻¹. Resultados semelhantes foram obtidos por Zigiotto (2004) quando utilizou ápices caulinares, obtendo uma elevada taxa de multiplicação de brotações de citronela, empregando a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

Reis et al. (1999), cultivando ápices caulinares de *Cymbopogon citratus* em meio de cultura contendo duas concentrações de BAP (0,5 e 1,0 mg L⁻¹), verificou que 1,0 mg L⁻¹ de BAP apresentou uma média de 4,3 brotações por explante.

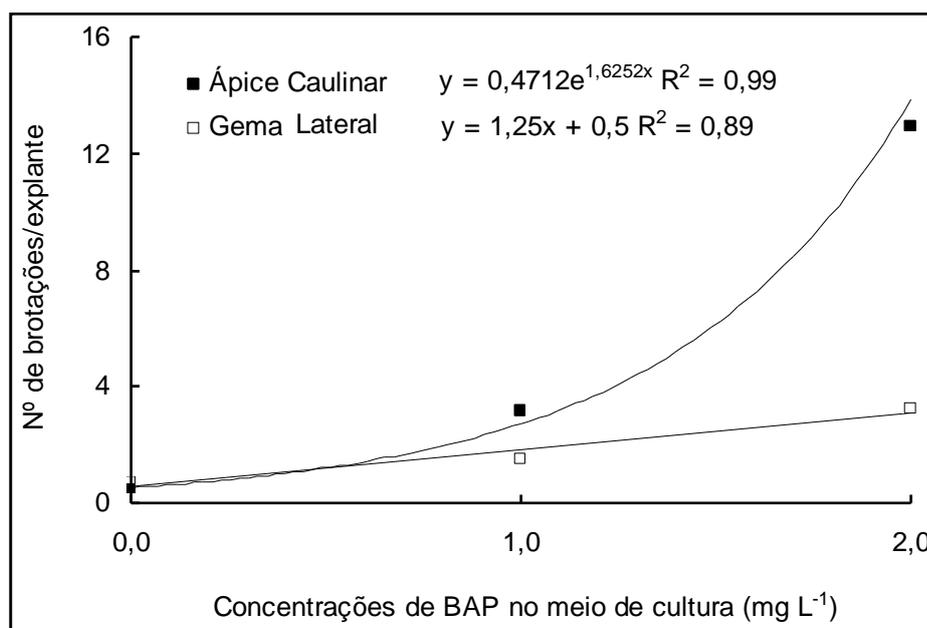


Figura 6 Número de brotações por explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em função da concentração de BAP na solução nutritiva e do tipo de explante utilizado, independente da concentração de IBA no meio de cultura.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados referentes ao número de brotações por explante de citronela em função do tipo de explante e da concentração de IBA no meio de cultura, com a adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Verificou-se a ausência de interação significativa entre as concentrações de IBA e os tipos de explantes utilizados. Não houve também diferença significativa entre as diferentes concentrações de IBA empregadas, porém verificou-se uma discrepância quando utilizou-se 0,4 mg L⁻¹ de IBA e os demais tratamentos, no explante ápice caulinar, este pode estar relacionado com a diferença entre o tamanho dos explantes, no momento da excisão.

Houve diferença significativa somente, na média do número de brotações em função dos tipos de explante utilizados, sendo que o ápice caulinar e a gema lateral diferiram do segmento nodal, onde o mesmo não apresentou regeneração adventícia.

Tabela 1 Número de brotações por explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP).

Concentração de IBA no meio	Número de brotações por explante			
	Ápice caulinar	Gema lateral	Segmento nodal	Média
0,0 mg L ⁻¹	3,8	2,0	0,0	1,9 ab
0,1 mg L ⁻¹	0,8	1,8	0,0	0,9 ab
0,2 mg L ⁻¹	0,0	0,3	0,0	0,1 b
0,4 mg L ⁻¹	8,0	2,0	0,0	3,3 a
Média	3,2 A	1,5 A	0,0 B	-----
CV (%)	56,98			

*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Para a análise estatística utilizou-se dados transformados em raiz (x + 0,5).

A otimização do desenvolvimento de segmentos nodais em meio de cultura é viável, uma vez que há menor disponibilidade de ápices caulinares. Porém, para a cultura da citronela de Java esta fonte de explante não apresentou morfogênese, indicando que a utilização deste foi inviável nas condições deste estudo. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) o sucesso e eficiência na regeneração dos explantes variam com o genótipo. Alguns autores empregaram segmentos nodais e se depararam com resultados satisfatórios, como Flores et al. (2006), Nicoloso et al. (2001) e González et al. (2003) na micropropagação de *Pfaffia tuberosa*, *Pfaffia glomerata* e *Artemisia absinthium*, respectivamente.

Um fator a ser evidenciado é dos segmentos nodais terem maior capacidade regenerativa quando os mesmos formam calos com células competentes, ou seja, com capacidade de responder aos efeitos estimulatórios do meio de cultura para formação de gemas (KERBAUY, 1999). Porém, neste experimento não foi evidenciado a formação de calo neste tipo de explante (Tabela 2 e 4), fato este que pode ter dificultado a proliferação de brotos, uma vez que o balanço hormonal testado, não mostrou-se adequado, sendo necessários mais testes, para viabilizar a utilização do mesmo, uma vez que de uma planta, pode-se retirar mais de um explante para o cultivo “in vitro”.

Em explantes obtidos a partir de ápice caulinar e gema lateral, observou-se formação de calos em 43,8% e 31,3%, respectivamente (Tabela 2). Entretanto esta diferença não foi significativa estatisticamente, não havendo também interação entre as concentrações de IBA e o tipo de explante. Thomé et al. (2004) obteve 62% de formação de calo em *Kalanchoe blossfeldiana* utilizando 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Já Alves et al. (2004), trabalhando com *Eucalyptus* sp., conseguiu 16% de indução de calo, nesta concentração de BAP, em explantes caulinares.

Tabela 2 Percentagem de explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) que formaram calo, em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP).

Concentração de IBA no meio	Explantes que formaram calo (%)			
	Ápice caulinar	Gema lateral	Segmento nodal	Média
0,0 mg L ⁻¹	50,0	50,0	0,0	33,0 a
0,1 mg L ⁻¹	75,0	50,0	0,0	42,0 a
0,2 mg L ⁻¹	25,0	0,0	0,0	8,0 a
0,4 mg L ⁻¹	25,0	25,0	0,0	17,0 a
Média	43,8 A	31,3 AB	0,0 B	-----
CV (%)	25,3			

*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Para a análise estatística utilizou-se dados transformados em raiz ($x + 0,5$).

Em alguns casos a formação de calo não é desejável podendo comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento. Uma forma de minimizar esse problema é o subcultivo das plantas, após 15 dias, em um meio de cultura novo, na tentativa de evitar que as brotações percam o vigor (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Quando o meio de cultura foi suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP variando-se o tipo de explante e a concentração de IBA, ficou evidente que o ápice caulinar possui uma competência maior do que a gema lateral e o segmento nodal para expressar o seu potencial morfogenético. De acordo com a Tabela 3 não houve interação entre as concentrações de IBA e os tipos de explantes utilizados. Não existiu também diferença significativa entre as diferentes concentrações de IBA empregadas.

Tabela 3 Número de brotações por explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 2,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP).

Concentração de IBA no meio	Número de brotações por explante			
	Ápice caulinar	Gema lateral	Segmento nodal	Média
0,0 mg L ⁻¹	8,0	3,5	0,0	3,8 a
0,1 mg L ⁻¹	11,8	6,0	0,0	5,9 a
0,2 mg L ⁻¹	12,5	0,5	0,0	4,3 a
0,4 mg L ⁻¹	16,8	3,0	0,0	6,6 a
Média	12,3 A	3,3 B	0,0 B	-----
CV (%)	74,94			

*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Para a análise estatística utilizou-se dados transformados em raiz (x + 0,5).

Ainda na Tabela 3, observa-se que para o ápice caulinar houve uma maior emissão de brotos (12,3), porém só diferiu significativamente na média dos demais tipos, gema lateral (3,3) e segmento nodal. No entanto, a gema lateral não diferiu do segmento nodal, sendo que o mesmo não apresentou brotações, fato que pode ser explicado pelo alto coeficiente de variação (74,94%). Segundo Peres (2002), quando um explante falha em desenvolver organogênese “in vitro”, essa falha pode ser devida à etapa de competência.

A utilização direta de tecidos meristemáticos, especialmente ápices caulinares, facilita a indução dos processos organogênicos, os quais ocorrem grande homogeneidade, onde as células estão sempre num processo ativo de divisão (HANDRO & FLOH, 1990). Na Tabela 3 verifica-se que para o ápice caulinar, houve uma tendência de aumento no número de brotações em função do aumento da concentração de IBA, no entanto não foi significativo, fato este evidenciado no experimento 3, onde buscou-se testar a influência do IBA na multiplicação e enraizamento “in vitro” da citronela.

Alguns autores obtiveram sucesso na utilização de ápices caulinares, como em *Achyrocline satureioides* (IKUTA, 1998), *Baccharis trimera* (SILVA et al., 2003), *Curcuma zedoaria* (MELO et al., 2000), *Eucalyptus* sp. (ALVES et al., 2004) e *Pyrus communis* (ERIG & SCHUCH, 2003b e ROCHA et al., 2004). Outros alcançaram bons resultados através de gemas (CANTAGALLO et al., 2005; ERIG & FORTES, 2002; DEBIASI et al., 2002 e SATO et al., 2004)

Fazendo um comparativo entre as Tabelas 1 e 3, verifica-se que na adição de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, o ápice caulinar não diferiu no número de brotações, quando comparado com a gema lateral. No entanto, com o suplemento de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio de cultura, os ápices caulinares tiveram um incremento de 74% no número de brotações, sendo que as gemas laterais, apesar do reduzido número de brotações, tiveram resultado melhor que o obtido com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, no meio de cultura. As respostas morfogênicas são dependentes do genótipo que se está trabalhando, do tipo de explante empregado e da concentração ideal de reguladores vegetais para a cultura em questão, pois o que é ideal para uma determinada cultura, pode não ser para outra (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Como observado por Moura et al. (2001), que a concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foi a que favoreceu a organogênese "in vitro" em segmentos internodais de limão-'Cravo', e a concentração $1,0$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foram as que melhor favoreceram em segmentos de epicótilo da laranja-'Pêra'. Para Alves et al. (2004), a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, foi a que promoveu maior regeneração em explantes caulinares de *Eucalyptus* sp. Segundo Carvalho et al. (2004), a concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP combinado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA induz maior proliferação de brotos em *Agave lechuguilla*, enquanto para *A. palmieri*, recomenda-se BAP a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Através dos resultados, pôde-se confirmar que para a indução morfogênica dos explantes da citronela é necessária a adição de citocinina ao meio de cultura, sendo que a concentração de 2,0 mg L⁻¹ foi a que levou aos melhores níveis de resposta, principalmente para o ápice caulinar. As citocininas constituem o grupo de fitorreguladores indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O tipo e a concentração são os que mais influenciam no sucesso da multiplicação “in vitro” (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Na Tabela 4 encontram-se os resultados referentes à formação de calo nos tipos de explantes de citronela em função da concentração de IBA no meio de cultura, com 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Houve interação significativa entre as concentrações de IBA empregadas e o explante ápice caulinar, onde com exceção da concentração de 0,2 mg L⁻¹ de IBA, os demais obtiveram 100% de formação de calo.

Tabela 4 Percentagem de explantes de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) que formaram calo, em função do tipo de explante e da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 2,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP).

Concentração de IBA no meio	Explantes que formaram calo (%)			
	Ápice caulinar	Gema lateral	Segmento nodal	Média
0,0 mg L ⁻¹	100 a A	100 a A	0,0 a B	66,7
0,1 mg L ⁻¹	100 a A	50 a A	0,0 a B	50,0
0,2 mg L ⁻¹	25 b AB	50 a A	0,0 a B	25,0
0,4 mg L ⁻¹	100 a A	100 a A	0,0 a B	66,7
Média	81,2	75,0	0,0	-----
CV (%)	14,65			

*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Para a análise estatística utilizou-se dados transformados em raiz (x + 0,5).

A formação de calo esta diretamente ligada à razão auxina/citocinina, sendo que concentrações excessivas de auxina podem favorecer a proliferação de calos (TAIZ & ZEIGER, 2004), no entanto, neste experimento as concentrações de auxina utilizadas, parecem não influenciar diretamente na indução de calos, uma vez que no meio desprovido de IBA, houve 100% de formação de calo. Alves et al. (2004), verificaram a formação de calos em 100% dos explantes caulinares, utilizando dose de TDZ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e ANA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$).

É comum a formação de calos nesses explantes e em meios com altas doses de reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Gürel & Gülsen (1998), verificaram que altos níveis de IBA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e BAP ($2,0$ ou $3,0 \text{ mg L}^{-1}$), ocasionaram formação de calo em ápices caulinares de *Amygdalus communis*.

Em cultura de tecidos, dois parâmetros de regeneração de plantas são particularmente importantes, a frequência de indução de calos e eficiência de regeneração a partir destes calos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Através dos resultados, pôde-se perceber que a formação de calos parece ter influenciado no número de brotações. RUEB et al. (1994) consideraram como melhor meio de indução de calos aquele que apresentou um maior número de brotações por explante.

4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DE REGULADORES VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO “IN VITRO” DE *C. winterianus* E A ACLIMATAÇÃO DAS PLÂNTULAS

Com o intuito de testar a influência do IBA na multiplicação e enraizamento “in vitro” da citronela, utilizou-se a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultura e diferentes concentrações de IBA (Tabela 5), sendo a fonte de explante ápices caulinares, que demonstraram serem mais promissores no estabelecimento “in vitro” para a cultura da citronela. Os resultados observados mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações de IBA empregadas, para o número de brotações.

Tabela 5 Número de brotações por explantes e altura do explante de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) em função da concentração de ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, com 2,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e do tempo após a inoculação.

Concentração de IBA no meio	Número de brotações/ explante			Altura do explante (cm)		
	30 DAI	30 DAT	60 DAT	30 DAI	30 DAT	60 DAT
0,0 mg L ⁻¹	1,6 a	16,6 a	53,8 a	2,8 a	3,2 a b	5,0 b
0,1 mg L ⁻¹	1,2 a	16,8 a	57,4 a	2,4 a	3,6 a b	5,3 a b
0,2 mg L ⁻¹	1,2 a	17,4 a	43,6 a	2,8 a	2,4 b	5,2 b
0,3 mg L ⁻¹	1,6 a	20,8 a	48,0 a	3,4 a	3,4 a b	6,5 a
0,4 mg L ⁻¹	2,8 a	21,0 a	42,8 a	3,3 a	3,8 a	5,5 a b
CV parcela (%)	32,1			34,6		
Cv subparcela (%)	37,5			18,1		

*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Para a análise estatística utilizou-se dados transformados em raiz (x+0,5).

Zaniolo & Zanette (2002), verificaram uma tendência de aumento no número de brotações em *Ilex paraguariensis* com o aumento das concentrações de IBA. Para Erig et al. (2002), a multiplicação “in vitro” da amoreira-preta pode ser realizada sem a presença do IBA no meio de cultura, sendo o BAP essencial para promover a taxa de multiplicação. Segundo Dodds & Roberts (1982) a interação entre auxina e citocinina adicionada ao meio de cultura é complexa e fatores nutricionais podem interferir no resultado final.

Para a variável altura dos explantes, houve diferença significativa, aos 30 e 60 dias após a transferência, verificando-se um aumento da altura com doses mais altas de IBA, estando possivelmente relacionado ao efeito fisiológico do alongamento celular das auxinas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Oliveira et al. (2001), verificaram que a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA, proporcionou maior comprimento das brotações de *Averrhoa bilimbi*. Já Erig et al. (2002), observaram que na concentração de 1,0 µM de AIB e no aumento das concentrações de BAP, houve uma diminuição do comprimento das brotações de *Rubus idaeus*.

A manutenção das plântulas em sucessivos cultivos proporciona um conseqüente aumento no número de brotações (Figura 7a), o qual pôde ser evidenciado na Tabela 5, porém se mantidas por mais de 60 dias num mesmo meio de cultura, as mesma começam a morrer (Figura 7b), provavelmente por esgotamento do meio, fato observado nas condições deste estudo. Faz-se então necessário a mudança periódica do meio de cultura de multiplicação, caso se deseje aumentar a taxa de brotação. Zaniolo & Zanette (2002), observaram que a permanência de brotações de *Ilex paraguariensis* durante três subcultivos no mesmo meio de cultura proporcionou a maior taxa de multiplicação.

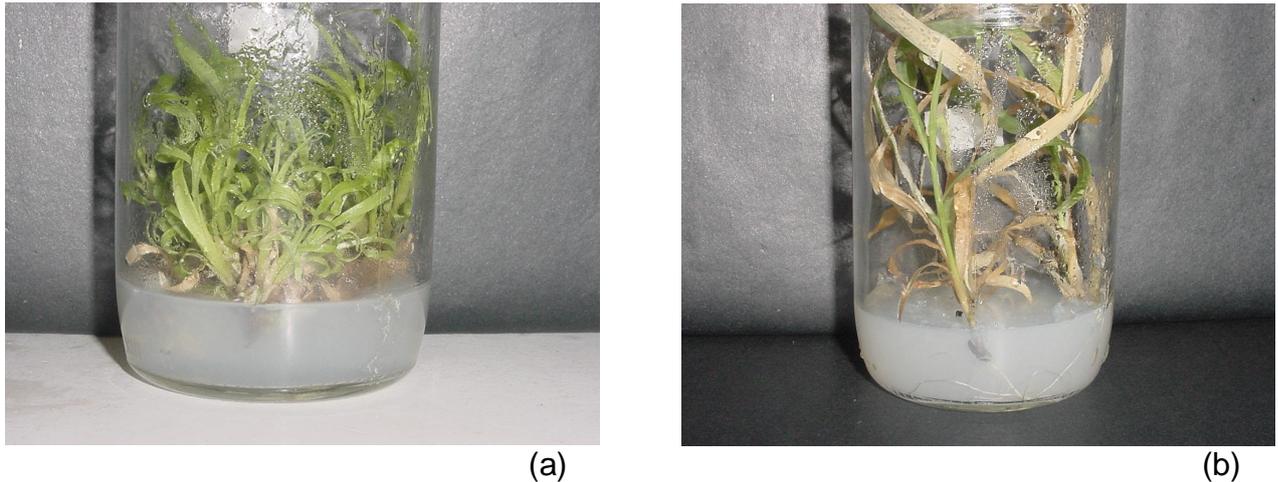


Figura 7 (a) - Multiplicação dos explantes de *Cymbopogon winterianus* cultivados “in vitro”, após subcultivos. (b) - Plântulas de *C. winterianus* comprometidas pela permanência em meio de cultura.

A utilização de auxinas para promover o enraizamento é uma alternativa viável em muitas culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Gonzáles et al. (2003), verificaram altos índices de enraizamento em plântulas de *Artemisia absinthium*, na presença de IBA no meio de cultura. O mesmo foi constatado por Almeida et al. (1995), que obtiveram 59,5% de enraizamento em *Bixa orellana*, na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de IBA. Neste experimento, não foi evidenciado a formação de raízes na presença de IBA no meio de cultura.

Visando o enraizamento das plântulas, observou-se neste estudo, que a mudança do meio de cultura de multiplicação para o meio de cultura MS, ou seja, sem reguladores vegetais, proporcionou alongamento e enraizamento ideais para a fase de aclimatação (Figura 3), independente do meio de cultura anterior. Ficou demonstrado que para citronela, este tipo de morfogênese é aparentemente favorecido pela ausência total de reguladores vegetais no meio de cultura.

Resultados semelhantes foram verificados por Catapan et al. (2001), os quais obtiveram 100% de enraizamento das microestacas de *Phyllanthus stipulatus* em meio MS sem regulador vegetal. Thomé et al. (2004), conseguiram induzir raízes em *Kalanchoe blossfeldiana* somente no meio de cultura desprovido de regulador vegetal. Já Zaniolo & Zanette (2002), conseguiram indução de raízes em erva-doce pela permanência das brotações durante 12 dias num meio suplementado com IBA, seguida da transferência para o meio isento de regulador vegetal.

No tratamento testemunha, ou seja, sem a adição de reguladores vegetais foi verificada a indução de organogênese direta, sendo que a formação de gemas adventícias foi precedida da formação de calo nos demais tratamentos. Gürel & Gülsen (1998), verificaram que não houve proliferação de brotos com a isenção de reguladores vegetais no meio de cultura, sendo essencial para a cultura de *Amygdalus communis*, um balanço entre BAP e IBA, para a obtenção de brotos. Através deste experimento, ficou evidente que para a cultura da citronela foi essencial à adição de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), favorecendo a multiplicação dos ápices caulinares, no entanto a adição do ácido indolbutírico (IBA) no meio de cultura, não influenciou significativamente na multiplicação “in vitro”, nem proporcionou enraizamento das plântulas de citronela.

A fase mais crítica da micropropagação é a aclimação, ou seja, fase de transferência das mudas produzidas “in vitro” para o ambiente natural ou um ambiente de transição, como uma casa de vegetação ou telado. Esta afirmação se deve à grande diferença existente entre as condições ambientais do laboratório e a do campo. Desta forma, existe a necessidade de adequar a cultura a um método de aclimação que permita a mais alta taxa de sobrevivência, sendo que o sucesso da micropropagação depende dessa transferência (HOFFMANN, 2002).

Quando as plântulas foram submetidas à aclimação (Figura 8), observou-se que o método utilizado proporcionou uma taxa média de sobrevivência de 98% aos 40 dias após a transferência. Esta alta taxa de sobrevivência, provavelmente esta relacionada com a boa qualidade da parte aérea e do sistema radicular das plântulas, pois segundo Grattapaglia & Machado (1998) o sucesso desta etapa depende da qualidade das plantas provenientes da fase anterior.



Figura 8 Plântulas de *Cymbopogon winterianus* durante a fase de aclimação.

Durante a fase de aclimação foi evidenciado uma boa adaptação das plantas as novas condições ambientais, iniciando o desenvolvimento de novas brotações, sendo que não foram evidenciadas alterações morfológicas. Flores et al. (2006) relataram que à medida que novas brotações foram se desenvolvendo, o crescimento tornou-se mais vigoroso e as plantas de *Pfaffia tuberosa* mais adaptadas.

Maciel et al. (2000) testaram alguns substratos, e verificaram que independente do substrato utilizado, houve 100% de sobrevivência de plântulas de *Saintpaulia ionantha*. Salazar et al. (2005), observaram que ao utilizar como substrato terra negra, 80% das plantas *Aster ericoides* regeneradas “in vitro” foram aclimatadas. Guerra et al. (1999) conseguiram uma taxa de sobrevivência de 95,5% na aclimação de plântulas micropropagadas de abacaxi, utilizando substrato em bandejas de isopor dispostas em túnel de nebulização. Thomé et al. (2004), por sua vez, relataram uma sobrevivência de 100% quando aclimataram plantas de *Kalanchoe blossfeldiana*, usando solo e 14 dias em câmara úmida.

O sistema de “floating” foi essencial para diminuir um dos maiores problemas observados durante a aclimatização que é a ocorrência de déficit hídrico, o mesmo e comentado por Hoffmann (2002). Czepak et al. (2003), verificaram que o sistema de “floating” favoreceu a adaptação das plântulas “ex-vitro” de *Cymbopogon citratus*, o mesmo foi observado por Reis et al. (1999).

Futuras pesquisas na área de fitotecnia são necessárias para averiguação do desenvolvimento no campo destas plantas micropropagadas.

5 CONCLUSÕES

O estabelecido protocolo regenerativo para a citronela de Java através da propagação “in vitro” é viável e possível:

I – A manutenção do cultivo asséptico foi mantido com a utilização do hipoclorito de sódio 0,5% no tempo de 30 minutos;

II – O ápice caulinar é o explante que apresenta maior capacidade regenerativa para a cultura da citronela;

III – O emprego de benzilaminopurina (BAP) é indispensável para o sucesso do estabelecimento “in vitro” da citronela, podendo ser utilizado na concentração de 2,0 mg L⁻¹. A utilização do ácido indolbutírico na multiplicação e enraizamento da citronela não apresentam resultados que justifique seu emprego;

O enraizamento foi evidenciado quando as plântulas micropropagadas foram inoculadas somente em meio de cultura MS, sendo que no tratamento testemunha houve organogênese direta;

O procedimento utilizado para a aclimatização das plântulas regeneradas “in vitro” foi fundamental para a sobrevivência destas quando transferidas para a casa de vegetação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N.de; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MORAIS, A.R.de; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. *Acta Amazônica*, v.33, n.1, p.1-7, 2003.

ALAM, M.; SATTAR, A.; JANARDHANAN, K.K.; HUSAIN, A. Lethal yellowing of Java citronella (*Cymbopogon winterianus*) caused by *Pythium aphanidermatum*. *Plant Disease*, v.76, n.10, p.1074-1076, 1992.

ALAM, M.; CHOURASIA, H.K.; SATTAR, A.; JANARDHANAN, K.K. Collar rot and wilt: a new disease of Java citronella (*Cymbopogon winterianus*) caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. *Plant Pathology*, v.43, n.6, p.1057-1061, 1994.

ALAM, M.; SATTAR, A. Epidemiology and management of lethal yellowing disease of Java citronella. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, v.22, n.1B, p.499-503, 2000.

ALMEIDA, J.L.; ALMEIDA, F.C.G.; NUNES, R.P.; ALMEIDA, F.A.G. Indução de enraizamento na micropropagação do urucueiro. *Rev. Fac. Agron., Maracay*, v.21, p.129-135, 1995.

ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* S. T. Blake. *Revista Árvore, Viçosa*, v.28, n.5, p, 643-653, set./out. 2004.

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, jan./mar. 2000

ARAÚJO, P.S.; SILVA, J.M.O.D. da; NECKEL, C.A.; IANSSEN, C.; OLTRAMARI, A.C.; PASSOS, R. dos.; TIEPO, E.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - Liliaceae). *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.25, P.54-57, mar./abr. 2002.

AZAD, M.A.K.; YOKOTA, S.; YAHARA, S.; YOSHIZAWA, N. Effects of explant type and growth regulators on organogenesis in a medicinal tree, *Phellodendron amurense* Rupr. Asian Journal of Plant Sciences, v.3, n.4, p.522-528, 2004.

BANDEIRA, J.M.; RUBIN, S.; LIMA, C.S.M.; SANTOS, L.S.; PÉTERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Adequação de protocolo para a micropropagação de *Mentha viridis* L. In: XIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e VII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2006, Pelotas. Anais... Pelotas: UFPEL, 2006.

BARSOTTI, D. Campo limpo. 2005. Disponível em:
<<http://www.acampolimpo.com.br/repelentes.htm>>. Acesso em: 05 out. 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.

BARUAH, A.; BORDOLOI, D.N. High frequency plant regeneration of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats by somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell Reports, v.8, n.8, p.483-485, dez. 1989.

BELTRÃO, A.E.S. Metabólitos secundários bioativos em cultura de tecidos de *Sideroxylon obtusifolium* e micropropagação de *Mentha x villosa* Hudson. João Pessoa, 2000. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba.

BELTRAO, A.E.S.; ANDRADE, F.A.S.B.; MARINHO, P.; OLIVEIRA, E. et al. Propagação clonal para extração de óleo essencial da *Mentha x villosa*. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2000, Recife. Resumos... Recife: UFPE, 2000. p. 79-79.

BIANCHI, V.J.; CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; FACHINELLO, J.C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. Revista Brasileira de Agrociência, v.9, n.2, p.177-179, abr./jun. 2003. (Nota Técnica).

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. Scientia Agricola, Piracicaba, v.55, n.2, p.196-202, 1998.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M. de A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1999. v.2. p. 679-735.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1998. v.1. p. 87-132.

CANTAGALLO, F.S.; AZEVEDO, F.A.de; SCHINOR, E.H.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Micropropagação de citrumelo 'Swingle' através do cultivo de gemas axilares. Revista Brasileira de Fruticultura, v.27, n.1, p.136-138, abr. 2005.

CARVALHO, J.M.F.C.; CARTAXO, G.; COSTA, J.N da; VIDAL, M.S.; SANTOS, J.W.dos. Indução *in vitro* de superbrotaamento em gemas de espécies do gênero *Agave*. Revista Brasileira Ol. Fibrós., Campina Grande, v.8, n.2/3, p.869-873, mai./dez. 2004.

CASTRO, L.O.; CHEMALE, V.M. Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo. Guaíba, 1995. 194p.

CASTRO, L.O. de; RAMOS, R.L.D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., 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, 2002. 31p. (Boletim FEPAGRO, 11)

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

CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; BIANCHI, V.J. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. Revista Brasileira de Agrociência, v.10, n.2, p.249-250, abr./jun. 2004. (Nota Técnica).

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.

CID, L.P.B. Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180p.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, n.19, p.16-21, mar./abr. 2001.

CITRONELA de Java dá fim aos mosquitos. Diário Popular, Pelotas, 28 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.diariopopular.com.br.htm>>. Acesso em: 05 out. 2005.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica. Petrópolis: Vozes, 1998. 245p.

CORRÊA JUNIOR, C.; LIN, C.M.; SCHEFFER, M.C. Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. Curitiba: EMATER/PR, 1991. 158p.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S. et al. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: EUFC, 1981. 210p.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2.ed. New York: The New York Botanical Garden Bronx, 1988. 279p.

CURIOSIDADES do mundo natural. 2002. Disponível em: <http://www.terra.com.br/curiosidades/mundonat/mundonat_17.htm>. Acesso em: 10 fev. 2006.

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 Agrônomo, 2003. p.117

DANTAS, A.C.M.; MORAES, L.K.A.de.; PEDROTTI, E.L.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Superação *in vitro* da dormência de embriões do porta-enxerto de macieira M9 (*Malus pumilla* Mill.). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.24, n.1, p.10-14, abr. 2002.

DEBIASI, C.; ZAFFARI, G.R.; SALERNO, A.R.; GUERRA, M.P. Correlação entre a capacidade proliferativa *in vitro* e a dominância apical *in vivo* da bananeira cvs. Grand Naine e Nanicão. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.24, n.3, p.597-600, dez, 2002.

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

DIAS, T.A.B. Recursos genéticos de plantas medicinais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 33., 1993, Brasília. Ciclo de palestras... Brasília: Sociedade Brasileira de Olericultura, 1993. Apost. 25p.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.H. Experiments in plant tissue culture. New York: Cambridge University, 1982. 178p.

DODE, L.B.; BOBROWSKI, V.L.; BRAGA, E.J.B.; SEIXAS, F.K.; SCHUCH, M.W. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá, v.25, n.2, p.435-437, 2003.

DOMINGUES, E.T.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J. Cultura de ápices caulinares de *Musa* sp. var Maça: estabelecimento, micropropagação e enraizamento *in vitro*. Scientia Agrícola, Piracicaba, v.52, n.2, p.387-394, 1995.

DUVAL, C.M.; CALDAS, L.S.; RESENDE, R.O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1998. v.1. p. 45-68.

ERIG, A.C.; FORTES, G.R.L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. Ciência Rural, Santa Maria, v.32, n.4, p.577-582, 2002.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. Ciência Rural, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, set./out. 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. galaxy, maxigala e mastergala. Revista Brasileira de Agrociência, v.9, n.3, p.221-227, jul./set. 2003a.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Regeneração *in vitro* de brotações de Pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick. Ciência Rural, v.33, n.3, p.443-448, mai./jun. 2003b.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). Revista Brasileira de Agrociência, v.4, n.3, p.201-205, set./dez. 1998.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. Ciência Rural, v.36, n.3, p.845-851, mai./jun. 2006.

GIACOMETTI, D.C. Ervas condimentares e especiarias. São Paulo: Nobel, 1989.

GONZÁLEZ, H.R, SOSA, I.H, FERRADÁ, C.A.R; AMITAS, M.M.R. Propagación in vitro de *Artemisia absinthium* L. en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales, v.8, n.1, p.0-0, jan./ abr. 2003.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999.

GÜREL, S.; GÜLSEN, Y. The effects of IBA and BAP on in vitro shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). Tr. J. of Botany, v.22, p.375-379, 1998.

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

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP / Embrapa – CNPH, 1990. p.203–212.

HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.21-24, 2002.

IKUTA, A.R.Y. Estudos sobre propagação de marcela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. In: MING, L.C.; SCHEFFER, M.C.; CORRÊA JUNIOR, C.; BARROS, I.B.I.; MATTOS, J.K.de A. Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica. Botucatu: UNESP, 1998. v.2. p.23-42.

BLANCO, R.A. Citronela. 2000. Disponível em:
<<http://www.jardimdeflores.com.br.htm>>. Acesso em: 05 out. 2005.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v.1, n.1, p.30-33, 1997.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1999. v.2. p. 519-531.

KREUZER, H; MASSEY, A. Engenharia genética e biotecnologia. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 434p.

LARA, A.; VALVERDE, R.; GÓMEZ, L.; HIDALGO, N. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. Agronomía Costarricense, v.27, n.2, p.7-20, 2003.

LÁSZLÓ, F. Capins na Aromaterapia. 2000. Disponível em:
<<http://www.jardimdeflores.com.br/sinergia/S10capins.htm>> Acesso em: 10 fev. 2006.

LEE, T.S.G. Biofábrica: produção industrial de plantas 'in vitro'. In: LEE, T.S.G. (Ed.). Biofábrica: produção industrial de plantas 'in vitro'. Araras: UFSCar, 1995. p.9-17.

MACIEL, A.L.R.; SILVA, A.B.da.; PASQUAL, M. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.24, n.1, p.9-12, jan./mar., 2000

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. Viçosa: UFV, 2000. 220p.

MELO, M.O.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Quantificação da micropropagação de *Curcuma zedoaria* Roscoe. Scientia Agricola, v.57, n.4, p.703-707, out./dez. 2000.

MELO, B.de.; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, nov./dez. 2001.

MENDANHA, A.B.L.; TORRES, R.A.A. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v.21, n.3, p.395-398, 1998.

MING, L.C. Mesa redonda sobre plantas medicinais no ensino de 3º grau. In: CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 1., 1999, Maringá. Mesa redonda... Máringa: UEM, 1999.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. ABCTP Notícias, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.

MOURA, T.L.de; ALMEIDA, W.A.B.de; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, ago. 2001.

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

NAYAK, S.; DEBATA, B.K.; SAHOO, S. Rapid propagation of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Nees) Wats.) through somatic embryogenesis *in vitro*. Plant Cell Reports, v.15, n.5, p.367-370, jan. 1996.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKY, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.L. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. Ciência e Agrotecnologia, Lavras (Edição Especial), p.1499-1506, dez. 2002.

OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica. São Paulo: Atheneu, 2000. 178p.

OLIVEIRA, A.K.D. de; ROCHA, R.H.C.; OLIVEIRA, O.F.de; CÂMARA, F.A.A. Multiplicação *in vitro* do bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Caatinga, Mossoró, v.14, n.1-2, p.37-41, dez. 2001.

OLIVEIRA, A.J.B.de; CARVALHO, V.M.de; FERREIRA, A.; SATO, F.Y.; MACHADO, M.F.P.S. In vitro multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). Revista Árvore, Viçosa, v.27, n.4, p.421-425, 2003.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação. Lavras: UFLA, 1997. 159p.

PATNAIK, J.; SAHOO, S.; DEBATA, B.K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of palmarosa grass (*Cymbopogon martinii*). Plant Cell Reports, v.16, n.6, p.430-434, mar. 1997.

PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira santa). In: MING, L.C.; SCHEFFER, M.C.; CORRÊA JUNIOR, C.; BARROS, I.B.I.; MATTOS, J.K.de A. Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica. Botucatu: UNESP, 1998. v.1. p.19-32.

PEREIRA, A.M.S. Cultura de tecidos de plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JÚNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. (org.). Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais. 1.ed. Cuiabá: UNICEN, 2003. v.1. p. 183-193.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M. das G.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.74-80, dez. 2000.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v.4 n.25, p.44-48, mar./abr. 2002.

RAO, B.R.R.; BHATTACHARYA, A.K.; MALLAVARAPU, G.R.; RAMESH, S. Yellowing and crinkling disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.). Flavour and Fragrance Journal, v.19, n.4, p.344-350, 2004.

REIS, A.F.; LATADO, R.R.; TULMANN NETO, A. Micropropagação de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). In: VII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 1999, São Paulo. Anais... São Paulo: USP, 1999.

RIBEIRO, E. Plantas medicinais e complementos bioterápicos. Portugal: Vida, 1995. 290p.

ROCHA, P.S.G. da; SCHUCH, M.W.; BRAGA, E.J.B. Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis*), cultivar 'seleta'. Revista Brasileira de Agrociências, v.10, n.4, p.445-448, out./dez. 2004.

RUEB, S.; LENEMEN, M.; SCHILPEROORT, R.A.; et al.. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Hague-Holanda, v.36, p. 259-264, 1994.

SABÁ, R.T.; LAMEIRA, O.A.; LUZ, J.M.Q.; GOMES, A.P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, n.1, p.106-109, mar. 2002.

SAHA, H.; GHOSH, P.D. In vitro plant regeneration of citronella Java (*Cymbopogon winterianus* var. *mandakini*) using leaf explants and variation in the essential oil content in the regenerates. *Journal of Hill Research*, v.16, n.2, p.94-98, 2003.

SALAZAR, R.; VARGAS, T.E.; DE GARCIA, E.; OROPEZA, M. Micropropagacion y organogenesis de *Aster ericoides* cultivar "monte cassino". *INCI*, v.30, n.5, p.295-299, mai. 2005.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.de; SOUZA, V.C.de; DORNELAS, G.V. Controle de contaminação e oxidação na micropropagação do pau d'álho (*Gallesia gorazema* Moq.). *Agropecuária Técnica*, Areia, v.25, n.2, p.65-70, 2004.

SILVA, A.R. da. *Aromaterapia: em dermatologia e estética*. São Paulo: Roca, 2004. 432p.

SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; SALES, J.F.; DIVINO, S.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, mai./jun. 2003.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.R.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: UFRGS, 1989. 174p.

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

SINGH, H.B.; KALRA, A.; PATRA, N.K. Sheath rot and leaf blight: A new disease of Java citronella caused by *Rhizoctonia solani*. *Bulletin OEPP*, v.27, n.2-3, p.269-271, 1997.

SONTAKKE, B.K.; MOHANTY, S.K.; KOLE, C.R. Insect pests of citronella. *Indian Perfumer*, v.35, n.2, p.86-89, 1991.

SREENATH, H.L.; JAGADISHCHANDRA, K.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence culture of Java citronella (*Cymbopogon winterianus*). *Annals of Botany*, v.64, n.2, p.211-215, 1989.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

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.

THENGANE, S. R.; BHOSLE, S. V.; DEODHAR, S. R.; PAWAR, K. D.; KULKARNI, D. K. Micropropagation of Indian laurel (*Calophyllum inophyllum*), a source of anti-HIV compounds. *Current Science*, v.90, n.10, p.1393-1397, mai. 2006.

THOMÉ, G.C.H.; GRESSLER, P.D.; SANTOS, G.dos. Propagação *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., via organogênese. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.10, n.2, p.197-202, abr./jun. 2004.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa, 1998. v.1. p. 11-20.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G. de; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa AAB*) *in vitro*: IV. concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v.23, n.2, p.409-412, ago. 2001. (Comunicação Científica).

VERLET, N. Comercial aspects. In: HAY, R.K.M.; WATERMAN, P.G. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*. Essex: Longman Group, 1993. p.137-174.

VOLÁK, J.; STODOLA, J. *Plantas medicinais*. Portugal: Inquérito, 1990.

ZANIOLO, S.R.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria, Curitiba*, v. 2, n. 1-2, p. 31-36, 2002.

ZIGIOTTO, D.C. Micropropagação de citronela (*Cymbopogon winterianus* L.). Marechal Cândido Rondon, 2004. 40p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

ZIGIOTTO, D.C.; GUIMARÃES, V.F.; DALL'OGGIO, E.I.; SCHERER, L.M.; CZEPAK, M.P. Efeito de reguladores vegetais na propagação *in vitro* de citronela (*Cymbopogon winterianus* L.). In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL E XII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE FISILOGIA VEGETAL, 2005, Recife. Anais... Recife: UFPE, 2005.