

## Desarrollo de un sistema para la micropropagación de pasto Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)

### Development of a system for the micropropagation of Vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*)

Paola Karen Mejía-Márquez<sup>1</sup> Sacyl Gabriela Bañuelos-Cabrera<sup>1</sup> Saúl Fraire Velázquez<sup>2</sup> Miguel Alvarado-Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad Académica de Agronomía; <sup>2</sup>Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.

#### Resumen

*Chrysopogon zizanioides* es una gramínea con variadas aplicaciones incluido la fitorremediación de suelos y aguas contaminados, perfumería, para fines medicinales, entre otras. En el presente trabajo se logró establecer un sistema para micropropagar *C. zizanioides*. El establecimiento fue a partir de microesquejes de plantas adultas, los cuales fueron incubados en el medio nutritivo MS sin reguladores de crecimiento vegetal, a 25°C y fotoperiodo de 16 h de luz/día. En la etapa de multiplicación se consideró cuatro tratamientos y 20 repeticiones: MS; MS + 2, 4 y 6 mg·L<sup>-1</sup> de BA. Para el enraizamiento se emplearon de igual manera cuatro tratamientos y 25 repeticiones: MS semisólido; ½ MS; MS líquido; MS suplementado con 1 mg·L<sup>-1</sup> de AIB. Para la aclimatación se utilizó una mezcla de peat moss, agrolita, vermiculita y policote triple 17. El 60% de los explantes sembrados *in vitro* se establecieron exitosamente, mientras que en el resto se presentó contaminación por microorganismos. La mayor tasa de multiplicación fue de 18 brotes/explante con una altura promedio 4.7 cm, con el tratamiento donde se empleó medio nutritivo MS suplementado con 4 mg·L<sup>-1</sup> de BA. En el tratamiento MS líquido se generaron raíces abundantes (11.5 en promedio) y largas (9.6 cm en promedio). En 100 plantas probadas, después de 6 semanas de aclimatación todas sobrevivieron.

#### Palabras clave

*Chrysopogon zizanioides*, micropropagación, microesquejes.

#### Autor de correspondencia:

Miguel Alvarado Rodríguez,  
e-mail: mialvaro2909@hotmail.com

#### Abstract

*Chrysopogon zizanioides* is a gramineae plant with various applications including phytoremediation of polluted soil and water, perfumery, for medicinal purposes, among others. In the present study a system was established to micropropagate *C. zizanioides*. The establishment was from micro-cuttings of adult plants, which were incubated in MS culture medium without plant growth regulators, at 25°C and photoperiod of 16 h of light/day. In the multiplication stage, four treatments and 20 repetitions were considered: MS; MS + 2, 4 and 6 mg·L<sup>-1</sup> of BA. For the rooting, four treatments and 25 repetitions were used in the same way: semi-solid MS; ½ MS; MS liquid; MS supplemented with 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA. For acclimation a mixture of peat moss, agrolita, vermiculite and triple 17 policote was used. 60% of the explants sown *in vitro* were successfully established, while in the rest there was contamination by microorganisms. The highest multiplication rate was 18 buds/explant with an average height of 4.7 cm, with the treatment when the nutritional medium MS supplemented with 4 mg·L<sup>-1</sup> of BA. The liquid MS treatment generated abundant (11.5 in average) and longer roots (9.6 cm on average). In 100 tested plants, after 6 weeks of acclimation they all survived.

#### Keywords

*Chrysopogon zizanioides*, micropropagation, micro-cuttings.

#### Introduction

Vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) is a herbaceous, gramineous, perennial plant, without apparent stalk (Wildschut, 2013), originally from

## Introducción

El pasto Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) es una especie herbácea, gramínea, perenne, sin tallo aparente (Wildschut, 2013), originaria del sur de Asia. Es una planta que crece hasta una altura de 2-3m, con un sistema radical fuerte y crece verticalmente hasta 5m, no produce semillas viables, por lo que se reproduce asexualmente. Naturalmente es una hidrófila, pero crece muy bien bajo condiciones xerófilas. Es resistente a incendios, inundaciones, sequías y pastoreo. Tolerante a suelos pobres, pH extremos, temperaturas extremas (-20°C hasta 55°C) (Truong *et al.*, 1996). Es cultivada para diversos usos, entre los cuales se pueden mencionar: fitorremediación de suelo y agua, protección de suelos contra la erosión, producción de aceites para perfumería, aplicaciones medicinales, (Pareek y Kumar, 2013), elaboración de artesanías, abono orgánico, sustrato para el cultivo de hongos comestibles y para control de plagas (Chomchalow, 2004; Leupin, 2001; Hernandez, 1996).

En fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados tales como Pb, Hg, As, Cu y Zn, la especie *C. zizanioides* es una de las mejores opciones, dada su capacidad de hiperacumular metales, particularmente Pb, y la acumulación de biomasa (Pidatala *et al.*, 2017; Kofi-Anning *et al.*, 2017)

Para mejorar la eficiencia de la propagación masiva del Vetiver, nuevas técnicas han sido utilizadas en años recientes. La más importante y significativa es la utilización de la técnica del cultivo de tejidos para la propagación masiva (Prasertsongskun, 2003), ya que se pueden obtener una gran cantidad de plantas en poco tiempo y a un costo razonable. Se ha reportado buena respuesta en la propagación *in vitro* de yemas axilares de *C. zizanioides* en medio MS adicionado con paclobutrazol, y 6-benziladenina (BA) (Moosikapala y Te-chato, 2010), y el callo embriogénico en esta especie presenta excelente habilidad regenerativa, incluso hasta los 24 subcultivos (Chitra *et al.*, 2014); además de que la auxina es el factor clave para la inducción de embriogénesis somática a partir de explantes, y la organogénesis de brotes puede ser inducida en medio de inducción suplementado con ácido naftalenacético (NAA) o 2-4-D (Gou-hua *et al.*, 2000).

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología para micropropagar el Vetiver, donde se evaluó el comportamiento del pasto en medio MS con diferentes concentraciones de una citocinina (Benciladenina, BA) para la

South Asia. It is characterized as a plant that grows to a height of 2-3m, with a strong radical system that grows vertically at depths of up to 5m, does not produce viable seeds, so it is reproduced asexually. Naturally is a hydrophilic, but it grows very well under xerophilous conditions. It is resistant to fires, floods, droughts and grazing. Tolerant to poor soils, extreme pH, extreme temperatures (-20°C to 55°C) (Truong *et al.*, 1996). It is cultivated for different uses, among these: phytoremediation of soil and water, protection of soils against erosion, production of oils for perfumery, medicinal applications (Pareek y Kumar, 2013), elaboration of handicrafts, organic fertilizer, substrate for the cultivation of edible fungi and for pest control (Chomchalow, 2004; Leupin, 2001; Hernandez, 1996).

To improve the efficiency of the mass propagation of Vetiver, many new techniques have been used in recent years. The most important and significant is the use of tissue culture technique for mass propagation (Prasertsongskun, 2003), since a large amount of plants can be obtained in a short time and at a reasonable cost.

For *in vitro* plant propagation of *C. zizanioides* a good response has been reported using axillary buds in MS Medium added with Paclobutrazol and 6-benzyladenine (BA) (Moosikapala and Te-chato, 2010), and the callus embryogenic in this species presents excellent regenerative ability, even up to 24 subcultures (Chitra *et al.*, 2014); besides, the auxin is the key factor for the induction of somatic embryogenesis from explants, and the organogenesis of buds can be induced in induction medium supplemented with naftalenacético acid (NAA) (Gou-hua *et al.*, 2000).

This is why the objective of this work was to develop a methodology to micropropagate the Vetiver, where the behavior of the grass in MS medium was evaluated with different concentrations of a cytokinin (Benciladenina, BA) for the induction of multiple sprouting; and in MS with the use of an auxin (Acido indolbutírico, AIB) for the induction of roots.

## Materials and methods

### Establishment

The *in vitro* cultivation of Vetiver was started from micro-cuttings of adult plants (Figure 1A), which were washed with detergent for disinfection, rinsed with abundant running water and then distilled water. Subsequently, in laminar flow hood were placed in an ethanol solution at 70% for 1 min, then were placed 20 min in a

inducción de brotación múltiple; y en MS con el uso de una auxina (Ácido indolbutírico, AIB) para la inducción de raíces.

## **Materiales y métodos**

### Establecimiento

El cultivo *in vitro* de Vetiver se inició a partir de microesquejes de plantas adultas (Figura 1A), los cuales fueron lavados con detergente para su desinfección, se enjuagaron con abundante agua corriente y enseguida con agua destilada. Posteriormente, en campana de flujo laminar se colocaron en una solución de etanol al 70% durante 1 min, enseguida se colocaron 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 1.2%. Finalmente los microesquejes se enjuagaron 3 veces más con agua destilada estéril. Los microesquejes desinfectados de Vetiver, y eliminando las hojas externas dañadas por el agente desinfectante, se transfirieron al medio de cultivo basal de Murashige and Skoog, 1962 (MS). Se colocaron de 3-4 explantes por frasco con medio nutritivo, y se incubaron a 25°C y fotoperiodo de 16h de luz/día.

### Multiplicación

Las plántulas generadas en la etapa anterior (Figura 1B), fueron usados para la fase de multiplicación, donde se probaron 4 tratamientos con 20 repeticiones, a partir de medio nutritivo MS suplementado con 0, 2, 4 y 6 mg·L<sup>-1</sup> de bencil aminopurina (BA), los que se incubaron a 25°C con fotoperiodo de 16 h de luz/día durante 3 semanas, para después evaluar la cantidad de brotes obtenidos por explante. Con los resultados obtenidos se procedió a un análisis de varianza, y una comparación de medias utilizando la prueba Diferencia Mínima Significativa, a un nivel de significancia de P≤0.05.

### Enraizamiento

Con la finalidad de inducir un sistema radical vigoroso y abundante, los brotes formados se subcultivaron en cuatro tratamientos y 25 repeticiones. Se consideró medio MS (E<sub>1</sub>); ½ MS (E<sub>2</sub>); MS líquido (E<sub>3</sub>); MS suplementado con 1 mg·L<sup>-1</sup> de AIB (E<sub>4</sub>). Los tratamientos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> se prepararon sin reguladores del crecimiento; los tratamientos E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>4</sub> se solidificaron con 8 g·L<sup>-1</sup> de agar; en E<sub>2</sub> se consideró el 50 % de los macronutrientes del medio nutritivo MS.

### Aclimatación

Para la etapa de aclimatación se consideró

solution of sodium hypochlorite to 1.2%. Finally the micro-cuttings were rinsed 3 times more with sterile distilled water.

The disinfected micro-cuttings of Vetiver, and eliminating the external leaves damaged by disinfectant agent, were transferred to basal culture medium of Murashige and Skoog, 1962 (MS). They were placed of 3-4 explants per flask with nutritive medium, and incubated at 25 °C and photoperiod of 16h of light/day.

### Multiplication

The seedlings generated in the previous stage (Figure 2B), were considered to evaluate the multiplication stage, where 4 treatments with 20 repetitions were tested, from MS nutrient medium supplemented with 0, 2, 4 and 6 mg·L<sup>-1</sup> of benzyl Aminopurine (BA) which were incubated at 25 °C and a photoperiod of 16 h of light / day for 3 weeks, to then evaluate the number of shoots obtained per explant. With the obtained results, we proceeded to an analysis of variance, and a comparison of means using the Significant Minimum Difference test, at a level of significance of P≤0.05.

### Rooting

In order to induce vigorous and abundant root system, the buds formed were subcultured in four treatments and 25 repetitions. MS medium (E<sub>1</sub>) was considered; ½ MS (E<sub>2</sub>); MS líquido (E<sub>3</sub>); MS supplemented with 1 mg·L<sup>-1</sup> of AIB (E<sub>4</sub>). Treatments E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>3</sub> were prepared without plant growth regulators; treatments E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>4</sub> were solidified with 8 mg·L<sup>-1</sup> of agar; in the E<sub>2</sub> treatment, 50% of the macronutrients of MS nutrient medium were considered.

### Acclimation

For the acclimation stage it was considered vitroplants with a well developed radical system. Once the best rooting treatment was obtained, the best seedlings with abundant root were extracted from the flasks and placed in plastic cups containing as a substrate, a mixture of peat moss, Agrolita, vermiculite (in equal proportions in Volume) plus polycote triple 17, 1 g·L<sup>-1</sup> of substrate. The substrate was moistened with running water and each glass was covered with a transparent plastic bag (Figure 3). Daily for two weeks, the plastic wrap was perforated, in order to obtain the adaptation to the environment, by the gradual decrease of the relative humidity of each of the plants. The substrate was moistened with running water and each glass was

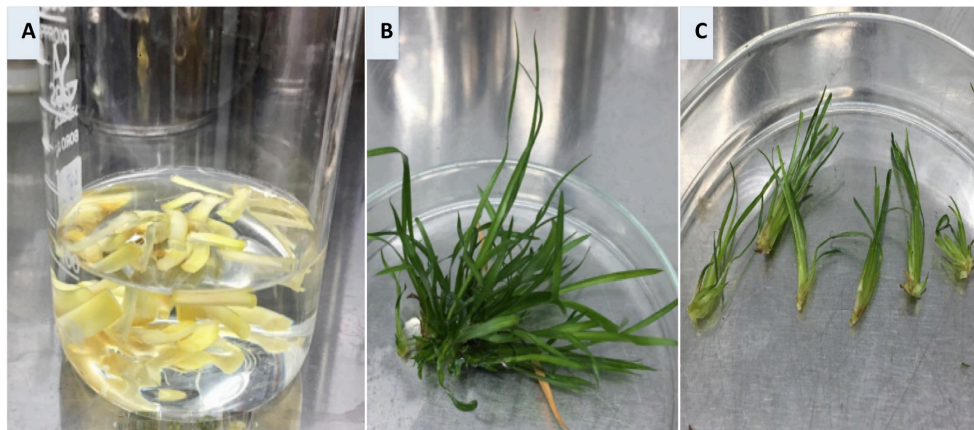
vitroplantas con un sistema radical bien desarrollado. Una vez que se obtuvo el mejor tratamiento de enraizamiento, las plantas de mayor porte y con abundante raíz se extrajeron de los frascos y se colocaron en vasos de plástico conteniendo como sustrato una mezcla de peat moss, agrolita, vermiculita (en iguales proporciones en volumen) más 1 g de policote triple 17 por litro de sustrato. El sustrato se humedeció con agua corriente y cada vaso se cubrió con una bolsa plástica transparente (Figura 2A). Diariamente durante dos semanas, la envoltura plástica se perforó, con la finalidad de obtener la adaptación al medio ambiente, por la disminución gradual de la humedad relativa de cada una de las plantas.

covered with transparent plastic bag (Figure 2A). Daily for two weeks, the plastic wrap was perforated, in order to obtain the adaptation to the environment, by the gradual decrease of the relative humidity of each one of the plants.

## Results and discussion

### Initiation

In initiating the establishment of Vetiver, 60% of viable explants were obtained. The percentage that was not viable, is due to contamination by bacteria and fungi. The formation of young sprout of Vetiver was presented in the month of commencement of the establishment.



**Figura 1.** Microesquejes de plantas adultas y formación de macollo. En A, microesquejes provenientes de plantas adultas de Vetiver. En B, macollo formado a partir de una yema de planta adulta. En C, brotes segmento del macollo.

**Figure 1.** Micro-cuttings of adult plants and formation of tiller. In A, Microcuttings from adult plants of Vetiver. In B, Tiller formed from an adult plant bud. In C, sprouts segment of the tiller.

## Resultados y discusión

### Iniciación

En la etapa de establecimiento del pasto Vetiver se obtuvo un viabilidad del 60% de los explantes sembrados. La contaminación por microorganismos afectó la sobrevivencia de los explantes. La formación de macollos de Vetiver se presentó al mes de iniciado el establecimiento. El medio nutritivo MS se considera favorable para que *Chrysopogon zizanioides*, para propiciar una respuesta favorable *in vitro*. Se obtuvo una sobrevivencia alta tomando en cuenta que los explantes para el establecimiento se obtuvieron de plantas provenientes de campo. La contaminación por microorganismos es un problema común, Be *et al.*, (2008) obtuvieron un 86% de contaminación al iniciar el cultivo del pasto vetiver *in vitro*.

The nutritive MS medium is considered favorable for *Chrysopogon zizanioides* to generate a favorable response *in vitro*. A high survival was obtained taking into account that the explants for the establishment were obtained from plants coming from the field. Contamination by microorganisms is a common problem, Be *et al.*, (2008) obtained 86% contamination when starting the cultivation of Vetiver grass *in vitro*.

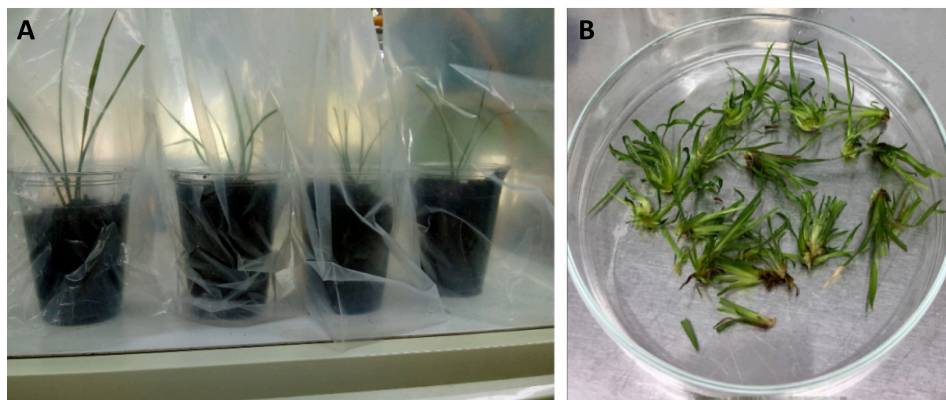
### Multiplicación

In the multiplication stage, tillers were obtained with 2 to 21 shoots per explant in the four treatments, with an average of 8.3 (Fig. 3). The highest multiplication rate was in treatment 3, MS supplemented with 4 mg·L<sup>-1</sup> of BA, where 17.8 shoots / explant were obtained on average, with

### Multiplicación

En la etapa de multiplicación, se obtuvieron macollos que presentaron de 2 a 21 brotes por explante en los cuatro tratamientos, con un promedio de 8.3 (Figura 2B). La mayor tasa de multiplicación se registró en el tratamiento 3, MS suplementado con 4 mg·L<sup>-1</sup> de BA, donde se obtuvieron 17.8 brotes/explante en promedio, con una altura media de 4.7 cm. Sin embargo, en el tratamiento 1, MS sin reguladores del crecimiento vegetal se obtuvieron los brotes con mayor longitud.

an average height of 4.7 cm. However, in treatment 1, DM without plant growth regulators, buds with longer length were obtained. The results were subjected to an analysis of variance, and then a comparison of means was made using the Minimum Significant Difference test, at a level of significance of P≤0.05. The treatment where BA mg·L<sup>-1</sup> was included yielded the highest results in number of shoots per tiller, although in height of the outbreaks it was not outstanding, establishing significant statistical differences; results are shown in Table 1.



**Figura 2.** Aclimatación del pasto y brotes a partir de explante en medio MS. En A, aclimatación en mezcla peat moss, agrolita, vermiculita y policote. En B, brotes obtenidos de un explante de Vetiver en medio MS suplementado con 4 mg/L de BA.

**Figure 2.** Acclimatization of plants and plant outbreaks from MS medium explants. In A, acclimatization in mixture peat moss, Agrolita, vermiculite and Polycote. In B, outbreaks obtained from a explant of Vetiver in MS medium supplemented with 4 mg/L of BA.

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza, y se realizó una comparación de medias utilizando la prueba Diferencia Mínima Significativa, a un nivel de significancia de P≤0.05. El tratamiento donde se incluyó mg·l<sup>-1</sup> de BA arrojó los resultados mas altos en número de brotes por macollo, aunque en altura de brotes no fue sobresaliente, estableciendo diferencias estadísticas significativas (Tabla 1).

### Rooting

For the induction of roots *in vitro* in Vetiver grass, the addition of some auxin to the nutritive medium is required, usually AIB, which is probably responsible for the regulation of genes for the synthesis of proteins necessary for the development of roots ( Iriawati *et al.*, 2013). In the present work, the highest number of roots on average (11.5 roots /

Tabla 1. Efecto de citocinina BA en la proliferación de brotes y altura de Vetiver, después de seis semanas

Table 1. Effect of cytokinin BA on the proliferation of shoots and height of Vetiver, after six weeks

Concentración de BA (mg·l <sup>-1</sup> )	Número promedio de brotes por macollo *	Altura promedio de brotes (cm)
0	4.9 c	6.1 a
2	12.3 b	5.2 b
4	17.8 a	4.7 b
6	13.9 b	3.8 c

\* Valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas a un nivel de significancia P≤0.05 en la prueba Diferencia Mínima Significativa

**Enraizamiento**

Para la inducción de raíces *in vitro* en pasto vetiver, se requiere la adición de alguna auxina al medio nutritivo, por lo regular AIB, la que probablemente es la responsable para la regulación de genes para la síntesis de proteínas necesarias para el desarrollo de raíces (Iriawati *et al.*, 2013). En el presente trabajo la mayor cantidad de raíces en promedio (11.5 raíces/explante) y con longitud más grande (9.6 cm), se logró en el tratamiento E<sub>3</sub>, es decir, en el medio nutritivo MS líquido, tratamiento que marcó diferencias estadísticas significativas (Tabla 2). En el resto de los tratamientos fue posible inducir enraizamiento, aunque en menor cantidad y menor longitud (Figuras 5 y 6).

explant) and the longest (9.6 cm), was achieved in the E3 treatment, that is, in the liquid MS nutrient medium, treatment that marked significant statistical differences (Table 2). In the rest of the treatments it was possible to induce rooting, although in smaller quantity and shorter length (Figures 2 and 3).

**Acclimation**

The acclimation index is a very important parameter that will determine the efficiency of the developed protocol. The procedure used for the acclimation was satisfactory, obtaining a 100% survival yield, observing that the Vetiver grass adapted easily and without stress to the

Tabla 2. Efecto de los tratamientos en el proceso de enraizamiento *in vitro* de plántulas de Vetiver después de 6 semanas.

Table 2. Effect of the treatments in the process of *in vitro* rooting of Vetiver seedlings after 6 weeks.

Tratamiento	Número promedio raíces/planta*	Longitud promedio de raíces (cm/planta)
MS	7.3 c	6.9 c
½ MS	9.2 b	8.2 b
MS líquido	11.5 a	9.6 a
MS + 1 mg·l <sup>-1</sup>	8.7 bc	7.3 bc

\* Valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas a un nivel de significancia P≤0.05 en la prueba Diferencia Mínima Significativa.

\* Values followed by the same letter do not present significant differences at a level of significance P≤0.05 in the Significant Minimum Difference test.

**Aclimatación**

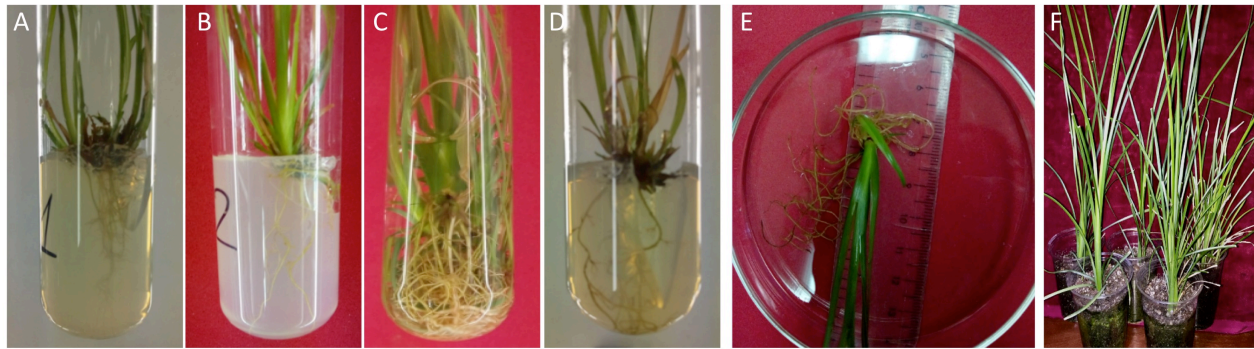
El índice de aclimatación es un parámetro muy importante que va a determinar la eficiencia del protocolo desarrollado. El procedimiento empleado para la aclimatación fue satisfactorio, obteniéndose un rendimiento de sobrevivencia del 100% de plantas adultas en el invernadero, observando que el pasto Vetiver se adaptó fácilmente y sin estrés al ambiente en el que se trasplantó. A los 90 días después de iniciada la aclimatación se registró una respuesta favorable, y notable crecimiento de la lámina foliar (Figura 3F).

environment in which it was transplanted. At 90 days after the acclimation started, a favorable response and remarkable growth of the leaf blade was achieved (Figure 3).

**Conclusions**

It was possible to establish a methodology to propagate *in vitro* the Vetiver grass, in the nutritive MS medium, from buds from micro-cuttings of adult plants, obtaining favorable results.

The highest yield in multiplication (18 shoots / explant) was achieved in MS medium supplemented with BA 4 mg · L<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Resultados de enraizamiento, y de aclimatación de pasto Vetiver. En **A-D**, resultados de enraizamiento en los diferentes tratamientos en medio MS. En **E**, enraizamiento en medio MS líquido. En **F**, plantas de pasto Vetiver con 90 días de aclimatación.

**Figure 3.** Rooting results, and acclimatization of Vetiver grass. In **A-D**, rooting results in the different treatments in MS medium. In **E**, rooting in MS liquid medium. In **F**, Vetiver grass plants with 90 days of acclimatization.

### Conclusiones

Se logró establecer una metodología para propagar *in vitro* el pasto Vetiver, en medio nutritivo MS, a partir de yemas provenientes de microesquejes de plantas adultas, obteniéndose resultados favorables.

El mayor rendimiento en la multiplicación (18 brotes/explante) se logró en medio MS suplementado con  $BA\ 4\ mg\cdot L^{-1}$ .

La mayor cantidad de raíces (11.5 raíces/explante) y de mayor longitud (9.6cm) se logró con medio MS líquido, lo que facilitó posteriormente la aclimatación del pasto.

Se logró la aclimatación del 100 % de las plantas de Vetiver, usando como sustrato mezcla de peat moss, agrolita, vermiculita y policote, y con una disminución gradual de la humedad.

La propagación *in vitro* de Vetiver es una excelente alternativa para obtener plantas en grandes cantidades en un lapso de tiempo corto, plantas que se pueden aplicar para resolver problemas de contaminación ambiental.

The highest number of roots (11.5 roots / explant) and the longest (9.6cm) was achieved with liquid MS, which later facilitated the acclimatization of the grass.

The acclimatization of 100% of Vetiver plants was achieved, using peat moss, agrolita, vermiculita and policote as substrate, and with a gradual decrease in humidity.

The *in vitro* propagation of Vetiver is an excellent alternative to obtain plants in large quantities in a short time, plants that can be applied to solve problems of environmental pollution.

### Referencias

- Be, L.V.; Tan, V.T.; Uyen, N.T.T.; and Dung, L.V. 2008. Low-cost Micropropagation of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). In: AU Journal of Technology 12(1): 18-24.
- Chitra T., S. Jayashree, J. Rathinamala and A. Suganya. 2014. Preliminary studies *in vitro* regeneration of *Vetiveria zizanioides* through meristem tip culture. In: J.Bio.Innov3(4),pp:189-

- Chomchalow, N. 2004. Why and Why Not Vetiver?. In: VETIVERIM. Chomchalow, N (ed). N° 28, April 2004.
- Gou-hua M., Hanping X., Yunlan X. 2000. Somatic embryogenesis and shoot formation from explants of *Vetiveria zizanioides*. J. Tropical and Subtropical Botany 8:55-59.
- Hernández, J. 1996. Usos alternativos para el vetiver. Boletín Vetiver, Octubre 1996, Número 2. Pag: 10-11
- Iriawati, R.R. Esyanti, W. Natalia, and N. Zahya. 2013. In vitro plant regeneration of Java vetiver. International Journal of Biological, Life Science and Engineering, 7: 57-59.
- Kofi-Anning A. and Akoto R. (2017) Assisted phytoremediation of heavy metal contaminated soil from a mined site with *Typha latifolia* and *Chrysopogon zizanioides* Ecotoxicology and Environmental Safety 148:97-104.
- Leupin, R. 2001. *Vetiveria zizanioides*: an approach to obtain essential oil variants via tissue culture. Zürich.
- Lu H., Bi-rong L., Chao P., Xiai-ping Z. (2004) Tissue culture and rapid propagation of *Vetiveria Zizanioides*. J. Anhui Normal University 04.
- Moosikapala L., and Te-chato S. 2010. Application of in vitro conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. J Agricultural Technology 6:401-407.
- Murashige, T.; and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-97
- Pareek A., Kumar A. (2013) Ethnobotanical and pharmaceutical uses of *Vetiveria zizanioides* (Linn) Nash: a medicinal plant of Rajasthan. Int J Life Sci & Phar Res. 4:L12-L18.
- Pidatala V., Li K., Sarkar D., Wusirka R., Datta R. (2017) Comparative metabolic profiling of vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) and maize (*Zea mays*) under lead stress. Chemosphere 193:903-911.
- Prasertsongskun, S. 2003. Plant regeneration from callus culture of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash). Songklanakarin J. Sci. Technol. Vol. 25. N° 5.
- Smyle, J. 1999. Experiencia mundial con el uso del vetiver para infraestructura, cuenca y uso en la finca. San Salvador, El Salvador.
- Truong, P, Gordon, I and Baker, D. 1996. Tolerance of vetiver grass to some adverse soil conditions. Proc. First Int. Vetiver Conf., Thailand.
- Wildschut, L. Mercados potenciales de tecnologías de biorremediación con Vetiver. Escuela de Organización Industrial. Madrid, 2013.