

EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO SOBRE O ESTABELECIMENTO DA CULTURA *IN VITRO* DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* LINN. (LAMIACEAE)

Daiane Trindade Costa¹
Annette Droste²

Abstract

Rosmarinus officinalis Linn. (rosemary), of the family Lamiaceae, is rich in aromatic essential oils and exploited due its pharmaceutical, aromatic and culinary properties. Seeds and nodal segments of rosemary were submitted to different conditions of surface sterilization and placed on Murashige & Skoog (MS) culture medium, with the aims of investigate the germination viability of seeds and determinate the best sterilization conditions of meristematic tissues for the in vitro production of plants. Two concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) solution (0.5% and 1%) were tested for 10 minutes for seed sterilization, as well as the control (0% de NaClO), with further culture on MS medium. For the sterilization of nodal segments, two concentrations of NaClO (1 and 1.5%) were tested for 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes. Further, 1% NaClO was tested (5, 10 and 15 minutes), with previous immersion in 70% ethylic alcohol. The nodal segments were individually cultivated in test tubes containing MS medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and α -naphthaleneacetic acid (NAA). Contamination with fungi and bacteria, surviving of the explants as well as shoot formation were evaluated. On seeds, the minor contamination was observed applying 1% NaClO. Germination rate was very low (0.67%). The nodal segments submitted to sterilization for 1.0% NaClO with previous immersion in 70% ethylic alcohol for 10 and 15 minutes presented minor contamination rates (45 and 30%, respectively) and major surviving and shoot formation percentages (100 and 78.5%, respectively).

Key-words: in vitro germination, *Rosmarinus officinalis*, surface sterilization

Introdução

A espécie *Rosmarinus officinalis* Linn., conhecida popularmente por alecrim, é um subarbusto lenhoso da família Lamiaceae, originário da Região Mediterrânea da Europa. As folhas de *R. officinalis* são lineares, coriáceas, muito aromáticas e perenes. Suas flores, hermafroditas, encontram-se reunidas em espiguihas terminais azuladas ou lilás, pequenas e muito aromáticas (Lorenzi & Matos, 2002; Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2005).

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, CP 275, CEP 93022-000, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: dtcosta@unisinis.br

² Doutora, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Avenida Unisinis 950, 93022-000 São Leopoldo, RS, Brasil / Centro Universitário FEEVALE, RS-239 2755, 93352-000 Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: annette@feevale.br

Além de sua utilização como cobertura vegetal para proteção contra erosão (Caruso *et al.*, 2000), a espécie é conhecida por suas propriedades nutricionais e medicinais. Dentre os benefícios, destacam-se suas propriedades antioxidantes, antissépticas, vasodilatadoras, diuréticas, antiespasmódicas, antibacterianas, antifúngicas, tônicas e estimulantes. Do ponto de vista fitoquímico, o alecrim produz flavonóides, flavonas metoxiladas e ácidos fenólicos, sobretudo derivados caféicos, tais como o ácido caféico, o ácido clorogênico e o ácido rosmarínico. O alecrim caracteriza-se, ainda, pela presença de diterpenos tricíclicos e triterpenos (Nascimento *et al.*, 2000; Packer & Luz, 2007).

A crescente importância do uso de extratos naturais de *Rosmarinus officinalis* na produção de compostos alimentares (Adegoke *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999), bem como na indústria farmacêutica e de cosméticos (Mangena & Muyima, 1999), leva à preocupação com a segurança e qualidade dos produtos derivados. Genótipos com altas concentrações de metabólitos secundários devem ser selecionados e propagados, garantindo a eficiência do processo de extração destas moléculas (Hennig *et al.*, 2002).

Atualmente, os principais produtores de alecrim são a Europa e o norte da África. No Brasil, o cultivo encontra obstáculos, principalmente relacionados às condições climáticas. É uma espécie de difícil reprodução por sementes e intolerante a invernos úmidos, característicos da região Sul do Brasil. O valor medicinal e a dificuldade de obtenção de mudas justificam a importância do estudo de formas alternativas de propagação comercial para esta espécie, incluindo a micropropagação, visando selecionar linhagens de alta qualidade para o plantio extensivo e a extração adequada de fitofármacos.

A micropropagação é uma eficiente ferramenta para clonar plantas em escala comercial. Os explantes são cultivados asépticamente em meio de cultura, permitindo uma interação controlada entre fatores abióticos e bióticos, que pode dar origem a plantas geneticamente superiores multiplicadas massivamente. Diversos explantes podem ser utilizados para o início de uma propagação *in vitro* de uma planta, entretanto, procura-se selecionar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar totipotência, tais como gemas apicais, gemas axilares e sementes (Torres *et al.*, 2000; Andrade, 2002).

Diversos fatores influenciam no desenvolvimento da planta *in vitro*, como o genótipo da planta, o estágio de desenvolvimento do tecido doador do explante, a procedência dos explantes e as condições do meio de cultura. O meio de cultura contém boa parte da fonte de energia para a multiplicação do tecido vegetal, associando componentes, como fonte de carbono, nitrogênio, vitaminas e hormônios necessários para manter as divisões celulares e a proliferação dos explantes. A combinação desses componentes com as condições de luz, temperatura e recipiente da cultura é a base para a tecnologia da cultura de tecidos vegetais. Devido a isto, testes prévios devem

ser executados, com o objetivo de obter condições ótimas de cultura (Caldas *et al.*, 1998).

Um dos grandes obstáculos ao sucesso da cultura *in vitro* é a contaminação dos tecidos, que interfere negativamente no estabelecimento dos explantes, pois além de os microrganismos competirem por nutrientes, produzem toxinas que prejudicam o processo de regeneração. Para evitar a contaminação, é necessária a esterilização dos explantes com substâncias tais como etanos e compostos à base de cloro. Outros agentes desinfestantes incluem o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio, assim como ácidos e bases concentradas, alcoóis, como o isopropanol, e bases quaternárias, como o triquaternário de amônio, embora os mesmos sejam menos preferidos devido a seus efeitos tóxicos sobre os tecidos vegetais. O agente desinfestante mais comumente utilizado é o hipoclorito de sódio, que é uma solução aquosa alcalina com 10% de cloro ativo e cerca de 10-13 g/l de soda residual, produzido pela reação entre o cloro gás e uma solução de hidróxido de sódio. Na esterilização de sementes utiliza-se hipoclorito de sódio entre 0,5 e 1,0% de cloro ativo ou mesmo produto contido em alvejantes domésticos, usados na concentração de 1 a 1,5% do cloro ativo. Na esterilização de gemas, por sua vez, as concentrações das soluções desinfestantes podem variar muito, sendo inversamente proporcionais à sensibilidade do tecido. O álcool etílico é geralmente usado a 70% por alguns segundos e o hipoclorito de sódio é aplicado à concentração de 0,5 a 2,0% de cloro ativo por até 40 minutos (Torres *et al.*, 2000). Para melhorar o contato das soluções à base de cloro aos tecidos vegetais, geralmente são adicionadas algumas gotas de detergente. O Tween 20 é o detergente mais utilizado em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v), apesar de os detergentes líquidos para uso doméstico também apresentarem um bom resultado (Torres *et al.*, 2000).

As adequações da concentração do agente desinfestante e do tempo de exposição do tecido variam enormemente de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido, exigindo cuidadosos testes para o estabelecimento de protocolos específicos (Montarroyos, 2000). A maior dificuldade está em atingir a concentração ideal do agente desinfestante, de modo a obter amostras descontaminadas sem conduzi-las à morte quando isoladas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Especificamente, para *Rosmarinus officinalis*, um número restrito de publicações isoladas tem sido dedicado à propagação *in vitro*, entre as quais se destacam os trabalhos de Misra & Chaturvedi (1984), Komali & Shetti (1998), Caruso *et al.* (2000) e Hennig *et al.* (2002). Entretanto, tais trabalhos apresentam protocolos pouco detalhados, além de serem específicos para genótipos adaptados a ambientes europeus e asiáticos.

Os objetivos deste trabalho foram investigar a viabilidade de germinação de sementes industrializadas *in vitro* e determinar as condições ideais de esterilização de segmentos nodais de plantas doadoras adaptadas às

condições climáticas do Rio Grande do Sul, para contribuir com o estabelecimento de um protocolo de micropropagação de *Rosmarinus officinalis*.

Material e Métodos

Esterilização e estabelecimento da cultura in vitro de sementes

As sementes de *Rosmarinus officinalis* foram adquiridas de uma empresa que atua na pesquisa, produção e comercialização de insumos e serviços para horticultura, floricultura, fruticultura e paisagismo. As sementes são previamente tratadas com o fungicida Thiram® (dissulfeto terametil-tiuram) 1,5g/kg de sementes. Conforme instruções da empresa, as sementes foram mantidas a 4°C durante sete dias antes da semeadura, condição que induz a quebra da dormência.

Foram realizados três tratamentos de esterilização, utilizando solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0% (controle), 0,5% e 1%, com 200 sementes cada, totalizando 600 sementes. As sementes foram imersas na solução de NaClO (0,5 e 1%) ou na água destilada (0% de NaClO) durante 10 minutos, após o que foram lavadas quatro vezes em água destilada estéril e distribuídas, em conjuntos de 10, em placas de petri contendo 25 ml do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), composto por sais e vitaminas de MS, 2% de sacarose, 0,4% de Phytigel™ e pH 6,0. As placas etiquetadas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D., à temperatura de 25°C ±2°C. Para cada tratamento, metade das placas foi mantida no escuro durante 10 dias (placas envoltas em papel alumínio), e o restante foi exposto ao fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para que todas as placas recebessem intensidade luminosa semelhante, as suas posições foram trocadas duas vezes por semana.

A avaliação da contaminação das sementes por fungos e bactérias ocorreu aos sete e 14 dias após o início da cultura. A germinação foi avaliada após 45 dias em cultura.

Esterilização e estabelecimento da cultura in vitro de segmentos nodais

Os segmentos nodais de *Rosmarinus officinalis* foram obtidos de uma planta cultivada em ambiente externo. Os explantes foram lavados em água corrente com detergente, enxaguados em água destilada e submetidos à esterilização. Diferentes concentrações de NaClO, com ou sem lavagem prévia com álcool etílico a 70%, além de diferentes tempos de exposição dos explantes ao NaClO foram testados, sob condições assépticas, conforme Tabela 1. Ao final do tratamento, os explantes foram lavados quatro vezes em água destilada estéril.

Cada segmento nodal com folhas foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), composto por sais e vitaminas de MS, 0,5 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 mg/l de

ácido α -naftalenoacético (NAA), 2% de sacarose, 4% de PhytigelTM e pH 6,0. Os tubos etiquetados foram mantidos em câmara de germinação tipo B.O.D., à temperatura de 25°C \pm 2°C.

A avaliação da contaminação por fungos e bactérias foi realizada ao final de 30 dias *in vitro*, sendo que a sobrevivência dos explantes e a formação de brotos foram avaliadas após 45 dias de cultura. Para a análise estatística foram considerados três grupos (Tabela 1). Cada tratamento consistiu de 20 repetições, sendo considerado como repetição o tubo contendo um explante. Para comparar os grupos em relação à porcentagem de contaminação e à formação de brotos a partir dos explantes, foi utilizado o teste do Qui-quadrado de associação. Os resíduos ajustados padronizados (diferenças ajustadas entre frequências observadas e esperadas) foram analisados, para identificar diferenças entre grupos. O teste do Qui-quadrado ainda foi utilizado para comparar os tratamentos dentro do Grupo 1, pelo fato de este grupo ter se destacado positivamente dos demais. Também neste caso, os resíduos ajustados foram analisados, para detectar diferenças entre tratamentos.

Tabela 1- Protocolos de esterilização aplicados aos segmentos nodais de *Rosmarinus officinalis*.

Grupo	Tratamento	Álcool 70%	NaClO (%)	Tempo de exposição (min)
Grupo 1	1	sim	1	5
	2	sim	1	10
	3	sim	1	15
Grupo 2	4	não	1	5
	5	não	1	10
	6	não	1	15
	7	não	1	20
	8	não	1	25
	9	não	1	30
Grupo 3	10	não	1,5	5
	11	não	1,5	10
	12	não	1,5	15
	13	não	1,5	20
	14	não	1,5	25
	15	não	1,5	30

Resultados e Discussão

Esterilização e estabelecimento da cultura *in vitro* de sementes.

Os dados referentes à esterilização de sementes após sete dias, bem como os dados referentes à germinação após 45 dias em cultura são apresentados na Tabela 2. Este experimento foi conduzido com o objetivo de testar a capacidade de germinação das sementes, utilizando, para tanto, sementes industrializadas e tratadas previamente com agente fungicida. Nas condições de cultivo *in vitro* testadas, o tratamento com o fungicida Thiram® se mostrou ineficiente, uma vez que 100% das placas apresentaram

contaminação por fungos, independente das condições de luz. Numericamente, o tratamento com 1,0% de NaClO durante 10 minutos proporcionou a menor quantidade de placas contaminadas (10%), tanto no claro, como no escuro, identificando esta concentração do agente desinfestante como a mais eficiente. A contaminação de placas aos 14 dias não apresentou diferença em relação à contaminação aos sete dias, mostrando que o maior crescimento de fungos e bactérias ocorreu na primeira semana da cultura. Para outras espécies da família Lamiaceae, resultados semelhantes foram encontrados em publicações. No trabalho de Lima *et al.* (2004), a solução de 1% de NaClO, durante 15 e 20 minutos, levou a uma menor porcentagem de contaminação de sementes de *Thymus vulgaris* L.. Para *Melissa officinalis* L., sementes foram desinfestadas com sucesso utilizando 0,8% de NaClO durante 20 minutos (Reis *et al.*, 2008). Em ambos os trabalhos, a porcentagem de germinação foi considerada satisfatória, o que se deve, provavelmente, ao fato de terem sido utilizadas plantas cultivadas em casa de vegetação como doadoras das sementes.

Do total de 600 sementes, apenas quatro germinaram, o que equivale a 0,67%. Uma porcentagem semelhantemente baixa já havia sido observada anteriormente (dados não publicados). Porcentagens dessa ordem inviabilizam o uso de sementes industrializadas para o estabelecimento da cultura *in vitro*, principalmente quando o objetivo é a produção de um grande número de plantas. Uma desvantagem adicional do uso de sementes é a sua natureza genética heterogênea, que é indesejável em trabalhos em que se busca a multiplicação de genótipos selecionados.

Não foram encontrados trabalhos bibliográficos sobre germinação de sementes de alecrim, o que impede a comparação de resultados e também aponta para a dificuldade e a falta de aplicabilidade do uso deste tipo de material.

Tabela 2. Contaminação por fungos e bactérias (após sete dias) e número de sementes germinadas (após 45 dias) tratadas com diferentes concentrações de NaClO e em diferentes condições de luminosidade.

NaClO (%)	Luz	Total de placas*	Placas com contaminação	Número de sementes germinadas
0	escuro	10	10	0
0	claro	10	10	0
0,5	escuro	10	1	0
0,5	claro	10	5	2
1	escuro	10	1	1
1	claro	10	1	1

*Cada placa continha 10 sementes.

Esterilização e estabelecimento da cultura *in vitro* de segmentos nodais

Os segmentos nodais foram divididos em grupos, de acordo com os processos de esterilização aplicados (Tabela 1). A porcentagem de contaminação variou entre grupos ($\chi^2=36,578$; $df=2$; $p<0,001$), tendo sido, em

média, de 48,3, 86,7 e 82,5%, respectivamente, nos Grupos 1, 2 e 3 (Figura 1). Uma subsequente análise dos resíduos ajustados mostrou haver diferença significativa do Grupo 1, que apresentou menor contaminação, em relação aos demais. Este grupo foi formado pelos explantes tratados com álcool etílico a 70% antes da esterilização com NaClO.

Dentro do grupo 1 (explantes tratados com álcool etílico e NaClO), os tempos de esterilização (T1-T3) apresentaram associação com a contaminação ($\chi^2=6,541$; $df=2$; $p=0,038$), havendo uma relação inversa entre o tempo e a porcentagem de contaminação. Quando os explantes foram expostos a NaClO durante 15 minutos, a contaminação foi significativamente menor (30%) do que nos explantes expostos por 5 minutos (70%), de acordo com a análise dos resíduos ajustados. Nos tratamentos dentro de cada um dos outros dois grupos, pôde ser visualmente observada a mesma tendência. Nestes grupos, os menores tempos de esterilização (5 e 10 minutos) inclusive levaram a 100% de explantes contaminados, o que se deve, provavelmente, à não utilização do álcool etílico. Hennig et al. (2002), testando dois genótipos de *Rosmarinus officinalis* observaram porcentagens de germinação de 10 a 90%, variação que foi atribuídas a diferentes graus de infestação das plantas doadoras obtidas de ambientes externos. Os autores trataram os explantes nodais com 8% de NaClO durante três minutos. Em *Lippia sidoides* Cham., a contaminação dos explantes foi reduzida com a imersão em solução NaClO a 0,8% em diferentes tempos de imersão (8, 12, 16 e 20 min), sendo que a contaminação variou de 33,7% a 50,6%. Segundo os autores, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre tratamentos, numericamente os tempos de imersão de 12 e 16 minutos proporcionaram menores porcentagens de contaminação, enquanto que o aumento do tempo de 16 para 20 minutos induziu a redução do número de brotos formados de 1,52 para 1,22, do número de folhas por explante de 2,62 para 1,81 e do número de folhas por brotos de 1,70 para 1,24 (Costa et al., 2007). Por sua vez, em *Salvia officinalis* L., o melhor resultado de esterilização de explantes foi obtido em tratamento que consistiu na imersão em álcool 70% por 3 minutos e em hipoclorito de sódio 20% (solução comercial, contendo 2% cloro ativo) por 30 minutos (Lima et al., 2008). Zigiotto (2007) testou diferentes concentrações de NaClO comercial e constatou que o uso deste a 20% (2% de cloro ativo) por 45 minutos induziu alta taxa de oxidação nos explantes nos primeiros cinco dias da cultura, levando à morte de todos os explantes. O uso de NaClO a 20% por 30 minutos promoveu menor infestação de fungos e bactérias, porém a taxa de sobrevivência foi de 33,33%, considerada relativamente baixa para micropropagação.

O NaClO é mais comumente usado em concentrações de 0,5 a 2,0% de cloro ativo, em diferentes tempos, de acordo com a consistência do tecido. O tempo de imersão pode chegar até 40 minutos, no caso de tecidos lignificados. Concentrações mais altas de NaClO, tais como 6%, e tratamentos

de até 60 minutos têm sido utilizados somente para a desinfestação de explantes com várias camadas de tecidos, como frutos intactos, visando à extração de sementes (Grattapaglia & Machado, 1998; Torres *et al.*, 2000).

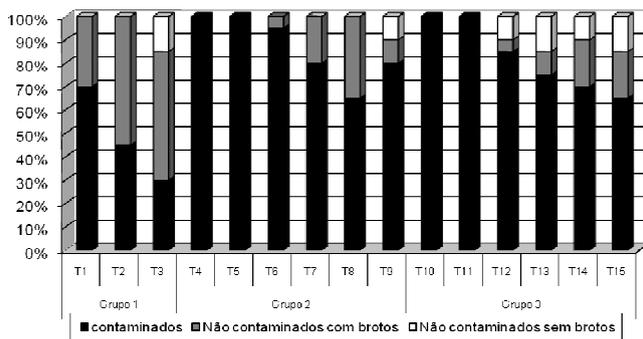


Figura 1: Influência da esterilização sobre a contaminação de segmentos nodais e a capacidade de formação de brotos *in vitro* de *Rosmarinus officinalis*.

Nos testes apresentados neste trabalho, a contaminação fúngica e bacteriana foi considerada alta (mínimo de 30%), fazendo-se, ainda, necessários testes com outros desinfestantes tais como o cloreto de mercúrio e o cloreto de benzalcônio. O cloreto de mercúrio (HgCl_2) é tóxico aos tecidos, por isso sendo utilizado em concentrações inferiores aos de NaClO. Misra & Chaturvedi (1984) usaram solução de HgCl_2 a 0,1% para a desinfestação de segmentos nodais de *Rosmarinus officinalis*. O cloreto de benzalcônio agride menos os tecidos, e pode ser usado a concentrações semelhantes aos de NaClO (Torres *et al.*, 2000).

Uma semana após a iniciação da cultura *in vitro*, os explantes de todos os grupos apresentavam-se com coloração marrom, estando aparentemente necrosados. Um maior número de segmentos nodais marrons pôde ser observado no Grupo 1, levando a concluir, inicialmente, que o estresse fisiológico destes explantes teria sido maior e causado pelo uso combinado de álcool etílico e NaClO. No entanto, a partir de 30 dias, pôde ser observado o surgimento de brotos nos meristemas dos segmentos nodais, evidenciando a vitalidade de tais tecidos. Os tecidos meristemáticos permanecem protegidos da ação direta dos agentes utilizados para esterilização pelas bases das folhas presentes nos segmentos nodais, o que pode contribuir com a sua capacidade de sobrevivência ao estresse do processo. No trabalho de Hennig *et al.* (2002), os segmentos nodais de *Rosmarinus officinalis* apresentaram cerca de 30% de sobrevivência aparente após 14 dias e menos de 10% após 28 dias, após o que o experimento foi concluído. Em um segundo experimento, os autores mantiveram os tecidos durante mais tempo em cultura, obtendo brotos ao final de 56 dias, o que mostra a importância de manter os explantes, mesmo

aparentemente necrosados, *in vitro* por um tempo mais prolongado, para permitir o desenvolvimento de brotos.

Após 45 dias *in vitro*, os segmentos nodais não contaminados foram avaliados quanto à capacidade de formação de brotos. Entre os explantes não contaminados, a proporção de explantes com brotos e explantes sem brotos variou significativamente entre grupos ($\chi^2=11,594$; $df=2$; $p=0,003$). Enquanto houve produção de brotos em 90% dos segmentos nodais não contaminados tratados com álcool etílico a 70% e 1% de NaClO (Grupo 1) e em 87,5% dos explantes não contaminados tratados com 1% de NaClO sem álcool (Grupo 2), apenas 52,4% dos explantes tratados com 1,5% de NaClO (Grupo 3) formaram brotos. No Grupo 2, apesar da alta porcentagem de brotamento, o número de explantes com brotos não foi expressivo, devido à baixa porcentagem de explantes não contaminados (12,5%). Devido a isto, o tratamento com 1% de NaClO sem álcool etílico não pôde ser considerado adequado para a produção de brotos. Hennig *et al.* (2002) obtiveram, no máximo, 40% de explantes de alecrim com capacidade de regeneração, embora a maior parte de tais tecidos tenha morrido nas etapas seguintes da cultura *in vitro*, inviabilizando a continuidade do processo.

Avaliando cada grupo de forma independente, observou-se que nos maiores tempos testados, houve segmentos nodais incapazes de produzir brotos (Figura 1). Tal fato se tornou especialmente evidente no Grupo 3, em que a maior concentração de NaClO associada a 15-30 minutos de esterilização levou a cerca de 10% de explantes sem brotos. Também neste caso, atribui-se o fato ao crescente estresse fisiológico sofrido pelos tecidos durante o processo de esterilização.

De maneira geral, pode-se afirmar que, dentre os processos de esterilização testados, o uso combinado de álcool etílico a 70% e 1% de NaClO mostrou-se mais eficiente, levando às menores porcentagens de contaminação e às maiores porcentagens de segmentos nodais sobreviventes com formação de brotos (média de 90%). Utilizando esta combinação de agentes desinfestantes, os tempos mais adequados foram 10 e 15 minutos.

Agradecimentos: À Universidade do Vale do Rio dos Sinos e ao Centro Universitário Feevale pela subvenção.

Referências Bibliográficas

- ADEGOKE, G.O.; KUMAR, M. V.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARADAJ, M. C.; SAMBAIAH, K. & LOKESH, B.R. 1998. Antioxidants and lipid oxidation – a critical appraisal. *Journal of Food Science Technology* 35: 283-298.
- ANDRADE, S. R. M. 2002. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. Documentos. *Embrapa Cerrados* 58: 1-14.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M. E. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. & BUSO, J. A. (ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, v.1, p. 87-132.

- CARUSO, J. L.; CALLAHAN, J.; DECHANT, C.; JAYASIMHULU, K. & WINGET, G. D. 2000. Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant Cell Reports* 19: 500-503.
- CHEN, Y.; ZHU, N. Q.; LO, C. Y.; WANG, M. F. & HO, C. T. 1999. Process-induced health-promoting substances in foods. *Food Revue International* 15: 473-501.
- COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F. & LEDO, A. S. 2007. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 25: 68-72.
- FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL. 2005. *Guia do Jardim Botânico de Porto Alegre*. Porto Alegre: Jardim Botânico de Porto Alegre.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, v. 1, p. 183-260.
- HENNIG, F.; KADNER, R.; JUNGHANN, W. & SEYRING, M. 2002. Einsatz des *in vitro*-Screenings zur schnellen Erarbeitung einer Massenvermehrungsmethode von *Origanum vulgare* Genotypen. *Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen* 5: 160-164
- KOMALI, A. S. & SHETTY, K. 1998. Comparison of the growth pattern and rosmarinic acid production in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) shoots and genetically transformed callus cultures. *Food Biotechnology* 12: 27-41.
- LIMA, C. S. M.; SANTOS L. S.; SCHMITZ, D. D.; BEDUHN, F. A. & BRAGA, E. J. B. 2004. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) In: *XIII Congresso de Iniciação Científica UFPel*, Pelotas.
- LIMA, G. P. P.; ZIGIOTTO, D. C. & TAKAKI, M. 2008. Micropropagação de *Salvia officinalis* L. com avaliação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 10: 75-82.
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- MANGENA, T & MUYIMA, N. Y. O. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters of Applied Microbiology* 28: 291-296.
- MISRA, P. & CHATURVEDI, H. C. 1984. Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L.. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3: 163-168.
- MONTARROYOS, A. V. V. 2000. Contaminação *in vitro*. *Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas - Notícias* (36/37): 5-10.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- NASCIMENTO, G. G. F. ; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. & SILVA, G. L. E. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 247-256.
- PACKER, J. F. & LUZ, M. M. S. 2007. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17: 102-107.
- REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S. & CORRÊA, R. M. 2008. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Revista Ceres* 55: 160-167.
- TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. M. & ROMANO, E. 2000. *Glossário de Biotecnologia vegetal*. Brasília: Embrapa Hortaliças.
- ZIGIOTTO, D. C. 2007. *Compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas Salvia officinalis* (L) *micropropagadas*. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual Paulista. 54 p.