

Propagação e conservação *in vitro* de vetiver

Thatiana C Santos; Maria de Fátima Arrigoni-Blank; Arie F Blank

UFS, Depto. Eng. Agrônômica, Av. Marechal Rondon s/n, 49100-000 São Cristóvão-SE; thati.carvalho@gmail.com; arrigoni@ufs.br; afblank@ufs.br

RESUMO

O vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) é um capim perene com características físico-químicas e agronômicas importantes que o torna uma espécie destaque. De suas raízes é extraído um óleo essencial utilizado amplamente na produção de perfumes e devido à sua baixa volatilidade, como fixador de odor. Esse trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de propagação e de conservação *in vitro* de vetiver. Para o ensaio de multiplicação *in vitro* testaram-se combinações dos reguladores de crescimento BAP e ANA. Na aclimatização foram testados substratos contendo pó de coco e/ou vermiculita suplementado com calcário, fertilizante NPK (3-12-6) e concentrações dos sais do meio MS. Nos ensaios de conservação *in vitro* foram avaliadas as temperaturas de 18 e 25°C, reguladores osmóticos (sacarose, manitol e sorbitol), o inibidor de crescimento ABA e diferentes concentrações dos sais MS. Verificou-se que a micropropagação de vetiver UFS-VET003 é promovida em meio MS líquido acrescido de 3,33 mg L⁻¹ de BAP, sendo a etapa de enraizamento das brotações proporcionada em meio MS básico, também líquido. Para aclimatização recomenda-se o substrato PBC. A conservação *in vitro* é possível em meio MS semissólido com 25% dos sais MS e temperatura de 18°C por um período de 270 dias.

Palavras-chave: *Chrysopogon zizanioides*, micropropagação, aclimatização, substratos, cultura de tecidos.

ABSTRACT

In vitro propagation and conservation of vetiver grass

Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) is a perennial grass which presents physicochemical and agronomic characteristics that highlights the importance of this species. From the roots of vetiver grass essential oil is extracted which is widely used for perfume production, and because of its low volatility it is used as fragrance fixer. We developed a protocol for *in vitro* propagation and conservation of vetiver grass. For the *in vitro* multiplication assay, combinations of the growth regulators BAP and NAA were tested. For acclimatization, substrates containing coconut coir and/or vermiculite, supplemented with limestone, NPK (3-12-6) fertilizer and the salts of MS medium were tested. In the *in vitro* conservation assays, we evaluated the temperatures of 18 and 25°C, osmotic regulators (sacarose, manitol and sorbitol), the growth inhibitor ABA, and different concentrations of MS salts. The accession UFS-VET003 can be micropropagated using MS liquid medium in the presence of 3.33 mg L⁻¹ of BAP. Rooting can be obtained using MS liquid medium without growth regulators. Coconut coir dust can be used as substrate for the acclimatization of micropropagated plants. *In vitro* conservation is possible for a period of 270 days using semi-solid medium with 25% MS salt strength and temperature of 18°C.

Keywords: *Chrysopogon zizanioides*, micropropagation, acclimatization, substrates, tissue culture.

(Recebido para publicação em 24 de outubro de 2011; aceito em 3 de julho de 2012)

(Received on October 24, 2011; accepted on July 3, 2012)

O capim vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) é uma planta perene de regiões tropicais e subtropicais pertencente à família Poaceae. Diferentemente da maioria das gramíneas o seu óleo essencial é extraído das raízes, sendo este uma mistura complexa de alcoóis e sesquiterpenos hidrocarbonetos, possuindo alta viscosidade e uma taxa extremamente lenta de volatilidade (Lavania, 2003; Massardo *et al.*, 2006) e por isso é utilizado como um dos melhores fixadores de odor na indústria de perfumaria (Lavania, 2003). Também é utilizado como flavorizante e conservante de alimentos (NRC, 1993), inseticida e repelente de insetos (Maistrello & Henderson, 2000), cupinicida (Zhu *et*

al., 2001), antimicrobiano e antioxidante (Kim *et al.*, 2005), anti-hipertensivo leve, diurético e contra queda de cabelos (Alencar *et al.*, 2005).

Além do óleo essencial, o capim vetiver destaca-se por possuir perfilhação abundante e raízes numerosas e longas, sendo usado na formação de barreiras para contenção do solo em áreas inclinadas, como também na manutenção da umidade do mesmo e na conservação de solos e de águas contaminadas. A parte aérea (colmos e folhas) é usada para a cobertura de construções rurais rústicas, em artesanato (esteiras, biombos, divisórias, entre outros) e para cobertura do solo (Adams *et al.*, 2004), enquanto as raízes são usadas, ao natural, como

repelentes de insetos de uso doméstico (Castro & Ramos, 2002) e artesanato (Adams *et al.*, 2004).

A micropropagação é uma das técnicas mais utilizadas da cultura de tecidos. Em estudo já realizado, foi relatado para o vetiver, o máximo de oito novas brotações/explante, quando cultivado em meio MS líquido acrescido de 2 a 4 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) (Be *et al.*, 2008).

A seleção do substrato é de fundamental importância para o sucesso da aclimatização das plantas micropropagadas. Este deve ter baixa densidade, ser rico em nutrientes, ter composição química equilibrada e física uniforme, aeração e drenagem apropriadas e boa

coesão entre as partículas e raízes (Couto *et al.*, 2003).

A conservação *in vitro* funciona como alternativa complementar aos métodos convencionais para manutenção de bancos de germoplasma. O método de conservação *in vitro* obtido via meio de cultura para crescimento lento envolve a manutenção de plantas em laboratório sob metabolismo reduzido, mediante subculturas periódicas de segmentos apicais e nodais (Souza *et al.*, 2009). A utilização dessa técnica permite aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos sem afetar a viabilidade das culturas, proporcionando redução de custos da mão de obra (Moosikapala & Te-Chato, 2010). Dentre as principais estratégias para limitar o crescimento das plantas *in vitro* estão a redução da temperatura e da intensidade luminosa, redução nas concentrações de sais do meio de cultura, omissão de elementos nutritivos e a adição de agentes osmóticos, como manitol e sorbitol e inibidores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) (Souza *et al.*, 2009).

O objetivo desse trabalho foi desenvolver protocolo de propagação e de conservação *in vitro* de vetiver.

MATERIAL E MÉTODOS

Multiplicação *in vitro* - Foram utilizadas, como explantes, microplantas de aproximadamente 2,0 a 3,0 cm já estabelecidas *in vitro* do acesso UFS-VET003, oriundas do banco de germoplasma da UFS.

O meio de cultivo utilizado foi o MS líquido acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,7±0,1. O meio de cultura foi autoclavado (121°C e 1,05 atm) por 15 minutos. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz, 25±2°C e intensidade luminosa de 60 µmol m⁻² s⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x4, sendo avaliadas cinco concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg L⁻¹) de 6-benzilamino purina (BAP) e quatro (0,0; 0,01; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹) de ácido naftalenoacético (ANA). Cada ensaio foi feito com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de quatro frascos com uma

brotação/frasco, contendo 5 mL de meio de cultura.

Aos 40 dias foram analisadas as variáveis sobrevivência (%), número de novas brotações e massa seca (mg) da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR). Para a obtenção de massa seca o material foi mantido em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 40°C por 3 dias.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativas, as médias foram comparadas por regressões polinomiais a 5% de probabilidade.

Acclimatização - O ensaio foi conduzido em estufa agrícola protegida com tela sombrite 50% e nebulização intermitente. As mudas micropropagadas de vetiver foram lavadas em água corrente para eliminação do meio de cultura aderido às raízes e transplantadas em bandejas de poliestireno expandido com 72 células contendo diferentes substratos. Testaram-se seis misturas de substratos, sendo pó de coco + 12 g L⁻¹ de fertilizante formulado (NPK 3-12-6 + Ca, S, Zn, B, Cu, Fe, Mn e B a 3,0-2,5-0,1-0,025-0,01-0,075-0,05 e 0,0015%, respectivamente) + calcário (1 g L⁻¹) [PBC]; pó de coco + vermiculita (1:1) + fertilizante formulado (12 g L⁻¹) + calcário (1 g L⁻¹) [PBCV (1:1)]; pó de coco + vermiculita (2:1) + fertilizante formulado (12 g L⁻¹) + calcário (1 g L⁻¹) [PBCV (2:1)]; vermiculita acrescido de sais do MS (100%) [VMS]; vermiculita + 12 g L⁻¹ de fertilizante formulado [VMB]; pó de coco + 1 g L⁻¹ de calcário + sais do MS (100%) [PCMS]. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo quatro repetições com quatro plantas cada.

Aos 30 dias, foram avaliadas as variáveis sobrevivência (%), massa seca (mg) da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). Para os tratamentos em que se utilizaram sais do MS, este foi acrescido em um volume de 15 mL por tubete, semanalmente. Para a obtenção de massa seca, o material foi mantido em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 40°C por 3 dias.

Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%

de probabilidade.

Conservação *in vitro*

Ensaio 1 - O ensaio foi em esquema fatorial 3 x 2, sendo três fontes de carbono e reguladores osmóticos (20 g L⁻¹ de sacarose; 10 g L⁻¹ de sacarose + 5 g L⁻¹ de manitol; 10 g L⁻¹ de sacarose + 5 g L⁻¹ de sorbitol) e duas condições de temperatura (18 e 25°C). Cada tratamento foi constituído de seis repetições, sendo cada parcela representada por quatro tubos. Aos 90 e 180 dias de cultivo, foram avaliadas a sobrevivência (%) e a viabilidade dos explantes de acordo com a seguinte escala de notas: 1= folhas totalmente verdes; 2= início de secamento; 3= entre 30% e 50% das folhas e brotos mortos; 4= mais de 50% das folhas mortas e mais de dois brotos vivos; 5= folhas e brotos totalmente mortos (adaptado de Lemos *et al.*, 2002).

Ensaio 2 - O ensaio foi em esquema fatorial 5 x 2, sendo cinco concentrações de ácido abscísico (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) e duas condições de temperatura (18 e 25°C). Foram acrescidos ao meio de cultura em todos os tratamentos 10 g L⁻¹ de sacarose e 5 g L⁻¹ de sorbitol. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, sendo cada repetição representada por quatro tubos de ensaio. Aos 90 e 180 dias de cultivo foram avaliadas a sobrevivência dos explantes (%) e a viabilidade de acordo com a seguinte escala de notas para coloração de folhas: 1= folhas totalmente verde; 2= início do secamento das folhas; 3= entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas; 5= folhas totalmente mortas; e para tamanho das folhas: 1= do mesmo tamanho inoculado (2-3 cm), 2= até o dobro do tamanho inoculado e 3= mais que o dobro do tamanho inoculado (Adaptado de Lemos *et al.*, 2002).

Ensaio 3 - Nesse ensaio foram utilizados como tratamentos quatro concentrações de sais do meio MS (100%, 75%, 50% e 25% dos sais). Foram acrescidos ao meio de cultura em todos os tratamentos 10 g L⁻¹ de sacarose e 5 g L⁻¹ de sorbitol. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, sendo cada repetição representada por cinco tubos de ensaio com uma brotação cada. Aos 90, 180 e 270 dias de cultivo foi avaliada a sobrevivência (%) e viabilidade dos explantes de acordo com a

escala de notas do ensaio anterior.

Os ensaios de conservação foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O meio de cultura base utilizado foi MS, suplementado com 7 g L⁻¹ de agar e 0,002 mg L⁻¹ de ANA e 0,2 mg L⁻¹ de BAP com pH ajustado para 5,7±0,1. A autoclavagem foi realizada a 121±1°C em 1,05 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 µmol m⁻² s⁻¹ e/ou em BOD a 18°C. Foram utilizados como explantes brotações com 2-3 cm de comprimento de plantas já estabelecidas *in vitro*, sendo inoculada uma brotação/tubo de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura.

Para a avaliação, os valores obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e quando significativos, as médias foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Multiplicação *in vitro* - A análise de variância evidenciou interação significativa entre os reguladores de crescimento BAP e ANA apenas para a variável sobrevivência onde foram observados valores entre 81,3 e 100% na maioria dos tratamentos utilizados, com exceção dos tratamentos que continham 4 mg L⁻¹ de BAP acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 6 mg L⁻¹ de BAP na presença de ANA. O ponto máximo obtido foi representado por equações quadráticas onde a taxa de 100% de sobrevivência foi alcançada na concentração de 2,02 mg L⁻¹ de BAP acrescido de 0,042 mg L⁻¹ de ANA (dados não apresentados).

As diferentes concentrações de BAP exerceram influência significativa para as variáveis número de brotações/explante e massa seca de parte aérea e raiz (Tabela 1).

O ponto máximo obtido para a variável brotações/explante foi representado por uma equação quadrática onde 37 brotações/explante foram conseguidas quando se adicionou ao meio de cultivo 3,33 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 1). Valores inferiores foram obtidos por Be *et al.* (2008), trabalhando com veti-

Tabela 1. Número de brotações por explante, massa seca de parte aérea e de raízes de plantas do acesso UFS-VET003 de vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) em função de concentrações de BAP (number of shoots per explant, dry weight of shoots and roots of vetiver accession UFS-VET003 depending on BAP concentrations). São Cristóvão, UFS, 2011.

BAP (mg/L)	Brotações/explante (n°)	Massa seca (mg)	
		Parte aérea	Raiz
0,0	4,97	54,67	25,07
1,0	28,62	93,78	8,11
2,0	26,79	93,29	5,17
4,0	37,31	100,92	4,05
6,0	17,71	83,95	3,98
Equação (Y)	7,1+17,93X-2,69X ² R ² =87,46	60,53+25,55X-3,65X ² R ² =85,52	21,97-10,63X+1,31X ² R ² =85,78
CV (%)	24,88	19,52	26,61

Tabela 2. Viabilidade de plantas do acesso UFS-VET003 de vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) em função da interação entre reguladores osmóticos e fontes de carbono e temperaturas aos 180 dias de cultivo (viability of vetiver accession UFS-VET003 depending on the interaction among osmotic regulators and carbon sources and temperatures at 180 days of cultivation). São Cristóvão, UFS, 2011.

Meio MS	Viabilidade (notas 1 a 5)* (S%)**	
	18°C	25°C
Sacarose (20 g/L)	3,90 aA (75)	5,0 aB (0)
Sacarose (10 g/L) + Manitol (5 g/L)	4,50 abA(30)	5,0 aA (0)
Sacarose (10 g/L) + Sorbitol (5 g/L)	4,75 bA (15)	4,9 aA (5)
CV (%)	4,14	

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, maiúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) (means followed by the same lowercase letters in the columns and uppercase letters in the lines did not differ from each other by the Tukey test, p<0,05). *Notas de viabilidade: 1= folhas totalmente verdes; 2= início do secamento e morte das folhas; 3= entre 30 e 50% das folhas e brotos mortos; 4= mais de 50% das folhas mortas e mais de dois brotos vivos; 5= todas as folhas e brotos mortos (viability score: 1= leaves totally green, 2= start of drying and death of leaves, 3= between 30 and 50% of the leaves and shoots are dead, 4= more than 50% of the leaves are dead and more than two living shoots; 5= death of all leaves and buds). **Porcentagem de sobrevivência de plantas (percentage of plant survival).

ver em meio MS líquido acrescido de BAP (2 a 4 mg L⁻¹), obtendo apenas oito brotações. Apesar de se tratar da mesma espécie, é importante ressaltar que, não só o genótipo, como também a interação entre substâncias endógenas e reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura são determinantes para os resultados obtidos em cada estudo.

O maior acúmulo de massa seca de parte aérea (105,2 mg) foi alcançado utilizando a concentração de 3,5 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultivo (Tabela 1). Pode-se observar que, a ausência de BAP e sua maior concentração (6 mg L⁻¹) foram desfavoráveis para os valores obtidos nas variáveis número

de brotações/explante e massa seca de parte aérea (Tabela 1). Esse resultado era esperado, pois as citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares além do que, são necessárias para promover o incremento da parte aérea das brotações de vetiver, porém efeitos contrários são observados quando se utiliza doses acima da considerada ótima.

Os maiores valores de massa seca de raiz foram conseguidos nos tratamentos que não continham o BAP. Geralmente, um balanço com maiores concentrações de auxinas do que citocininas resulta na formação de raízes. A produção de

Tabela 3. Coloração e tamanho de folhas de plantas do acesso UFS-VET003 de vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) em função de diferentes temperaturas, aos 90 e 180 dias de cultivo (color and size of vetiver leaves, accession UFS-VET003, depending on different temperatures at 90 and 180 days of cultivation). São Cristóvão, UFS, 2011.

Temperatura (°C)	Coloração (notas 1 a 5)* (S%)**	Tamanho (notas 1 a 3)***
90 dias		
18	3,07 a (78,75)	1,40 a
25	4,90 b (8,75)	1,66 b
CV (%)	7,03	6,85
180 dias		
18	4,42 a (36,25)	1,57 a
25	5,00 b (0)	1,67 a
CV (%)	4,19	7,20

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (means followed by the same letter in the columns did not differ from each other by the Tukey test, $p < 0,05$). *Coloração de folhas: 1= folhas totalmente verde; 2= início do secamento das folhas; 3= entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas; 5= folhas totalmente mortas (color of leaves: 1= entirely green leaves, 2= start of drying of the leaves, 3= between 30 and 50% of dead leaves, 4= more than 50% of dead leaves and 5= death of all leaves). **Porcentagem de sobrevivência de plantas (percentage of plant survival). ***Tamanho das folhas: 1= do mesmo tamanho das folhas quando inoculado (2-3 cm), 2= até o dobro do tamanho das folhas quando inoculado e 3= mais que o dobro do tamanho das folhas quando inoculado (size of the leaves: 1= the same size of the leaves when inoculated (2-3 cm), 2= up to twice the size of the leaves when inoculated and 3= more than twice the size of the leaves when inoculated).

raízes é facilmente obtida em algumas espécies, reduzindo-se o nível de citocininas ou em meio MS, com ou sem a adição extra de auxinas. Em abacaxizeiro observou-se enraizamento na ausência de reguladores de crescimento (Macêdo *et al.*, 2003), enquanto que em cana-de-açúcar houve boas taxas de enraizamento acrescentando-se 5 mg L⁻¹ de ANA e 70 g L⁻¹ de sacarose aos sais do meio MS (Singh, 2003). Diante dos resultados observados, para o enraizamento, recomenda-se a transferência das brotações de vetiver para meio MS líquido sem reguladores de crescimento.

Aclimatização - Os diferentes substratos utilizados não influenciaram significativamente na aclimatização de plantas micropropagadas de vetiver para as variáveis analisadas. Todos os substratos proporcionaram altas taxas de sobrevivência, onde os valores atingidos variaram de 87,5 a 100%. Os valores para massa seca de parte aérea e das raízes variaram entre 127,37 a 184,66 mg e 32,56 a 74,65 mg respectivamente. Dessa forma, recomenda-se o pó de coco + 12 g L⁻¹ de fertilizante formulado (NPK 3-12-6 + Ca, S, Zn, B, Cu, Fe, Mn e B a 3,0-2,5-0,1-0,025-0,01-0,075-0,05 e

0,0015%, respectivamente) + calcário (1 g L⁻¹) para a aclimatização das plantas, visto que é um substrato de fácil acesso e de baixo custo na região Nordeste.

O pó de coco é considerado substrato praticamente inerte, que não reage com os nutrientes da adubação e possui longa durabilidade, sem alteração de suas características físicas (Santos *et al.*, 2004). Como não possui os nutrientes essenciais para as plantas, deve ser utilizado em combinação com fertilizantes (Carrijo *et al.*, 2002).

Diversas espécies de famílias variadas apresentam bom desenvolvimento quando aclimatizadas em pó de coco, como antúrios (*Anthurium andreaeanum*) (Silva *et al.*, 2007), *Mentha arvensis* (Fonseca *et al.*, 2008) e *Miltonia flavesces* (Muller *et al.*, 2007).

A crescente utilização de compostos orgânicos como substratos durante a fase de aclimatização reflete a necessidade de práticas agrícolas sustentáveis que minimizem o impacto ambiental (Santos *et al.*, 2004). Dessa forma, a utilização de resíduos da agroindústria em práticas agrícolas, como o pó de coco, por exemplo, representa uma solução para problemas econômicos, sociais e

ambientais (Silveira *et al.*, 2002).

Conservação *in vitro*

Ensaio 1 - Aos 90 dias de cultivo, não houve efeito dos açúcares utilizados como reguladores osmóticos nem da interação destes com as temperaturas de cultivo para as variáveis sobrevivência e viabilidade de plantas, sendo apenas significativos entre as diferentes temperaturas de cultivo. Estas também foram significativas para a análise aos 180 dias.

A temperatura de 18°C foi a mais efetiva na conservação das plantas para os dois períodos de avaliação. No cultivo a 18°C, aos 90 dias, a taxa de sobrevivência foi de 95% e a viabilidade das plantas de 2,77, significando que entre 30 e 50% das folhas e brotos estavam mortos. Aos 180 dias de cultivo a taxa de sobrevivência caiu drasticamente para 40% e a média da viabilidade das plantas subiu para 4,38. Notas altas indicam perda da viabilidade dos explantes para a conservação sob regime de crescimento lento (dados não apresentados).

A diminuição da temperatura é uma das primeiras estratégias a ser utilizada quando se objetiva reduzir o crescimento de plantas *in vitro*, visto que restringe o metabolismo da planta por meio do decréscimo das ações de suas enzimas (Lemos *et al.*, 2002). Plantas tropicais e subtropicais normalmente suportam redução de temperatura entre 15 e 20°C (Souza *et al.*, 2009). Para cana de açúcar (*Saccharum* sp.), a diminuição da temperatura de 25 para 15°C foi de fundamental importância para a conservação e viabilidade dos explantes (Lemos *et al.*, 2002). O mesmo foi observado para mandioca (*Manihot esculenta*) cuja melhor temperatura foi de 22°C (Souza *et al.*, 2009). A temperatura de cultivo padrão (25°C) favorece o consumo dos nutrientes disponíveis no meio de cultura pela planta, esgotando-os rapidamente. Neste ensaio, a redução de 25 para 18°C foi capaz de retardar o crescimento das plantas de vetiver sem danos fisiológicos por 90 dias. Num período maior que este, as plantas apresentaram expressivos sinais de senescência, indicando deficiência nutricional.

Na avaliação aos 180 dias de cultivo, as variáveis sobrevivência e viabilidade dos explantes sofreram influência da interação entre os açúcares utilizados

Tabela 4. Sobrevivência (%), coloração e tamanho de folhas de plantas do acesso UFS-VET003 de vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) em função de diferentes concentrações de sais aos 90, 180 e 270 dias de cultivo (survival (%), leaves color and size of vetiver accession UFS-VET 003 from different salt concentrations cultivated for 90, 180 and 270 days). São Cristóvão, UFS, 2011.

Meio MS (% sais)	Sobrevivência (%)	Coloração (notas 1 a 5)*	Tamanho (notas 1 a 3)**
90 dias			
100	56 b	3,56 b	1,56 a
75	100 a	1,80 a	1,60 a
50	96 a	1,69 a	1,64 a
25	100 a	1,92 a	1,76 a
CV (%)	17,69	9,14	
180 dias			
100	16 c	4,84 b	1,60 a
75	96 a	2,84 a	2,28 b
50	64 b	3,12 a	1,92 ab
25	100 a	2,48 a	2,20 b
CV (%)	23,37	5,66	6,58
270 dias			
100	0 b	5,0 c	1,80 a
75	40 a	4,4 bc	2,35 ab
50	50 a	3,8 ab	2,10 ab
25	75 a	3,1 a	2,45 b
CV (%)	35,67	5,37	5,29

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (means followed by the same letter in the columns did not differ from each other by the Tukey test, $p < 0,05$). *Coloração de folhas: 1= folhas totalmente verdes; 2= início do secamento das folhas; 3= entre 30 e 50% de folhas mortas; 4= mais de 50% de folhas mortas; 5= folhas totalmente mortas (color of leaves: 1= entirely green leaves, 2= start of drying of the leaves, 3= between 30 and 50% of dead leaves, 4= more than 50% of dead leaves and 5= dead of all leaves). **Tamanho das folhas: 1= do mesmo tamanho das folhas quando inoculado (2-3 cm), 2= até o dobro do tamanho das folhas quando inoculado e 3= mais que o dobro do tamanho das folhas quando inoculado (size of the leaves: 1= same size of the leaves when inoculated (2-3 cm), 2= up to twice the size of the leaves when inoculated and 3= more than twice the size of the leaves when inoculated).

como reguladores osmóticos e as temperaturas de cultivo (Tabela 2).

A temperatura de 18°C foi melhor para todos os casos, visto que poucas plantas sobreviveram à temperatura de 25°C para esse período. O tratamento que continha apenas sacarose (20 g L⁻¹) resultou em melhores taxas de sobrevivência (75%) e viabilidade de plantas (3,9) do que aquelas cultivadas nos tratamentos que continham sacarose combinada com manitol ou sorbitol (Tabela 2). Essa média para viabilidade indica que mais de 50% das folhas e dos brotos já estavam mortos no período de 180 dias de conservação. Considera-se que o manitol e sorbitol não são metabolizados por tecidos vegetais, visto que,

grande quantidade de espécies não possui uma via natural para a biossíntese de alcoóis açúcares (Thorpe *et al.*, 2008). Isso pode justificar o fato dos melhores resultados na temperatura de 18°C terem sido observados na utilização somente de sacarose (20 g L⁻¹), neste caso, nos tratamentos que continham manitol e sorbitol, a fonte de carbono disponível resumiu-se a 10 g L⁻¹ de sacarose, o que demonstrou não ser suficiente para manutenção da sobrevivência e/ou viabilidade das plantas para esse período.

Em trabalho de Lemos *et al.* (2002), a cana de açúcar (*Saccharum* sp.), apresentou resultados semelhantes, sendo que os explantes dos tratamentos com apenas sacarose apresentaram maior

viabilidade que aqueles dos tratamentos onde se misturou sacarose com manitol ou sorbitol independentemente da temperatura de cultivo.

Ensaio 2 - Em relação à utilização do ABA, não houve diferenças significativas para as diferentes concentrações utilizadas nem para a interação destas com as temperaturas para os períodos analisados. Resultado diferente foi observado para a cana-de-açúcar, onde a concentração de 1 mg L⁻¹ de ABA foi a melhor, quando comparada com concentrações inferiores e superiores a esta, na redução do crescimento e manutenção da viabilidade das plantas por um período de 360 dias, a 15°C (Lemos *et al.*, 2002).

As diferentes temperaturas de cultivo mostraram-se significativas para as variáveis sobrevivência, coloração e tamanho de folhas na avaliação aos 90 dias e sobrevivência e coloração aos 180 dias (Tabela 3). Sendo, mais uma vez, a temperatura de 18°C a mais favorável para a manutenção das plantas em ambos os casos não restando plantas vivas no cultivo a 25°C aos 180 dias (Tabela 3).

Aos 90 dias a taxa de sobrevivência foi de 78,75% e a coloração das plantas de 3,07, o que indica entre 30 e 50% de folhas mortas e o tamanho de folhas 1,40, o que significa que os explantes estavam apenas um pouco maiores que o tamanho inicial (Tabela 3). Apesar de o ABA ter inibido o crescimento das microplantas de vetiver, ele não foi eficiente na manutenção da viabilidade das mesmas, visto que aos 90 dias as plantas já apresentavam sinais de senescência o que se agravou com o passar do tempo. Aos 180 dias a taxa de sobrevivência caiu para 36,25% e a média para coloração das folhas foi de 4,42, indicando mais de 50% de folhas mortas.

Ensaio 3 - No terceiro ensaio, as diferentes concentrações de sais do meio MS foram significativas para as variáveis sobrevivência e coloração de folhas na avaliação aos 90 dias e, além dessas, acrescentando a variável tamanho de folhas para o período de 180 e 270 dias (Tabela 4).

Aos 90 dias, os tratamentos que continham entre 75 e 25% das concentrações de sais se comportaram de forma

semelhante para as duas variáveis, sendo a sobrevivência praticamente de 100% e os valores para coloração de folhas inferiores a 2, indicando apenas início de seu secamento.

Aos 180 dias, as concentrações de 75 e 25% ainda mantiveram taxas de sobrevivência elevadas. Nesta mesma faixa, não houve diferenças significativas para a variável coloração de folhas, ficando as médias entre 2,84 e 2,48. Os tratamentos com 100 e 50% das concentrações de sais foram os que mantiveram os menores tamanhos de folhas, sendo as médias 1,60 e 1,92 respectivamente, ou seja, tamanho menor que o dobro do tamanho inoculado, atingindo o objetivo da conservação sob crescimento lento, isto é, manter a viabilidade com menor crescimento da planta (Tabela 4).

Na avaliação aos 270 dias, a variável sobrevivência não demonstrou diferenças estatísticas entre os tratamentos que continham 75, 50 e 25% de sais MS, enquanto, para coloração, as menores médias foram alcançadas utilizando-se 50 e 25% de sais MS, sendo as médias 3,8 e 3,1 respectivamente, indicando até, pelo menos 50% de folhas vivas. Os menores tamanhos foram conseguidos no meio de cultivo que continha 100, 75 e 50% das concentrações dos sais MS (Tabela 4).

É importante salientar que as variáveis não podem ser analisadas separadamente. Deve-se considerar que são preferíveis plantas com notas baixas para coloração, ou seja, mais verdes, mesmo que estas apresentem tamanho um pouco maior que o desejado, visto que a senescência não é desejável para a conservação sob regime de crescimento lento e as plantas precisam estar viáveis para retomarem seu crescimento quando for necessário. Sendo assim, considerando as taxas de sobrevivência combinadas com os valores das notas para a coloração e tamanho de folhas, aos 270 dias, o tratamento que proporcionou os explantes mais viáveis foi o que continha 25% dos sais do meio MS.

A redução das concentrações de sais do meio de cultivo é uma estratégia empregada para a conservação sob crescimento lento. Plantas de vetiver variedade Songkla 3 foram conservadas por 365 dias utilizando-se 25% dos sais MS

acrescido de 3 mg L⁻¹ de paclobutrazol (PBZ), à temperatura de 27°C. Porém, nesse estudo, não há relato se as plantas conservadas mostraram-se capazes de restabelecer o seu crescimento quando colocadas em condições normais para multiplicação após o período de conservação (Moosikapala & Te-Chato, 2010). Esse procedimento é necessário visto que as plantas precisam estar com vigor suficiente para restabelecer seu crescimento e potencial de propagação. Após os 270 dias de conservação, os explantes oriundos do tratamento com 25% dos sais MS restabeleceram seu crescimento quando colocados em condições normais de multiplicação *in vitro*.

Neste estudo, verificou-se que a micropropagação de vetiver pode ser promovida em meio MS acrescido de 3,33 mg L⁻¹ de BAP, sendo a etapa de enraizamento das brotações proporcionada em meio MS básico. Para aclimatização recomenda-se o substrato PBC. A conservação *in vitro* é possível em meio MS semissólido com 25% dos sais MS e temperatura de 18°C por um período de 270 dias.

REFERÊNCIAS

- ADAMS RP; HABTE M; PARK S; DAFFORN MR. 2004. Preliminary comparison of vetiver root essential oils from cleansed (bacteria- and fungus-free) versus non-cleansed (normal) vetiver plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 1137-1144.
- ALENCAR RG; PRADO CC; OLIVEIRA LMG; FREITAS MRF; SILVA LNM; NOGUEIRA JCM; PAULA JR; BARA MTF. 2005. Estudo farmacobotânico e fitoquímico da raiz de *Vetiveria zizanioides* L. Nash (Vetiver). *Revista Eletrônica de Farmácia* 2: 1-4.
- BE LV, TAN VT; UYEN NTT; DUNG LV. 2008. Low-cost micropropagation of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). *Assumption University Journal of Technology* 12: 18-24.
- CASTRO LO; RAMOS ELD. 2002. *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, Elyanurus candidus (Trin.) Hack, capim-limão, Vetiveria zizanioides (L.) Nash, vetiver.* Porto Alegre: FEPAGRO. 31p. (Boletim FEPAGRO 11).
- CARRIJO OA; LIZ RS; MAKISHIMA N. 2002. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. *Horticultura Brasileira* 20: 533-535.
- COUTO M; WAGNER JÚNIOR A; QUEZADA AC. 2003. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Agrociência* 9: 125-128.
- FONSECA VO; COSTA AS; ARRIGONI-BLANK MF; BLANK AF; SANTANA THB. 2008. Micropropagação, aclimatização e composição química do óleo essencial de hortelã japonesa (*Mentha arvensis* L.). *Plant Cell Culture and Micropropagation* 4: 8-14.
- KIM HJ; CHENG F; WANG X; CHUNG HY; JIN Z. 2005. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53: 7691-7695.
- LAVANIA UC. 2003. Other uses of vetiver: Part II. Vetiver oil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON VETIVER, 3. *Proceedings...* Thailand: Narong Chomchalow. p. 473-485.
- LEMOS EEP; FERREIRA MS; ALENCAR LMC; RAMALHO NETO CE; ALBUQUERQUE MM. 2002. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1359-1364.
- MACÊDO CEC; SILVA MG; NÓBREGA FS; MARTINS CP; BARROSO PAV; ALLOUFA MAI. 2003. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25: 501-504.
- MAISTRELLO L; HENDERSON G. 2000. Vetiver grass: Useful tools against *Formosan subterranean* termites. *Journal Vetiver Newsletter* 22: 16-17.
- MASSARDO DR; SENATORE F; ALIFANO P; DEL GIUDICE L; PONTIERI P. 2006. Vetiver oil production correlates with early root growth. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 376-382.
- MOOSIKAPALA L; TE-CHATO S. 2010. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. *Journal of Agricultural Technology* 6: 401-407.
- MULLER TS; DEWES D; KARSTEN J; SCHUELTER AR; STEFANELLO S. 2007. Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de *Miltonia flavescens*. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 252-254.
- MURASHIGE T; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1993. *Vetiver Grass: A Thin Green Line Against Erosion.* Washington D.C.: National Academy Press. 161p.
- SANTOS MRA; TIMBÓ ALO; CARVALHO ACPP; MORAIS JPS. 2004. Avaliação de substratos e adubos orgânicos na aclimatização de plântulas de *Heliconia psittacorum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 1049-1051.
- SILVA JV; HERNANDEZ FFF; BEZERRA FC; DINIZ JDN. 2007. Aclimatização "ex vitro" de mudas de antúrio em diferentes substratos. *Revista Ciência Agronômica* 38: 188-191.
- SILVEIRA EB; RODRIGUES VJLB; GOMES AMA; MARIANO RLR; MESQUITA JCP.

2002. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. *Horticultura Brasileira* 20: 211-216.
- SINGH R. 2003. *Tissue Culture Studies of Sugarcane*. Patiala: Thapar Institute of Engineering and Technology. 62p (Tese mestrado).
- SOUZAAS; DUARTE FV; SANTOS-SEREJOJA; JUNGHANS TG; PAZ OP; MONTARROYOS AVV; SANTOS VS; MORAIS LS. 2009. *Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação in vitro de variedade de mandioca*. EMBRAPA: Cruz das Almas. 24p. (Circular Técnica 90).
- THORPE T; STASSOLA C; YENG EC; DE KLERK G-J; ROBERTS A; GEORGE EF. 2008. The components of plant culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE EF; HALL MA; KLERK GJ (eds). *Plant propagation by tissue culture*, vol. 1. New York: Springer. p. 115-173.
- ZHU BCR; HENDERSON G; CHEN F; FEI H; LAINE RA. 2001. Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the *Formosan subterranean* termite. *Journal of Chemical Ecology* 27: 1617-1625.
-