



Multiplicação vegetativa in vitro

Ctesp em produção agrícola

Rafael José Batista Narciso

Orientadores

Dr. José Gonçalves

Dr. Clayton Debiasi

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de técnico superior profissional em produção agrícola, realizada sob a orientação científica de Doutor Clayton Debiasi, do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior e orientação externa do Doutor José Gonçalves, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Junho de 2020

Composição do júri

Presidente do júri

Grau académico, nome do presidente do júri”

Vogais

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

“A agricultura aqui (em Portugal)
é a arte de assistir impassível ao
trabalho da natureza”
(Eça de Queiróz)

Agradecimentos

Ao Dr. Clayton Debiasi por ter sido o meu tutor do estágio e pela toda a ajuda disponibilizada, momentos passados, ensinamentos dados, simpatia, todo o apoio dado e pelo contributo que tiveram para que a minha prestação fosse a melhor possível.

Ao Dr. Henrique Martins e à Eng^a Joana Domingues, pela simpatia, empenho, dedicação, disponibilidade mostrada para qualquer ocasião, pelo apoio para a realização de todas as atividades propostas, pelo reconhecimento mostrado pelo trabalho por mim efetuado e por tudo o que me ensinaram de novo ao longo deste percurso.

Ao Dr. José Gonçalves e Dr. Luís Peças por terem dado a oportunidade de estagiar no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

A boa parte dos professores que tive durante o meu percurso escolar pelo seu apoio e preocupação mostrada durante todo o meu percurso e por mostrarem disponibilidade para me ajudar em tudo o que necessitei.

À Cindy por ajudar-me a manter um sorriso na cara, de uma certa maneira tornar as tarefas mais engraçadas.

A todos um grande obrigado.

Resumo

O presente relatório tem como objetivo demonstrar as atividades desenvolvidas ao longo de aproximadamente 150 horas de estágio no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI), até ao período de interrupção das normais atividades em consequência da pandemia provocada pelo COVID19. Nele descrevemos o Centro e as suas funções, sendo que, durante o período de confinamento, o trabalho continuou mais num contexto de leituras e pesquisa bibliográfica relacionadas com o tema da multiplicação de plantas, nas suas diferentes metodologias, tradicionais e principalmente da multiplicação vegetal em *vitro* e de todos os fatores que estão envolvidos nestes processos e que constituem uma área de trabalho muito importante no CBP-BI.

Palavras chave

Micropropagação; Multiplicação de plantas; asséptico; plântulas

Abstract

This report aims to demonstrate the activities developed over approximately 150 hours of internship at the Plant Biotechnology Center of Beira Interior (CBP-BI), until the period of interruption of normal activities as a result of the pandemic caused by COVID19. In it we describe the Center and its functions, and also the developed work in the context of the containment with more readings and bibliographic research related to the theme of plant multiplication, in its different methodologies, traditional and especially the plant multiplication in vitro and all the factors that are involved in these processes and that constitute a very important area of work in CBP-BI.

Keywords

Micropropagation; Plant multiplication; aseptic; plantlets

Índice geral

1. Introdução	1
2. Apresentação do local de estágio.....	2
2.1 Serviços prestados	2
2.2 Instalações e equipamento	2
3. A multiplicação de plantas.....	3
3.1 Reprodução sexuada	3
3.1.1 Gimnospérmicas	3
3.1.2 Angiospérmicas.....	4
3.2 Reprodução assexuada.....	5
Métodos convencionais.....	5
3.2.1 Rizomas	5
3.2.2 Estolhos.....	5
3.2.3 Tubérculos	5
3.2.4 Bolbos e Bolbilhos.....	6
3.2.5 Estacaria	6
3.2.6 Mergulhia	6
3.2.7 Alporquia.....	6
3.2.8 Enxertia.....	7
Métodos in vitro.....	7
3.2.9 Multiplicação vegetativa <i>in vitro</i>	7
4. Descrição das atividades realizadas	9
4.1 Preparação de meio	9
4.2 Multiplicação	11
4.3 Enraizamento	11
4.4 Stock	11
4.5 Limpeza do canteiro e arrumação da estufa	11
5 Higiene e segurança no trabalho.....	12
Conclusão.....	13
Bibliografia.....	14
Anexos.....	15

Índice de figuras

Figura 1 Reprodução sexual das gimnospérmicas	3
Figura 2 Composição morfológica das angiospérmicas.....	4
Figura 3 Uns dos componentes do meio da formulação de murashige e Skoog	15
Figura 4 Medidor de ph com as soluções de NaOH e HCl.....	15
Figura 5 Solução com um íman numa placa térmica	16
Figura 6 Bomba peristáltica	16
Figura 7 Tubos de ensaio com a mesma quantidade de solução em cada um	17
Figura 8 Camara de fluxo laminar	17
Figura 9 Material de manuseio usado na repicagem	18
Figura 10 Enrizamento dos cactos na sala bioclimática.....	18
Figura 11 Espécies e a quantidade que estão presentes na sala bioclimática	19
Figura 12 Após a limpeza do canteiro das margaridas.....	19

1. Introdução

Os objetivos traçados para o estagiário são a aplicação dos conhecimentos e saberes adquiridos às atividades práticas do respetivo perfil profissional e contempla a execução de atividades sob orientação, utilizando as técnicas, os equipamentos e os materiais que se integram nos processos de produção de bens ou de prestação de serviços

O presente relatório é o culminar de um mês e meio de estágio com atividades práticas de 2 de fevereiro até 18 de março, tendo sido interrompido em virtude das condições impostas pela pandemia COVID19, sendo que o restante período de tempo foi sendo utilizado em atividades de leitura e pesquisa bibliográfica relacionados com o tema.

O relatório que se segue foi estruturado de acordo com as informações retiradas ao longo do estágio. São referidas as atividades realizadas e que me ensinaram a realizar durante o estágio, caracterizando a instituição e descrevi as normas de Higiene e Segurança no Trabalho (HST) aplicadas na instituição. Dei a minha opinião acerca do estágio e expliquei o contexto em que foi realizado.

As atividades previstas para este estágio inseriam-se fundamentalmente na área da multiplicação de plantas, em particular, recorrendo a modernas tecnologias de multiplicação in vitro, bem como atividades de manutenção e cuidados de plantas em estufa.

2. Apresentação do local de estágio

O Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI) iniciou as suas atividades em 2015, está localizado na Quinta da Sr^a de Mércules, em Castelo Branco e ocupa as antigas instalações da Escola Superior Agrária e resultou da implementação de um projeto financiado pelo programa Mais Centro da Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Centro, com fundos comunitários. Foi criado ao abrigo de um protocolo de colaboração entre o Instituto Politécnico de Castelo Branco (IPCB), a Câmara Municipal do Fundão, a Universidade da Beira Interior, o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas em Brasil e Biocant-Associação de Transferência de Tecnologia.

2.1 Serviços prestados

O CBPBI desenvolve a sua atividade técnica e científica nas áreas da multiplicação de plantas em geral (porta-enxertos, variedades e cultivares) e em particular por sistemas de propagação *in vitro*, da biodiversidade (identificação, caracterização e conservação de espécies), da bioprospeção de produtos naturais, privilegiando a flora autóctone (extração, identificação, caracterização, quantificação e avaliação da atividade de extratos e compostos naturais) e disponibiliza ainda as suas infraestruturas, tecnologia e apoio a empresas start-up.

2.2 Instalações e equipamento

O CBPBI possui espaços laboratoriais relacionados com as áreas de atividade anteriormente referidas, mas uma vez que as atividades no Centro foram limitadas pelo tempo de estágio serão referidas em particular as instalações e equipamentos relacionados com a multiplicação de plantas.

É constituído por uma sala de com equipamento de esterilização/desinfecção, com 2 autoclaves e uma estufa de esterilização; um laboratório de preparação de meios de cultura, com todo o equipamento necessário aos procedimentos de preparação dos meios nutritivos que dão suporte à micropropagação, tais como, equipamento de produção de água pura e ultrapura, balanças, placas térmicas agitadoras, distribuidores de meio, frigoríficos, potenciómetros e um autoclave horizontal para esterilização dos meios de cultura, sala de repicagem com 6 câmaras de fluxo laminar; 2 salas bioclimáticas com controlo de luz e temperatura com 120 m² de área útil onde também estão instalados blocos de biorreatores de imersão temporária com automação por computador; 1 câmara bioclimática walk-in com controlo de luz, temperatura e humidade; 1 estufa de campo com 250 m² com controlo ambiental.

3. A multiplicação de plantas

As plantas têm desenvolvido diferentes estratégias de reprodução para manterem a sua espécie viva. A reprodução sexuada implica a troca randomizada de material genético durante a meiose e a união de dois gâmetas, o que garante uma grande diversidade genética na espécie. Já a reprodução assexuada é quando partes de uma mesma planta originam outro indivíduo idêntico entre si, isto é, mantendo as características genéticas do seu progenitor.

3.1 Reprodução sexuada

3.1.1 Gimnospérmicas

São plantas são vasculares, não se reproduzem usando esporos como feto e o musgo e foram as primeiras a adaptarem para não serem dependentes da água quando ocorre a sua reprodução sexuada. Neste grupo estão incluído as coníferas, as cicadáceas, a ginkgo e gnetófitas e nenhuma delas produzem flores porque evoluíram antes das flores existirem, em vez de isso desenvolveram uma frutificação designada por pinha, em que a parte feminina é a estrutura onde estão protegidos os óvulos, e a parte masculinas com uma textura esponjosa e com escamas onde ocorre a produção do pólen.

O pólen é levado pelo vento onde só uma pequena parte encontra a pinha feminina onde irá fertilizar o óvulo que esta localizado na base da escama. O embrião fertilizado matura dentro da pinha onde forma uma semente que tem nutrientes suficientes para manter viva até germinar.



Figura 1 Reprodução sexual das gimnospérmicas

3.1.2 Angiospérmicas

São a divisão mais recente que apareceram no reino Planta e mais evoluída comparada as outras divisões, são semelhantes às gimnospérmicas, mas contêm uma grande diferença que são as flores. Uma vantagem das flores é que não necessita do vento para levar o pólen para outra flor, mas podem utilizar seres vivos para realizarem esse trabalho, normalmente costumam ser insetos voadores, mas também existem pássaros como o colibri e mamíferos como os morcegos e, como recompensa, as plantas oferecem néctar para atrair polinizadores formando uma relação simbiótica.

Independentemente do seu tamanho, forma ou cor, todas as floras são formadas por ramos profundamente modificados no sentido da reprodução. Esses ramos são constituídos pelo pedúnculo e pelo receptáculo, na extremidade dos quais se inserem as peças florais. As sépalas são as peças mais externas de cor verde. Logo a seguir estão as pétalas de cores vivas. O cálice (conjunto de sépalas) e a corola (conjunto de pétalas) servem para proteger as partes produtoras da planta. A corola ainda desempenha outra função de atrair polinizadores. Nas flores das monocotiledóneas, as sépalas e as pétalas não se diferenciam, designando-se por tépalas.

No interior da planta encontram-se as partes reprodutivas da planta, o gineceu e androceu. O androceu é a parte masculina da flor que consiste no conjunto dos estames, cada um dos quais é constituído por filete e antera. O gineceu que é a parte feminina da flor pode conter um ou mais carpelos e cada carpelo é constituído pelo ovário que guarda os óvulo, estigma que é o local que capta o pólen trazido pelo polinizadores e estilete que faz a ligação entre estigma com o ovário.

A disposição das flores na planta tem o nome de inflorescência

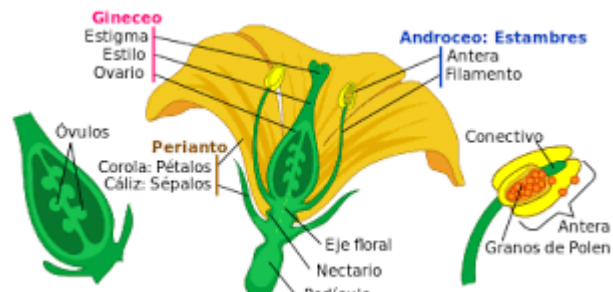


Figura 2 Composição morfológica da flor das angiospérmicas

Maioria das plantas angiospérmicas tem flores hermafroditas, então para impedir que a própria flor realize a autofecundação a planta criou uns mecanismos para evitar o mesmo que consiste em amadurecer do gineceu e androceu em tempos diferentes.

O ovário de uma flor, após o óvulo ter sido fecundado, forma a semente. Na maioria das plantas o pericarpo resulta do desenvolvimento das paredes do ovário, mas em certos casos também se pode originar noutras estruturas como o receptáculo e perianto.

Em plantas que usam os animais para deslocar as sementes para outros locais, geralmente contem um pericarpo mais carnudo e sumarento e a semente contem uma película protetora para evitar que seja decomposto pelo suco gástrico e depois da digestão sejam liberadas longe do local de origem para evitarem competir com os seus rebentos.

3.2 Reprodução assexuada

A reprodução assexuada ocorre essencialmente nas plantas superiores, a partir de estruturas ou partes da planta capazes de regenerar um indivíduo completo.

A multiplicação vegetativa pode ser natural, formando-se as novas plantas a partir de partes da planta-mãe (ex.: folhas, estolhos, rizomas, raízes tuberculosas, tubérculos, bolbos, bolbilhos, gomos aéreos, caules rastejantes) ou artificial como o método da estaca, a mergulhia e a enxertia. Recorrendo ainda a modernas tecnologias laboratoriais, a multiplicação vegetativa pode ainda ser realizada em condições artificiais, criando as condições de solo e climáticas da natureza, em meios nutritivos de formulação definida e cultivando as plantas em salas de cultura com controlo ambiental de luz, temperatura, fotoperíodo e humidade.

Descrevem-se a seguir de uma forma resumida, algumas destas metodologias.

Métodos convencionais

3.2.1 Rizomas

São muitas vezes confundidas por raízes, mas na verdade são caules subterrâneos porque apresentam gemas, alongados que crescem na direção horizontal que emitem raízes adventícias. Em condições favoráveis produzem gomos a partir dos quais são emitidos caules aéreos que originam novas plantas.

Exemplos: Dália e lírios.

3.2.2 Estolhos

Os estolhos são prolongamentos rastejantes que partem do caule e terminam por um gomo. Em intervalos mais ou menos regulares o gomo terminal adquire raízes adventícias e folhas originando uma nova planta independente

Ex: Morangueiros.

3.2.3 Tubérculos

São caules subterrâneos com função de reserva. Cada um destes tubérculos pode originar uma ou mais plantas a partir de gomos que se diferenciam do mesmo. NO caso da batateira, para rentabilizar, é dividida em vários fragmentos de tal modo que cada um deles contenha pelo menos um gomo originando uma nova planta.

Ex: Batateira.

3.2.4 Bolbos e Bolbilhos

São caules subterrâneos curtos que apresentam um gomo terminal protegido por folhas escamosas carnudas, que se envolvem totalmente ou parcialmente.

Em condições ambientais favoráveis pode ocorrer a formação de gomos laterais, que se fazem rodear por novas folhas, e a partir dos quais se formarão novas plantas.

No alho, o bolbo decompõe-se em bolbilhos, formados nas axilas das suas folhas mais externas e separadas entre si por folhas protetoras chamadas brácteas. Cada bolbilho pode originar uma nova planta.

Ex: Cebola e Alhos

3.2.5 Estacaria

Talvez a técnica mais usada pelos viveiristas na propagação de plantas lenhosas. Existem várias maneiras de a realizar, mas tem por base a utilização de uma parte da planta, uma estaca, que pode ser lenhosa, semi-lenhosa ou herbácea, que será colocada num substrato fazendo com que sejam emitidas raízes. É habitual cortar uma haste semilenhosa no final de verão e remover a extremidade da mesma. Encurtar a estaca de modo a ficar com 10 cm e eliminar as últimas folhas da parte inferior da estaca. Caso necessário aplicar na base uma hormona estimuladora do enraizamento e enterrar a estaca na terra preparada com uma distância de 5 cm de cada estaca. Humedecer o substrato e manter humidade ambiental e, após enraizamento, ser transplantada para saco ou vaso até local definitivo.

3.2.6 Mergulhia

Consiste em escolher um ramo vigoroso e enterrar uma parte no solo, A parte enterrada começa a criar raízes, quando estiver enraizada pode separar-se da planta mãe e assim obtém-se uma planta independente

3.2.7 Alporquia

Também conhecida por mergulhia aérea, a operação é normalmente realizada na primavera em ramos lenhosos fazer uma incisão que permita retirar da casca um anel com 1 cm de altura e envolver a região cortada com terra húmida, que é mantida no local por um pedaço de plástico preto amarrado no ramo. O corte e o contato com a terra húmida induzem o enraizamento, enquanto o ramo continua a receber nutrientes minerais da planta mãe através da parte intacta do caule.

3.2.8 Enxertia

Consiste na união dos tecidos de duas plantas de diferentes características que consiste no enxerto a planta que apresenta qualidades que se pretende reproduzir e o porta-enxerto ou cavalo que por ser mais desenvolvida irá alimentar esse enxerto.

São vários processos de enxertia como por exemplo garfo e cavalo, borbulha e encosto.

Métodos *in vitro*

3.2.9 Multiplicação vegetativa *in vitro*

A cultura *in vitro* constitui um importante recurso técnico para se obter indivíduos cujo desenvolvimento na natureza seria de todo modo impossível. O recurso a esta modalidade reprodutiva tem-se revelado útil para o homem, em particularmente na agricultura e na hortofloricultura. Esta técnica, desenvolvida em condições laboratoriais e ambientes controlados, assenta em três condições:

Isolamento de fragmentos de tecido que vão ser submetidos a cultura;

Manutenção do explante num meio nutritivo adequado;

Otimização das condições de cultura, nomeadamente a existência de um ambiente esterilizado.

Também conhecido por micropropagação este processo pode ser definido como: “a propagação de plantas em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando contentores de plástico ou vidro, com manipulação em condições assépticas.” (IAPTC, 1985).

Para realizar este processo é necessária uma planta mãe onde se irão obter os explantes, por esse motivo a planta mãe precisa estar nas melhores condições possíveis, quer fisiológicas quer sanitárias, para que não ocorram imprevistos durante o processo por esse motivo a planta mãe pode passar por desinfeção, tratamento de hormonas e teste de viroses.

O melhor resultado obtém-se a partir de tecidos de células que apresentam ainda uma elevada totipotência ou em outras palavras são células que tem a habilidade de transformar em outras células e fazer diferentes funções como células embrionárias:

Células isoladas

Ápice vegetativo

Sementes

Embriões, devidamente separados dos tecidos que compõem a semente

Como se disse anteriormente, o sucesso deste tipo reprodutivo passa pela manutenção de um meio absolutamente asséptico. Os explantes passam por uma solução de etanol e lixívia durante um determinado tempo consoante a planta que for usada e de seguida passa três vezes pelo um banho com água estéril para remover a solução, os recipientes e o meio de cultura são esterilizados em autoclave para destruir o máximo possível de contaminantes. A preparação e a divisão das plantas cultivadas *in vitro* é feita numa câmara de fluxo laminar para reduzir ao máximo possível de ocorrer contaminação.

Este processo de micropropagação passa, normalmente por 3/4 fases (Gonçalves, 2020)

Fase 0 - Seleção da planta mãe e preparação do explante

Fase 1 - Estabelecimento em cultura assética

Fase 2 - Multiplicação

Fase 3/4 – Enraizamento / Transplante e aclimatização

A Fase 0 envolve todos os processos de manipulação do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*, incluindo os pré-tratamentos do material vegetal e sistemas de desinfeção; os fatores a controlar são: características genotípicas, idade e estado fisiológico da planta mãe e idade e posição do tecido ou órgão na planta. Na Fase 1 são todo o conjunto de procedimentos de desinfeção do material vegetal que levam à inoculação *in vitro*, em meio de cultura do explante primário para iniciar o processo de multiplicação; os fatores a controlar são: a contaminação das culturas por agentes patogénicos, a inibição do crescimento por fenóis e polifenóis, a formulação nutritiva/reguladores de crescimento e as condições físicas de cultura. Na Fase 2, de acordo com a metodologia utilizada o principal objetivo é conseguir propagar sem perda de estabilidade genética; os fatores a controlar são as características genotípicas, a formulação nutritiva/reguladores de crescimento e as condições de cultura. Na Fase 3 e 4, preparam-se os rebentos formados para crescerem em ambiente natural, para isso é necessária a formação de raízes adventícias, quer *in vitro* quer *in vivo*, podendo haver necessidade de uma fase prévia de alongamento dos rebentos obtidos na fase 2 e pode ser feita em separado ou em simultâneo com a aclimatização, processo de adaptação gradual das microplantas às condições ambientais naturais de luz, humidade e temperatura.

Pela sua elevada resistência a temperaturas altas utilizam-se habitualmente recipientes de vidro por esse motivo vem a designação de culturas *in vitro*.

A composição do meio de cultura depende bastante da espécie em causa e do sistema de cultura em uso. Basicamente utiliza-se meios nutritivos ricos em macronutriente, micronutrientes, vitaminas e hormonas e reguladores de crescimento, bem como de sacarose. Para dar consistência aos meios utiliza-se agar.

A transferência da planta para o solo, após o seu desenvolvimento inicial *in vitro*, deverá ser feita uma adaptação gradual para minimizar o impacto dessa transferência. É importante na primeira fase cuidar particularmente da temperatura e da hidratação.

Estes processos têm grandes vantagens, mas também desvantagens, que a seguir se referem (Gonçalves, 2020):

Vantagens:

Propagação massal de plantas geneticamente idênticas (clonagem);

Produção de plantas durante todo o ano;

Obtenção de plantas isentas de doenças e pragas;

Rápida multiplicação de plantas para lançamento no mercado.

Obtenção de grande número de plantas por m² com economia de espaço.

Desvantagens:

Dificuldade em encontrar o meio adequado para a espécie desejada;

Exige formação de pessoal especializado;

Laboratório especializado com custos elevados;

Plantas lenhosas, em geral, apresentam certas dificuldades para regeneração *in vitro*;

Redução da base genética (clonagem).

4. Descrição das atividades realizadas

4.1 Preparação de meio

As atividades no CBPPI foram bastante focadas na micropropagação de plantas e são essas atividades que se descrevem a seguir.

Realizámos alguns tipos de meios para multiplicação e enraizamento para diversas espécies, tais como castanheiro, medronheiro e de mirtilo, e, como exemplo, apresentamos a preparação de 1 litro de meio da formulação de Murashige e Skoog (1962), preparada a partir de soluções stock previamente formuladas:

Para 1 litro de solução era necessário:

-100 ml de macronutrientes (consistia numa solução de CaCl₂, KH₂PO₄ e MgSO₄), KNO₃ e NH₄NO₃

-10 ml de micronutrientes (consistia numa solução de ZnSO₄.7H₂O, H₃BO₃, MnSO₄.H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, CoCl₂.6H₂O, CuSO₄.5H₂O e KI)

-10 ml Ferro na forma sódica (que consistiam FeNaEDTA)

-10 ml Inositol

(figura 3)

Vitaminas – 1ml de cada

-Tiamina

-Piridoxina

-Acido nicotínico

-Glicina

-Pantotenato de Ca

As hormonas ou reguladores de crescimento eram adicionados consoante a formulação definida para a espécie

-30 g Sacarose

-7g Agar

pH= 5,7-5,8

Para medir a parte líquida de grande volume usávamos uma proveta desde 1 litro até 100 ml. A parte pequena de pequeno volume usávamos uma pipeta. A pesagem era feita num gobelé de pequenas dimensões em cima de uma balança e quando era usado e ficavam ainda resíduos no mesmo era deitado água destilada para remover e depois adicionava água destilada a todos os ingredientes para dar até 1 litro.

De seguida todos os ingredientes iam para dentro de um balão erlenmeyer, normalmente fazíamos de 3 litros, de seguida media-se o pH para ajustá-lo e caso tivesse a mais ou a menos era adicionado NaOH para aumentar ou HCl para diminuir (figura 4), depois disso tudo estar concluído era metido numa placa térmica a 100 °C e com um íman por dentro para que o seu interior ficasse todo homogéneo e dissolvesse o agar (figura 5).

Após a dissolução do agar, a solução era distribuída usando uma bomba peristáltica (figura 6) de laboratório para que todos os copos ou tubos de ensaio tivessem a mesma quantidade de meio (figura 7).

No final todos os copos ou tubos de ensaio que eram tapados e colocados em autoclave, onde eram esterilizados a 1atm, 120 °C e durante 15 minutos.

4.2 Multiplicação

Durante os trabalhos não realizei a fase de estabelecimento dos explantes primários tendo usado explantes já estabelecidos e em multiplicação a partir de populações stock.

Todas as manipulações do material vegetal eram realizadas na câmara de fluxo laminar (figura 8), sobre caixas de Petri esterilizadas por calor seco, e antes de iniciar as manipulações as câmaras de fluxo laminar eram ligadas 30 minutos antes com luz ultravioleta e desinfetadas com álcool a 70%. Os utensílios de corte e manuseamento (figura 9) eram esterilizados em esterilizador de bancada a uma temperatura de 250 °C durante 10s.

4.3 Enraizamento

O enraizamento foi realizado em catos e o substrato usado foi uma mistura de perlite mais turfa com uma porção de 2:1, normalmente este substrato é esterilizado no autoclave, e o procedimento é já feito em condições não asséticas. Dada a natureza das culturas desta espécie os aglomerados de catos foram divididos por 8 porções onde cada porção ficou num vaso com o substrato e de seguida os catos foram colocados numa sala bioclimática para enraizamento e aclimatização (figura 10).

4.4 Stock

Regularmente verificávamos as condições e o estado de desenvolvimento das culturas e plantas nas salas bioclimáticas de maior dimensão onde tivemos de contar um a um para ver quantos havia por espécie (figura 11) e ao mesmo tempo fazíamos uma limpeza removíamos as plântulas que estavam infetadas por fungos ou bactérias, as plantas com fungos era eliminadas e algumas plantas com bactérias eram guardadas para posterior identificação.

4.5 Limpeza do canteiro e arrumação da estufa

Procedemos também a limpezas de espaços exteriores de um canteiro com margaridas laranjas, e outras espécies (figura 12).

Na estufa de campo efetuávamos trabalhos diversos de manutenção e limpeza de plantas nas bancadas, remoção de plantas mortas, transplantes de plantas para vasos e sacos e controlo de humidade nos substratos, bem como limpeza da estufa no geral.

5 Higiene e segurança no trabalho

É obrigatório trabalhar em condições assépticas na parte da manipulação de espécies em micropropagação. O Laboratório assegura as condições necessárias para evitar qualquer tipo de contaminação possível.

Os resíduos de material de vidro são colocados em contentores próprios para futura recolha.

Os utilizadores do laboratório estão protegidos pelo uso de bata e quando necessário em cada atividade, terão de usar equipamento adequado (luvas, máscara, óculos,...)

O Material de Laboratório é desinfetado e esterilizado sempre que necessário, principalmente quando se faz a repicagem.

Conclusão

Face aos objetivos traçados no meu plano de trabalho individual considero que todos foram cumpridos adequadamente, uma vez que no estágio realizei diversas atividades de áreas distintas e todas essas atividades foram realizadas com sucesso, embora durante um período bastante curto devido às contingências impostas pela pandemia COVID19.

Todos os aspetos foram positivos, uma vez que o estágio foi muito positivo, contribuiu imenso para a minha formação profissional, gostei e achei interessante a realização de todas as diferentes atividades realizadas. Consegui realizar de forma correta todas as atividades que me foram propostas e adquiri vários conhecimentos com tudo o que realizei.

Contribuiu também para a minha formação profissional porque permitiu ter uma ideia do que é, e como funciona um centro de biotecnologias de plantas.

Gostava de ter acabado por completar o meu estágio, mas infelizmente teve um curto duramente, caso para o ano as coisas estejam melhores não importava de ir la de vez enquanto ajudar.

Bibliografia

- Bardine, R. (s.d.). *Flor*. Obtido de coladaweb:
<https://www.coladaweb.com/biologia/botanica/flor>
- Duque, N. (25 de Fevereiro de 2019). *Gimnospermas*. Obtido de Estudopratico:
<https://www.estudopratico.com.br/gimnospermas/>
- Schultz, S. T. (s.d.). *Reproduction in Plants*. Obtido de biologyreference.com:
<http://www.biologyreference.com/Re-Se/Reproduction-in-Plants.html>
- Zavattieri, A. (2002). *BIOTECNOLOGIA VEGETAL* . Obtido de home.uevora:
<http://home.uevora.pt/~zavattieri/Micropropaga%E7%E3o.pdf>
- Gonçalves, J.C. (2020). Apontamentos das aulas da UC de Biotecnologia Vegetal I. Escola Superior Agrária de Castelo Branco.
- IAPTC (1985). Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. Newsletter, 45:15-22.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.

Anexos



Figura 3 Uns dos componentes do meio da formulação de murashige e Skoog



Figura 4 Medidor de ph com as soluções de NaOH e HCl



Figura 5 Solução com um íman numa placa térmica



Figura 6 Bomba peristáltica



Figura 7 Tubos de ensaio com a mesma quantidade de solução em cada um



Figura 8 Camara de fluxo laminar

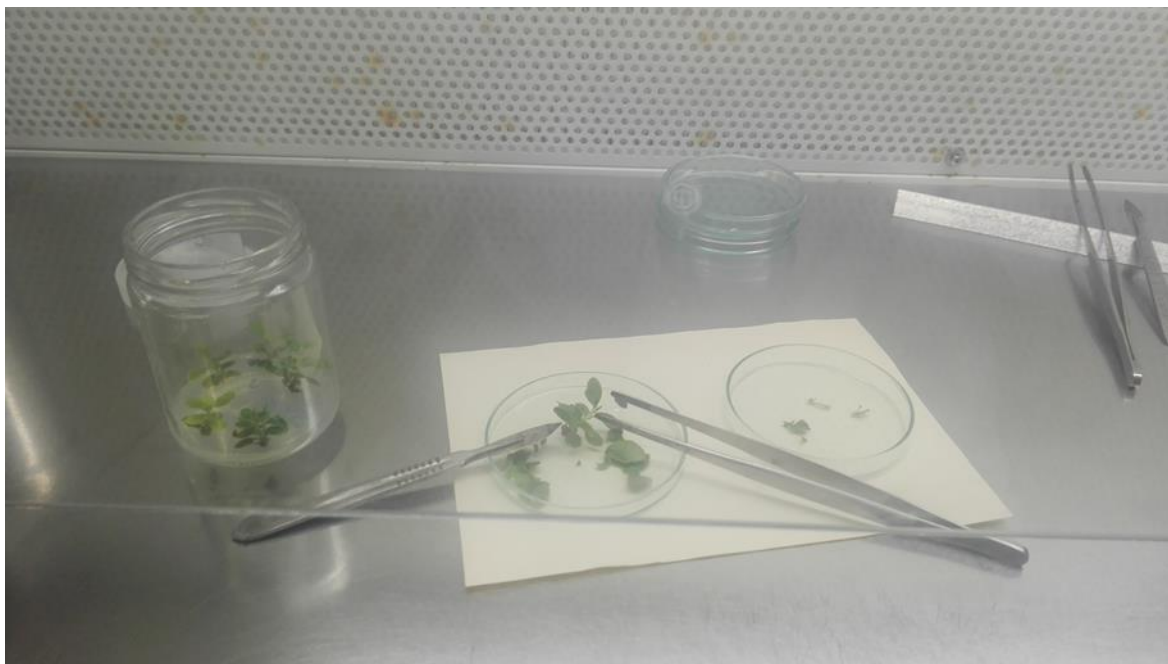


Figura 9 Material de manuseio usado na repicagem



Figura 10 Enrizamento dos cactos na sala bioclimática

Castanheiro		Mirtilo	Gengibre	Batata Doce	Tamarinho	Feijoa				Figo India	NOBIS	Figo P.Mel	
M2	M3					WPM 1BAP	MS001	99	MS1 BAP				
288	261	60	22	43	18	6	6	6	2	1	1	1	
E0	E1	E2	E4	E5	Malcata	Camarinha			(0)2 Orvalho	(0)1 Gardunha	AM8	AM7	AM12
					(0)2	(0)3	02/nov	25/nov					
5	3	4	1	4	72	46	18	55	9	22+1	2	2	59
Aloe Vera	Salicórnica	Framboesa	Sorbus	Erva Loba	Maracujá	Medronheiro							
						1	2	3	4				
70	19	17	16	8	7	68	68	80+12	27				

Figura 11 Espécies e a quantidade que estão presentes na sala bioclimática



Figura 12 Após a limpeza do canteiro das margaridas