Influência de métodos de desinfestação e tipos de explantes no estabelecimento *in vitro* de acessos de vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberly].

Almeida, Sílvia Ávila de¹; Santos, Aline Borba dos¹; Almeida, Thatiana Carvalho Santos¹; Arrigoni-Blank, Maria de Fátima²; Blank, Arie Fitzgerald¹.

¹UFS - Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos - DEA, Av. Marechal Rondon s/n, 49100-000 São Cristóvão-SE; ²UFS - Campus Prof. Alberto Carvalho - Núcleo de Ciências Biológicas - 49500-000 Itabaiana-SE. E-mail: arrigoni@ufs.br (Apoio: CNPq).

Introdução

O vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberly syn. *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash] (Poaceae), é uma espécie medicinal e aromática originária da Ásia Tropical (Índia, Ceilão e Malásia) e popularmente conhecido por capim-cheiroso, falso-patchouli, capim-barata, khus-khus ou khas-khas (Índia) (Castro e Ramos, 2003; Adams et al., 2003). Segundo Lavania (2003), o Centro de Origem Primária, de acordo com estudos morfotaxonomícos de vetiver, é o Sul da Índia, de onde se espalhou para o mundo. No Sul da Índia foi encontrada a maior diversidade para as variáveis, reprodução sexuada e composição química do óleo essencial (Lavania, 2003).

É uma espécie perene, com caule rizomatoso, cilíndrico e raízes aromáticas. As folhas são alternas distícas, relativamente rígidas, compridas (até 75 cm), finas (menos de 8 mm) e lisas. As inflorescências são do tipo panícula (15 a 30 cm de comprimento), espiguetas sésseis com duas flores, sendo a superior hermafrodita (com três estames, anteras rimosas, dois estigmas plumosos e ovário súpero) e a inferior masculina (Veldkamp, 1999; Souza e Lorenzi, 2005). Análise citológica revela $2n = 20$ cromossomas (Veldkamp, 1999).

Por possuir uma perfilhação abundante, é usado na formação de barreiras para contenção do solo em áreas inclinadas. Sua parte aérea (colmos e folhas) é usada para a cobertura de construções rurais rústicas, para o artesanato (esteiras, biombos, divisórias) e para a cobertura do solo (Adams et al., 2004). As raízes são usadas, ao natural, como repelentes de insetos para usos domésticos (Castro e Ramos, 2003) e o óleo essencial apresenta uma forte atividade cupinícida, antimicrobiana e antioxidante, e é usado pela indústria de perfumaria (Kim et al., 2005).

Para o estabelecimento de protocolo de micropropagação de uma espécie é necessário primeiro estabelecê-la *in vitro*. O elevado grau de contaminação e a localização sistêmica de microorganismos são responsáveis, às vezes, pelo insucesso de uma cultura *in vitro*. Na desinfestação do explante a maior dificuldade é obtê-lo descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado. Para isso várias substâncias com ação germicida têm sido utilizadas, como o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio (Grattapaglia e Machado, 1998). Em amoreira-preta (*Rubus* sp.) a contaminação dos explantes foi reduzida com a imersão de explantes em solução de hipoclorito de sódio-NaOCl a 0,5% em diferentes tempos de imersão (0, 10, 20 e 30 minutos) (Augusto e Biasi, 2002). Em *Lippia integrifolia* obteve-se 24% de contaminação, utilizando solução de NaOCl a 1,2% por 30 minutos (Passera e Ambrosetti, 1999) e em *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. obteve-se o controle da contaminação com 10% de NaOCl por 10 minutos (Juliani et al., 1999).

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito de métodos de desinfestação e tipos de explantes no estabelecimento *in vitro* de acessos de vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberly].

Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agrônômica da UFS.

Para o estabelecimento de vetiver *in vitro*, foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 10 mm, obtidos a partir da haste floral. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 2 com cinco repetições e quatro frascos por repetição. Testou-se o efeito de três métodos de desinfestação (hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% por 15 minutos; hipoclorito de cálcio (CaOCl₂) 4%, 2,5% e 1% por 20, 15 e 5 minutos, respectivamente, e cloreto de Mercúrio (Hg₂Cl₂) 0,1% por 5 minutos), dois acessos (UFS-VET001 e UFS-VET003) do Banco Ativo de Germoplasma da UFS e dois tipos de explantes (inteiro e partido). Após cada tratamento os explantes foram lavados três vezes em água estéril.

Os segmentos foram lavados em água corrente por 30 minutos e em seguida imersos em solução tween-20 (0,05%) por 3 minutos e lavagem em água destilada. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram submetidos aos diferentes tratamentos de desinfestação.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo cerca de 10ml de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), semi-sólido, suplementado com sacarose e ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e foi esterilizado em autoclave a 121±1°C e 1,05 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz, proveniente de luz fluorescente branca fria.

Aos 30 dias de cultivo foi avaliado o número total de propágulos regenerados. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos, foram comparados pelo Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Usando explantes inteiros do acesso UFS-VET001 observou-se maior regeneração de propágulos quando a desinfestação foi feita com cloreto de mercúrio (Tabela 1). Já para o acesso UFS-VET003 não houve diferença significativa entre os métodos de desinfestação (Tabela 1). O uso de cloreto mercúrio também mostrou boa regeneração em patchouli (*Pogostemon cablin*) (Kukreja et al., 1990) e gerânio (*Pelargonium graveolens*) (Saxena et al., 2000).

Com relação ao tipo de explante (inteiro ou partido), os explantes inteiros demonstraram maiores taxas de regeneração quando comparados aos partidos, quando se usou cloreto de mercúrio e hipoclorito de sódio no acesso UFS-VET003 (Tabela 1).

Usando cloreto de mercúrio para a desinfestação, o acesso UFS-VET001 apresentou maior regeneração que o UFS-VET003. Já no uso de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio em explantes inteiros o acesso UFS-VET003 apresentou maior regeneração que o UFS-VET001 (Tabela 1).

Tabela 1. Regeneração (%) de propágulos de acessos de vetiver (*C. zizanioides*) submetidos a diferentes métodos desinfestação e tipos de explante. São Cristóvão, UFS, 2006.

Acesso	Método de desinfestação		
	NaOCl	CaOCl ₂	Hg ₂ Cl ₂
Explante inteiro			
UFS-VET001	5,00 b B α	3,33 b B α	56,67 a A α
UFS-VET003	21,67 a A α	16,67 a A α	26,67 b A α
Explante partido			
UFS-VET001	10,00 a A α	20,00 a A α	27,50 a A β
UFS-VET003	3,33 a A β	8,33 a A α	6,67 b A β
CV(%)	51,02		

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, maiúsculas, nas linhas, e gregas, entre explantes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Uma desinfestação eficiente de vetiver esta sendo um desafio em virtude da dificuldade de se manter plantas em vasos e ambiente telado uma vez que o sistema radicular é extremamente agressivo e até o momento apenas hastes florais têm possibilitado uma regeneração de plantas *in vitro*. Assim, outros tipos de agentes químicos e tempos de desinfestações deverão ser testados. Trabalhando com *Brachiaria* sp., Cabral et al. (2003), conseguiram uma boa desinfestação utilizando hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos.

Conclusões

Não é viável a utilização de explantes partidos e a desinfestação com cloreto de mercúrio foi a mais eficiente. Novos testes deverão ser realizados na tentativa de se descobrir métodos mais eficientes.

Referências Bibliográficas

ADAMS, R.P.; PANDEY, R.N.; DAFFORN, M.R.; JAMES, S.A. Vetiver DNA-Fingerprinted cultivars: effects of environment on growth, oil yields and composition. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p.363-371, 2003.

ADAMS, R.P.; HABTE, M.; PARK, S.; DAFFORN, M.R. Preliminary comparison of vetiver root essential oils from cleansed (bacteria- and fungus-free) versus non-cleansed (normal) vetiver plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.1137-1144, 2004.

AUGUSTO, C.S.S.; BIASI, L.A. Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos. **Scientia Agraria**, v. 3, p.114-114, 2002.

CABRAL, G.B.; PIRES, M.V.V.; LACERDA, A.L.; CARNEIRO, V.T.C. **Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4p. (Comunicado Técnico, 101).

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica/ Embrapa Hortaliças, 1998. p. 183-260.

KIM, H.J.; CHEN, F.; WANG, X.; CHUNG, H.Y.; JIN, Z. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. V.53, p. 7691-7695, 2005.

KUKREJA, A.K.; MATHUR, A.K.; ZAIM, M. Mass production of virus-free patchouli plants [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] by *in vitro* culture. **Tropical Agriculture**, v.67, n.2, p.101-104, 1990.

JULIANI JUNIOR HR; KOROCH AR; JULIANI HR; TRIPPI VS. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, v. 59, n. 175-179, 1999.

LAVANIA, U.C. Other uses and utilization of vetiver: Vetiver oil. In: INTERNATIONAL VETIVER CONFERENCE, 3. **Proceedings...**China: TVN, 2003. p. 486-491.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.

PASSERA, C.B.; AMBROSETTI, J. A. In vitro propagation of "Incauyo", *Lippia intergrifolia* (Gris.) Hier. (Verbenaceae), a medicinal and aromatic plant of Monte Phytogeographical Province, Argentina. **Acta Horticulturae**, n.502, p.319-324, 1999.

SAXENA, G.; BANERJEE, S.; RAHMAN, L.; MALLAVARAPU, G.R.; SHARMA, S.; KUMAR, S. An efficient in vitro procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium*. **Plant Science**, v.155, p.133-140, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG 11. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

VELDKAMP, J.F. A revision of *Chrysopogon* Trin. Including *Vetiveria* Bory (Poaceae) in Thailand and Malesia with notes on some other species from Africa and Australia. **Austrobaileya**, v. 5, p. 503-533, 1999.

Palavras-chaves: vetiver, micropropagação, assepsia, explante.