

Diss. ETH No. 14182

*Vetiveria zizanioides*: an approach to obtain essential  
oil variants via tissue culture

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by  
RUTH ELISABETH LEUPIN  
Dipl. Natw. ETH  
Born October 19, 1967  
Citizen of Küsnacht (ZH) and Muttenz (BL)

Accepted of the recommendation of  
Prof. Dr. B. Witholt, examiner  
Prof. Dr. N. Amrhein, co-examiner  
Prof. Dr. K. H. Erismann, co-examiner  
Dr. C. Ehret, co-examiner

Zürich 2001

## Summary

Vetiver oil, isolated from the roots of the tropical grass *Vetiveria zizanioides*, is an important raw material for the perfume industry. Since it is a very complex essential oil, vetiver oil could up to now not be produced artificially. Therefore, it would be of interest to obtain vetiver variants with a different odor (oil composition) or a higher oil yield.

Such variants can not be produced via traditional breeding, since the used vetiver variant is not flowering. Therefore plant regeneration via callus or liquid culture starting from crown or leaf slices was chosen to obtain somaclonal variants. A successful regeneration within 18 weeks was reached via callus on up to 55 % of the crown slices and up to 60 % of the leaf slices with up to 100 plantlets per slice by changing growth regulator concentrations (2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 6-benzylaminopurine), sucrose concentrations and cultivation conditions (light, dark). Other regeneration methods, described in literature, did not work with the used non-flowering vetiver from Java.

Since, starting from *in vitro* plantlets, more than 15 - 22 months are needed until the plant contains the complete vetiver oil, a pre-screening of the plantlets in an early stage would be advantageous. Unfortunately, the genes involved in the biosynthesis of vetiver oil are not known. As a result it is necessary to screen for phenotypical changes and especially for the production of more or altered oils. To assess quantitative and qualitative changes in the vetiver oil composition of the plant material already in tissue cultures, methods to extract and analyze the vetiver oil from small samples had to be optimized and compared. Methods based on olfactive detection, inhibition of microbial growth and analysis by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC) were therefore compared. The olfactive detection was useful for pre-screening, but the analysis was subjective and not accurate enough. GC analysis provided more detailed information, while TLC was preferred for a preliminary analysis of many samples.

To extract the oil, water distillation and solvent extraction were optimized and compared. The distillation times could be reduced by using 0.5 M phosphate buffer at pH 8 instead of water. Furthermore, this substitution resulted in the distillation of less acidic compounds. By combining water distillation with solid

phase extraction, an approach was developed to distill several small samples (about 100 mg) in parallel. The procedure for solvent extraction at room temperature could easily be miniaturized for extracting 100 mg vetiver roots in 1.5 ml hexane. Unfortunately additional non-volatile compounds were extracted, which caused base line shifting and increased noise during GC analysis. Neither TLC nor column chromatography were able to remove the non-volatile compounds from small scale samples. The choice of hexane extraction is favorable since it is less labor intensive than water distillation combined with solid phase extraction.

In this study, we were able to regenerate plantlets via *in vitro* culture and optimized methods to extract and analyze large numbers of very small samples in parallel. This means that we now have all tools to develop somaclonal variants *in vitro* and test the oil produced in such plantlets. The next stage in this work will be dependent on the ability to induce oil production and accumulation in plantlets or *in vitro* tissue in an early stage. Future work should include the development of such an induction method and the application and further development of the extraction and analysis methods.

## Zusammenfassung

Vetiveröl, welches aus den Wurzeln des tropischen Grases *Vetiveria zizanioides* isoliert wird, ist ein wichtiges Rohmaterial der Parfümindustrie. Da es ein sehr komplexes ätherisches Öl ist, konnte es bis jetzt noch nicht künstlich hergestellt werden. Es besteht deshalb ein grosses Interesse an Vetiver-Varianten mit unterschiedlichem Geruch d.h. Ölzusammensetzung oder höherem Ölgehalt.

Bei der verwendeten Vetiver-Kultivar aus Java versagen die traditionellen Züchtungsmethoden, da die Pflanze nicht blüht. Aus diesem Grunde wurde der Weg über die Produktion somaklonaler Varianten via Kallus- oder Flüssigkultur gewählt, wobei Rhizom- und Blattscheiben als Ausgangsmaterial benutzt wurden. Eine erfolgreiche Regeneration via Kalli wurde durch Optimieren der Wachstumsregulator-Konzentrationen (2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, 6-Benzylaminopurin) und des Zuckergehaltes im Medium sowie durch Ändern der Kulturbedingungen (Kultur im Licht oder im Dunkeln) erreicht. Mit der optimierten Methode konnten innerhalb 18 Wochen auf bis zu 55 % Rhizomscheiben und auf bis zu 60 % Blattscheiben Pflanzen regeneriert werden, mit bis zu 100 Pflanzen pro Scheibe. Andere in der Literatur beschriebene Regenerationsmethoden führten bei dem nicht-blühenden Vetiver-Kultivar aus Java zu keinen positiven Resultaten.

Ausgehend von den regenerierten *in vitro* Pflanzen dauert es 15 - 22 Monate oder länger, bis die Wurzeln das vollständige Vetiveröl enthalten. Für die Züchtung neuer wertvoller Vetiver-Varianten wäre deshalb eine Vor-Selektion in einem frühen Stadium vorteilhaft. Leider sind die für die Vetiveröl Biosynthese verantwortlichen Gene nicht bekannt. Deshalb muss nach phänotypischen Veränderungen insbesondere des Ölertrags und des Ölqualität gesucht werden. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Vetiveröl-Zusammensetzung wurden für kleine Probenvolumen die nötigen Extraktionsmethoden und Analytik entwickelt. Zur Analyse wurden Methoden basierend auf olfaktorischer Detektion, bakterieller Wachstumshemmung, Dünnschichtchromatographie (DC) und Gaschromatographie (GC) getestet. Die olfaktorische Detektion wurde zum Vor-Screenen auf das Vorhandensein von

Vetiveröl genutzt. GC-Analysen ergaben detaillierte Informationen, während DC für Voranalysen vieler Proben bevorzugt wurde.

Zur Extraktion des Öles wurden Wasserdestillation und Lösungsmittel-Extraktion optimiert und verglichen. Die Destillationsdauer konnte reduziert werden, indem das Wasser durch 0.5 M Phosphatpuffer (pH 8) ersetzt wurde. Gleichzeitig wurden dadurch weniger Säuren destilliert. Die Kombination von Wasserdestillation und Festphasen-Extraktion ermöglicht die gleichzeitige Destillation vieler kleiner Proben (ca. 100 mg). Die Lösungsmittel-Extraktion bei Raumtemperatur konnte leicht auf kleine Mengen übertragen werden (100 mg Vetiver-Wurzeln in 1.5 ml Hexan). Gleichzeitig werden dabei auch nicht-flüchtige Substanzen extrahiert, welche die GC Analytik erschweren und weder durch DC noch durch Säulenchromatographie von den kleinvolumigen Proben getrennt werden können. Gegenüber der mit Festphasen-Extraktion kombinierten Destillation hat die Hexan-Extraktion den Vorteil, dass sie weniger arbeitsintensiv ist.

In dieser Arbeit gelang es, Pflanzen via *in vitro* Kulturen effizient zu regenerieren und Methoden zu entwickeln für eine parallele Extraktion und Analyse sehr kleiner Probemengen. Somit sind nun alle Werkzeuge zur Produktion somaklonaler Varianten und zur Analyse der Öle dieser regenerierten Pflanzen vorhanden. Der nächste Schritt ist abhängig davon, ob die Ölsynthese und Akkumulation in einem frühen Stadium der Pflanze induziert werden kann. Zukünftige Arbeiten sollten neben der Entwicklung einer solchen Induktionsmethode auch die Anwendung und Weiterentwicklung der Extraktions- und Analyse-Methoden beinhalten.