

# **Acompanhamento de diferentes práticas desenvolvidas em estufa/viveiro de plantas e laboratório, no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior**

Dairine Maria Monteiro Tavares

## **Orientadores:**

Prof<sup>a</sup> Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa

Doutor David Passos Morgado Franco Frazão (Orientador Externo)

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Agronomia, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa, Professor Adjunto do Instituto Politécnico de Castelo Branco e do Doutor David Passos Morgado Franco Frazão pelo Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

**Setembro 2024.**



## Agradecimentos

Em especial ao Doutor David Franco Frazão pela orientação nos trabalhos desenvolvidos no Centro de Biotecnologia da Beira Interior (CBP-BI) e também à Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa, por ter aceite orientar o meu trabalho de estágio e também por todo o apoio prestado quer neste período de estágio, quer ao longo da licenciatura.

À equipa do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, pela disponibilidade, apoio e conhecimentos transmitidos: Diretor José Carlos Gonçalves, David Frazão (Orientador Externo).

À minha família por todo o incentivo e apoio incondicional que me deram ao longo de todo o meu percurso académico, bem como por terem estado presentes tanto nos bons, como nos momentos mais complicados.

Aos meus amigos, pela sua amizade, companheirismo e por se terem mostrado sempre disponíveis em ajudar.

A todos, que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!



## Resumo

Os trabalhos práticos desenvolvidos foram realizados no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI), situado no Campus da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB), tratando-se de uma infraestrutura do Sistema Científico e Tecnológico Nacional.

O objetivo deste trabalho assenta no estudo e acompanhamento de diferentes práticas desenvolvidas em estufa/viveiro de plantas e laboratório, no CBP-BI.

Primeiramente é abordado o conceito de propagação de plantas e quais os seus tipos: Propagação sexuada/seminal e Propagação assexuada/vegetativa.

Foi desenvolvido um trabalho prático que consistiu na propagação de Manjerona (*Origanum majorana* L.), através do método de propagação vegetativa por estacaria utilizando estacas herbáceas terminais de 5 a 10cm de comprimento. Depois seguiu-se o processo de repicagem, que consistiu no transplante das plântulas dos tabuleiros de cunetas para vasos, de modo a proporcionar um melhor desenvolvimento e enraizamento.

Também foi feita uma caracterização da planta de Manjerona e identificação dos seus principais usos, sendo esta planta medicinal, condimentar e aromática.

Outro trabalho prático desenvolvido consistiu na micropropagação de Pitaya (*Hylocereus undatus* L.), das variedades 06 (Pitaya Royal Red) e 07 (Pitaya Jindu N<sup>o</sup>1), fazendo também referência ao meio de cultura utilizado para esta espécie, ao modo de preparação e desinfeção dos explantes retirados da planta-mãe para depois ser micropropagada e estabelecida *in vitro*.

Determinadas atividades são desenvolvidas diariamente na estufa/viveiro do CBP-BI para a sua gestão e manutenção, como limpeza do espaço, irrigação das plantas, podas, controlo do crescimento das plantas, remoção das plantas secas e reutilização do substrato existente nos vasos destas mesmas plantas.

Também foi realizado um trabalho prático referente ao Projeto Cultivar, um projeto de investigação sobre a Esteva (*Cistus ladanifer* L.), cujo principal objetivo é atribuir valor para esta planta, sendo estudados e analisados vários aspetos relevantes.

## Palavras chave

Esteva, Manjerona, Micropropagação, Pitaya, Repicagem.



## Abstract

The Plant Biotechnology Centre of Beira Interior (CBP-BI), a facility of the National Scientific and Technological System, is situated on the campus of the Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB), where the developed practical work was conducted. The aim of this project is to investigate and track various methods created in a lab and greenhouse at CBP-BI. First, the terms "plant propagation" and "asexual/vegetative" and "sexual/seminal" propagation are discussed.

A practical work was created that involved using terminal herbaceous cuttings, measuring 5 to 10 cm in length, to propagate marjoram (*Origanum majorana* L.) through vegetative propagation. The next step was the transplanting procedure, which involved moving the seedlings from their trays into pots for improved roots and development. The marjoram plant, which serves as an aromatic, condiment, and medicinal herb, was also described and its primary use noted.

Pitaya (*Hylocereus undatus* L.) varieties 06 (Pitaya Royal Red) and 07 (Pitaya Jindu Nº1) were the subject of another practical work that was developed. This work also included information about the culture medium used for this species and the process of preparing and disinfecting the explants that were taken from the mother plant in order to be micropropagated and established in vitro.

Certain activities are carried out daily in the CBPBI greenhouse/nursery for its management and maintenance, such as cleaning, watering, pruning, managing plant development, eliminating dry plants, and reusing substrate in the pots of the same plants. Additionally, practical work was done in connection with the Cultivar Project, a study on the rockrose (*Cistus ladanifer* L.) with the primary goal of valuing this plant by examining and analyzing a number of pertinent factors.

## Keywords

Rockrose, Marjoram, Micropropagation, Pitaya, Transplanting.



# Índice geral

1	Introdução.....	1
2	Propagação de plantas.....	2
2.1	Introdução .....	2
2.2	Propagação vegetativa da Manjerona ( <i>Origanum majorana</i> L.) .....	5
2.2.1	Importância da Manjerona .....	5
2.2.2	Trabalho prático desenvolvido- método .....	6
2.3	Micropropagação da Pitaya ( <i>Hylocereus undatus</i> L.) .....	8
2.3.1	Importância da Pitaya.....	8
2.3.2	Trabalho prático desenvolvido- método.....	9
3	Gestão e manutenção da Estufa/viveiro do CBP-BI .....	13
3.1	Importância de uma Estufa .....	13
3.2	Trabalho prático desenvolvido- método.....	13
4	Acompanhamento de um projeto de investigação sobre a Esteva ( <i>Cistus ladanifer</i> L.) .....	14
4.1	Importância da Esteva .....	14
4.2	Trabalho prático desenvolvido- método.....	15
5	Considerações finais.....	19
6	Referências Bibliográficas.....	20

## Índice de figuras

<b>Figura 1-</b> Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI).....	1
<b>Figura 2-</b> Estufa/viveiro.....	1
<b>Figura 3-</b> Manjerona ( <i>Origanum majorana</i> L.) (A); Flores da manjerona agrupadas em inflorescências (B).....	6
<b>Figura 4-</b> Manjeronas em tabuleiros de cuvetes (A); Manjeronas transplantadas para vasos (B).....	7
<b>Figura 5-</b> Mistura de Turfa e Perlite.....	8
<b>Figura 6-</b> Diferentes tipos de pitaya.....	8
<b>Figura 7-</b> Constituintes do meio de cultura da Pitaya ( <i>Hylocereus undatus</i> L.).....	9
<b>Figura 8-</b> Pitaya variedade 06-Royal Red.....	10
<b>Figura 9-</b> Pitaya variedade 07- Jindu N <sup>o</sup> 1.....	10
<b>Figura 10-</b> Meristema da planta-mãe.....	10
<b>Figura 11-</b> Explantes da planta-mãe.....	10
<b>Figura 12-</b> Corte em V nos explantes.....	12
<b>Figura 13-</b> Colocação dos explantes no meio de cultura.....	12
<b>Figura 14-</b> Câmara de fluxo laminar horizontal (CFL).....	12
<b>Figura 15-</b> Câmara de crescimento/sala de cultura.....	13
<b>Figura 16-</b> Câmara de aclimatização.....	13
<b>Figura 17-</b> Interior da Estufa do CBP-BI.....	14
<b>Figura 18-</b> Esteva ( <i>Cistus ladanifer</i> L.).....	15
<b>Figura 19-</b> Campo de ensaio do Projeto Cultivar.....	15
<b>Figura 20-</b> Separação das cápsulas, biomassa lenhosa e biomassa herbácea.....	16
<b>Figura 21-</b> Estufa de secagem utilizada no trabalho para secar o material vegetal....	16
<b>Figura 22-</b> Cápsulas de esteva.....	17
<b>Figura 23-</b> Sementes de esteva.....	17





# 1 Introdução

O presente trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI) (Figura 1), tratando-se de uma infraestrutura do Sistema Científico e Tecnológico Nacional.

A propagação vegetativa é uma técnica importante para a multiplicação de plantas, pois auxilia a manter as características desejáveis da planta-mãe e proporciona uma maior homogeneidade nas culturas, além de reduzir o período juvenil, sendo um aspeto extremamente importante para certas espécies (Scalon, *et al.*, 2003).

O método de propagação da Manjerona (*Origanum majorana* L.) utilizado no trabalho desenvolvido na Estufa do CBP-BI foi através de macropropagação, pelo método da estacaria, usando estacas herbáceas terminais de 5 a 10cm de comprimento, realizando um corte na diagonal sob o nó.

Relativamente à micropropagação da Pitaya (*Hylocereus undatus* L.), as variedades utilizadas no trabalho desenvolvido foram as variedades 06-Royal Red e 07-Jindu Nº1.

Na estufa do CBP-BI foi realizado o corte na planta-mãe, no local do meristema com auxílio de um bisturi previamente desinfetado. Os explantes que foram cortados da planta-mãe, foram estabelecidos *in vitro* no respetivo meio de cultura na Câmara de fluxo laminar horizontal, presente no laboratório do CBP-BI.

Quanto à gestão e manutenção da Estufa/viveiro do CBP-BI (Figura 2) foram realizadas diariamente diversas atividades, sendo elas essenciais para o correto desenvolvimento das plantas e também para uma boa higiene e segurança do local de trabalho.

Também foi acompanhado um projeto de investigação sobre a esteva (*Cistus ladanifer* L.), de nome Projeto Cultivar. Os principais objetivos deste projeto consistem em atribuir valor aos subprodutos da Esteva, metodologias mais eficientes na extração da resina, inovação no desenvolvimento de produtos alimentares à base de farinha de sementes de esteva. Este projeto também permite avaliar as características nutricionais das sementes de esteva, para alimentação humana, bem como também as características nutricionais das cápsulas de esteva (sem sementes), para alimentação animal.



Figura 1- Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI).



Figura 2- Estufa/viveiro.

## 2 Propagação de plantas

### 2.1 Introdução

A propagação de plantas é a capacidade de uma planta se reproduzir e deixar descendentes. Uma planta pode propagar-se de duas formas possíveis: via sexuada/seminal (através de sementes) ou assexuada/vegetativa (através de partes vegetativas) (Ribeiro, 2021).

#### **Propagação sexuada/ seminal**

##### **Vantagens:**

- Fácil transporte;
- Plantas vigorosas;
- Frequente isenção de viroses (Ribeiro, 2021).

#### **Propagação assexuada/ vegetativa**

##### **Vantagens:**

- Manutenção das características (cor da folhagem, qualidade do fruto, entre outras);
- Propagação de plantas sem semente;
- Abreviar período juvenil (produção do fruto mais cedo);
- Controlo de doenças;
- Pode ser mais económico, pois permite obter o fruto mais cedo;
- Permite obter homogeneidade (plantas de um pomar a entrar em produção no mesmo ano e altura do ano) (Ribeiro, 2021).

Ao conjunto de plantas obtidas através de propagação vegetativa a partir da mesma planta -mãe dá-se o nome de clone (Ribeiro, 2021).

#### **Métodos de propagação vegetativa:**

- **Macropropagação**
  - Estacaria;
  - Mergulhia;
  - Enxertia.
  
- **Micropropagação/ cultura de tecidos**
  - Rebutamento axilar;
  - Organogénese direta;
  - Organogénese indireta (Ribeiro, 2021).

## **Estacaria**

Método de propagação vegetativa que consiste no plantio de pequenas estacas de raízes, caule ou folhas provenientes de uma planta-mãe, para tabuleiros de cunetas ou outros recipientes contendo um substrato húmido de modo a proporcionar um bom desenvolvimento e rizogénese da estaca (Ribeiro, 2021).

### **Fatores que afetam o enraizamento:**

- **Material vegetal**

- Estado de maturação da planta-mãe (as plantas mais jovens enraízam melhor);
- Posição na planta;
- Condições fisiológicas da planta-mãe;
- Época do ano.

- **Tratamento das estacas**

- Reguladores de crescimento (AIB, ANA, ...);
- Tratamentos fúngicos.

- **Condições ambientais**

- Temperatura;
- Temperatura da base da estaca;
- Humidade;
- Substrato de enraizamento;
- Fotoperíodo;
- Luz.

(Ribeiro, 2021).

## **Micropropagação**

A micropropagação consiste na produção de milhares de clones de uma planta a partir de uma única célula vegetal somática ou de um pequeno pedaço de tecido vegetal (explante) (Ribeiro, 2021).

### **Vantagens:**

- Produz plantas livres de doenças;
- Conservação de plantas certificadas e dos recursos genéticos (germoplasma);
- Fecundidade muito elevada, pelo que se obtêm milhares de plantas, enquanto que através das técnicas convencionais se conseguem apenas entre dezenas a centenas de plantas no mesmo período de tempo;
- Trata-se do único método viável para a regeneração das células geneticamente modificadas e para células resultantes da fusão de protoplastos;
- Bom método de multiplicar plantas que não produzam sementes ou que apenas produzam em quantidades pouco lucrativas;
- Produção e extração de substâncias químicas de grande valor comercial.

(Ribeiro, 2021).

### **Desvantagens:**

- Conhecimentos técnicos e equipamentos muito especializados e onerosos;
- Requer habilidade e destreza nas operações;
- A fase de transferência para o solo é crítica para a sobrevivência (a planta é pequena, não é autotrófica e é muito suscetível às perdas de água);
- Perigo de produção de mutações genéticas e de variação somaclonal.

(Ribeiro, 2021).

### **Fases da micropropagação:**

- Fase 0- Seleção da planta-mãe e preparação;
- Fase 1- Estabelecimento em cultura asséptica;
- Fase 2- Produção de propágulos;
- Preparação para o crescimento em ambiente natural (aclimatização);
- Transferência para o ambiente natural.

(Ribeiro, 2021).

## 2.2 Propagação vegetativa da Manjerona (*Origanum majorana* L.)

### 2.2.1 Importância da Manjerona

A Manjerona (*Origanum majorana* L.) (Figura 3), é uma planta perene cespitosa que possui 30 a 60 cm de altura, pertence à família Lamiaceae, cujo centro de origem é a região do Mediterrâneo e Médio Oriente (Castro & Ramos, 2003).

Os seus caules são eretos, quadrados e ramificados. As folhas são simples, opostas, pequenas, ovais ou elípticas, de cor verde acinzentada, peludas na página inferior e lisas na superior. As suas flores são pequenas, com cores que variam do branco ao rosa (Castro & Ramos, 2003) agrupadas em inflorescências (Ruppelt, *et al.*, 2015).

Popularmente é conhecida como manjerona, manjerona doce e manjerona verdadeira (Castro & Ramos, 2003; Ruppelt, *et al.*, 2015), pertencente à mesma família de outras plantas medicinais, aromáticos e espécies condimentares, como poejo (*Mentha pulegium* L.), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), hortelã (*Mentha sp.*), orégão (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (Lorenzi & Matos, 2002).

Trata-se de uma planta aromática, medicinal e usada na culinária. Possui propriedades medicinais, sendo normalmente indicada para auxiliar no tratamento de problemas digestivos, sendo também usada para aliviar os sintomas de estresse e ansiedade, pois é rica em timol, carvacrol, terpineno, limoneno, taninos e flavonoides, com propriedades anti-inflamatórias, digestivas e calmantes.

A espécie é muito utilizada no tratamento de doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), devido ao seu efeito antiepiléptico e sedativo (Sales, *et al.*, 2020).

As propriedades biológicas antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes do extrato da manjerona têm despertado o interesse de pesquisadores e também da indústria alimentar, pois podem atuar como inibidores microbianos, bem como alternativas aos aditivos.

Freire, *et al.* (2011) constataram através de testes *in vitro* que o óleo essencial de *Origanum majorana* L. possui efeito inibitório sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Souza, *et al.* (2010) observaram que os óleos essenciais de *Origanum sp.* possuem um potencial para controlar doenças patogênicas, fungos e a ocorrência de micoses. Além disso, os seus compostos bioativos foram testados em frutos pós-colheita, com o objetivo de controlar e reduzir a ocorrência de doenças (Cruz, *e outros*, 2010).

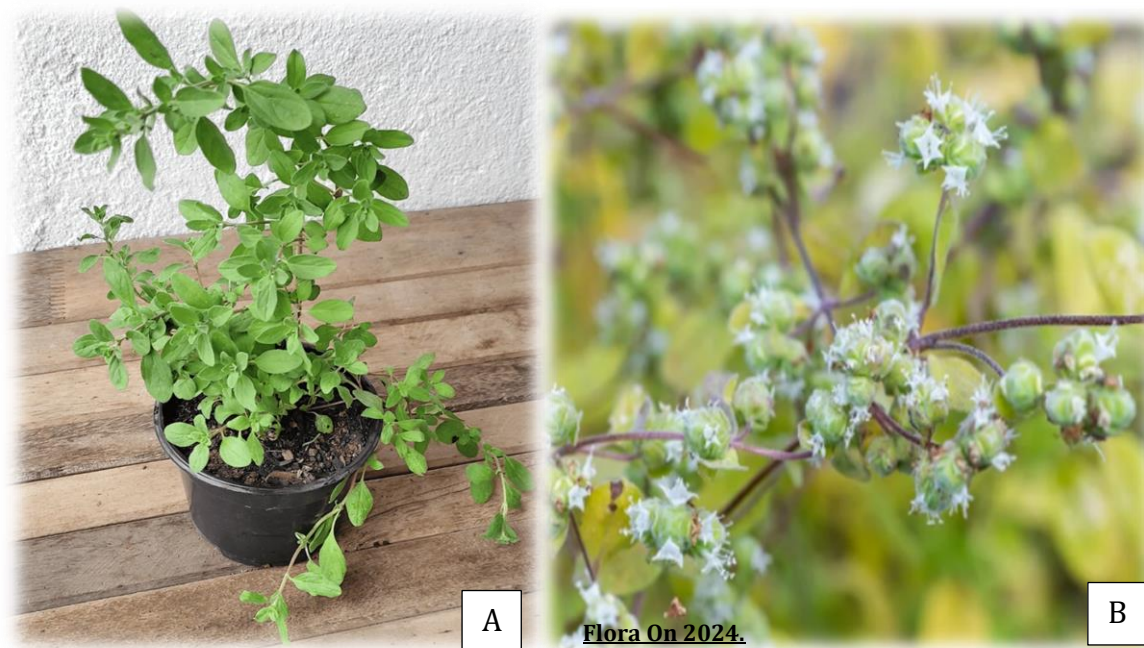


Figura 3- Manjerona (*Origanum majorana* L.) (A); Flores da manjerona agrupadas em inflorescências (B).

### 2.2.2 Trabalho prático desenvolvido- método

A propagação vegetativa é uma técnica importante para a multiplicação de plantas, pois auxilia a manter as características desejáveis da planta-mãe e uma maior homogeneidade nas culturas, além de reduzir o período juvenil, que é um aspecto extremamente importante para certas espécies (Scalon, *et al.*, 2003).

O método de propagação utilizado no trabalho desenvolvido na Estufa do CBP-BI foi através de macropropagação, pelo método da estacaria, usando estacas herbáceas terminais de 5 a 10cm de comprimento, realizando um corte na diagonal abaixo do nó.

Estas estacas foram de seguida colocadas em tabuleiros de cuvetes contendo uma mistura de turfa e perlite, sendo depois irrigadas. As estacas são regularmente irrigadas, de modo a promover o enraizamento.

Este método de propagação é o mais utilizado e viável na manjerona, pois representa um processo rápido e de baixo custo, permitindo a colheita de um grande número de explantes de algumas plantas matrizes (plantas-mãe) que são amplamente utilizadas para a formação de novas plantas a vir a ser utilizadas como benefícios medicinais e ornamentais (Hartmann, *et al.*, 2002).

Através do uso de explantes como materiais vegetais, é uma forma eficiente e prática de propagação de novas plantas, consistindo na remoção de segmentos da planta mãe com pelo menos um calo de meristema capaz de formar raízes adventícias (Hartmann, *et al.*, 2002; Signor, *et al.*, 2007).

No entanto, o enraizamento da estaca é influenciado tanto por características endógenas (características inerentes à espécie) quer por fatores exógenos (condições ambientais). A capacidade rizogénica da estaca varia entre espécies e até mesmo entre cultivares e também depende do meio ambiente (Signor, *et al.*, 2007).

### **Repicagem**

A repicagem é uma técnica utilizada para produção de plantas após enraizamento em inúmeras culturas. Consiste na transferência das plântulas para o local definitivo, que tanto pode ser o campo de plantio como vasos, por exemplo.

No trabalho desenvolvido, desde o processo de Estacaria passou 1 a 1,5 meses até ao processo de repicagem. A repicagem foi realizada para vasos. Foram retiradas as plântulas dos tabuleiros de cusetes e transplantadas para vasos (Figura 4), contendo estes uma mistura de turfa (substrato orgânico) e perlite (substrato mineral) (Figura 5). Esta mistura deve encontrar-se húmida e à capacidade de campo, para que a plântula continue adequadamente o seu enraizamento e desenvolvimento.

Depois da repicagem, procedesse à sua irrigação através de uma mangueira com controlo de pressão e também através de aspersores para a realização de rega por nebulosidade, que se encontram programados para irrigar as plantas de modo automático por um período de tempo determinado.

O objetivo da repicagem é fornecer condições adequadas e melhores para que a planta continue o seu enraizamento e desenvolvimento.



Figura 4- Manjeronas em tabuleiros de cusetes (A); Manjeronas transplantadas para vasos (B).



Figura 5- Mistura de Turfa e Perlite.

## 2.3 Micropropagação da Pitaya (*Hylocereus undatus* L.)

### 2.3.1 Importância da Pitaya

A pitaya (Figura 6) também designada fruta-do-dragão, é o fruto da família Cactaceae do género *Hylocereus*, sendo nativa de regiões da América Central e México.

É uma fruta tropical, de sabor suave e doce, que possui vários benefícios para a saúde, podendo favorecer a perda de peso e combater doenças como osteoporose, anemia, alterações cardíacas e gastrointestinais. Os benefícios da pitaya estão relacionados com o seu alto poder antioxidante, já que é rica em polifenóis, minerais e vitaminas, que são importantes para proteger o organismo.

Existem 3 variações de cor da fruta (Figura 6): a pitaya vermelha (polpa vermelha e casca vermelha), a pitaya amarela (polpa branca e casca amarela) e existe a pitaya branca (polpa branca e casca rosa). A cor da polpa varia de acordo com a quantidade de antioxidantes, de forma que a pitaya vermelha contém maior quantidade de antioxidantes do que a pitaya amarela ou branca.



Figura 6- Diferentes tipos de pitaya.

### 2.3.2 Trabalho prático desenvolvido- método

#### Meio de cultura

Para se estabelecer e multiplicar uma espécie utilizam-se meios de cultura, sendo que espécies diferentes necessitam de meios de cultura diferentes e específicos. Um dos meios que é mais utilizado na micropropagação trata-se do meio de cultura Murashige e Skoog (MS) 1962.

O meio de cultura a usar deve ser estabelecido de acordo com as exigências nutricionais específicas de cada espécie, devendo este conter todos os nutrientes necessários para o correto crescimento e desenvolvimento dos explantes, tais como micronutrientes, macronutrientes, aminoácidos, vitaminas, inositol, agar-agar, fonte de carbono (sacarose ou frutose) e a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura para permitir obter as respostas desejadas, sendo também necessário a otimização do pH (Ribeiro, 2021.).

Os constituintes existentes no meio de cultura utilizado para estabelecer *in vitro* as Pitayas encontram-se representados em seguida (Figura 7):

**MS 000 + 000 + 1,5 BAP + 0,5 NAA + 0,5 Kin**

**pH= 5,8**

Macronutrientes= 50

KNO<sub>3</sub>= 50

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>= 50

Micronutrientes= 5

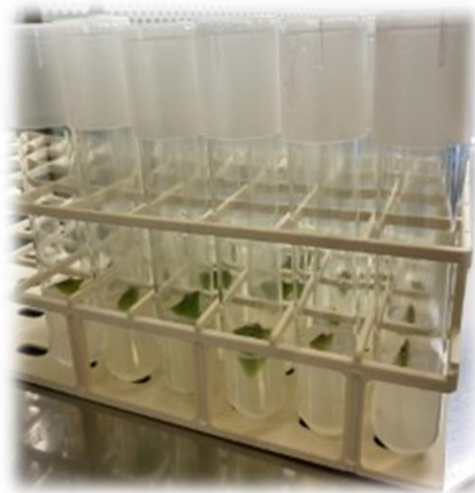
Inositol= 5

Fe= 5

Vitaminas:

Tiamina=0,05

Piridoxina= 0,25



Ácido nicotínico= 0,25

Glicina= 1

Horm: BAP= 0,75

NAA= 0,25

Kin= 0,25

Sacarose= 15

Agar-agar= 3,5

Figura 7- Constituintes do meio de cultura da Pitaya (*Hylocereus undatus L.*)

### **Estabelecimento *in vitro* de Pitaya**

As variedades de Pitaya (*Hylocereus undatus* L.) utilizadas no trabalho desenvolvido foram as variedades 06-Royal Red (Figura 8) e 07-Jindu N°1 (Figura 9).

Na estufa do CBP-BI foi realizado o corte na planta-mãe, no local do meristema (Figura 10) com auxílio de um bisturi previamente desinfetado. Os explantes que foram cortados da planta-mãe (Figura 11), foram estabelecidos *in vitro* no respectivo meio de cultura na Câmara de fluxo laminar horizontal, presente no laboratório do CBP-BI.



Figura 8- Pitaya variedade 06-  
Royal Red.



Figura 9- Pitaya variedade 07-  
Jindu N°1.



Meristema  
da planta-mãe

Figura 10- Meristema da planta-mãe.



Figura 11- Explantes da planta-mãe.

Antes da realização da micropropagação é necessário um processo de desinfecção dos explantes de Pitaya (material vegetal a micropropagar).

A desinfecção dos explantes decorre do seguinte modo:

- Permeabilização da zona do corte com parafina;
- Deixar repousar na água corrente por 25min;
- Deixar os explantes em álcool 70% durante 1 min;
- Deixar os explantes em fungicida 0.5g/L por 10 min;
- Colocar os explantes em bicloreto de mercúrio Tween 20 por 10min;
- 3 passagens por água destilada estéril.

### **Repicagem para o meio de cultura**

Após a devida desinfecção do material vegetal, é realizado um corte em V nos explantes (Figura 12) dentro da câmara de fluxo laminar horizontal, de modo que cada segmento resultante contenha um meristema. Cada segmento resultante é colocado no meio de cultura em tubos de ensaio (Figura 13), de modo que o meristema se situe fora do meio de cultura e o restante no interior deste.

Todo o processo de repicagem para o meio de cultura é realizado na Câmara de fluxo laminar (Figura 14), em condições assépticas.

**O material utilizado na repicagem** foi o seguinte:

- Câmara de fluxo laminar horizontal (CFL);
- Placas de petri;
- Bisturi e pinças;
- Algodão;
- Álcool 70%;
- Esterelizador de esferas;
- Tubos de ensaio.
- 

**Os procedimentos realizados na repicagem** foram os seguintes:

- É necessário ligar os UV e esterelizador 30 min. Para desinfecção, antes de iniciar o trabalho;
- Desligar os UV e ligar o fluxo;
- Desinfetar a CFL com álcool e algodão;
- Esterelizar os bisturis e pinças no esterelizador de esferas a 250°C;
- Desinfetar com álcool a 70% os tubos de ensaio que contêm o meio de cultura;
- Com auxílio de um bisturi realizar um corte em V nos explantes da planta-mãe, de modo que cada fragmento cortado possua um meristema;

- Com a pinça, colocar os fragmentos em forma de V nos tubos de ensaio que contêm o meio de cultura, de modo que o meristema fique situado fora do meio de cultura e o restante material vegetal fique dentro do meio de cultura.

Depois de realizado o processo de repicagem, a planta é conduzida para a Câmara de crescimento/sala de cultura (Figura 15), local onde se vai desenvolver em condições de temperatura controlada.

Durante a multiplicação a planta vai desenvolvendo raízes aéreas que podem ser usadas para transferência em substrato e aclimatização na Câmara de aclimatização (Figura 16). A aclimatização da maioria das espécies trabalhadas com desenvolvimento de raiz in vitro:

- os rebentos são colocados em caixas de poliestireno expandido de 60x40x20 cm com substrato de turfa:perlite (1:2, v:v) humedecido a 70% com solução nutritiva de  $\frac{1}{2}$ MS  $\frac{1}{4}$ N03 (pH 5,7) e esterilizado a 121 °C durante 30 min.
- os rebentos permanecem durante 4-6 semanas sob intensidade luminosa de 150  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas com redução gradual da humidade relativa.

Mais tarde seguem para a estufa, para entrarem em contacto com as condições ambientais naturais.



Figura 12- Corte em V nos explantes.

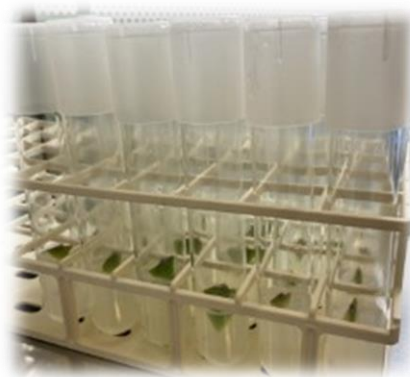


Figura 13- Colocação dos explantes no meio de cultura.



Figura 14- Câmara de fluxo laminar horizontal (CFL).



*Figura 15- Câmara de crescimento/ sala de cultura.*



*Figura 16- Câmara de aclimatização.*

### **3 Gestão e manutenção da Estufa/viveiro do CBP-BI**

#### **3.1 Importância de uma Estufa**

Uma estufa agrícola permite a plantação de qualquer cultura e tem como objetivo evitar que as plantas sofram estresses climáticos, como excesso de chuva e granizo, além de minimizar o ataque de insetos-praga e doenças.

A estufa também mantém a temperatura adequada para o desenvolvimento das plantas, facilitando que cresçam mais rapidamente. São estruturas construídas para criar um ambiente de calor, principalmente, durante os períodos de inverno.

#### **3.2 Trabalho prático desenvolvido- método**

No trabalho desenvolvido no CBP-BI também se procedeu diariamente à manutenção da estufa/viveiro (Figura 17), compreendendo atividades como limpeza do espaço, irrigação das plantas através de uma mangueira de controlo de pressão e também com auxílio de um regador. Existem também na estufa aspersores utilizados para a rega por nebulização, que se encontram programados para irrigar as plantas de modo automático por determinado período de tempo.

Também se procede ao controlo, observação do crescimento das plantas e remoção das plantas secas, sendo reutilizado o substrato que se encontre em bom estado destas mesmas plantas.

Para o correto desenvolvimento das plantas também são realizadas podas, para proporcionar o seu crescimento e desenvolvimento.



Figura 17- Interior da Estufa do CBP-BI.

## 4 Acompanhamento de um projeto de investigação sobre a Esteva (*Cistus ladanifer* L.)

### 4.1 Importância da Esteva

A Esteva (*Cistus ladanifer* L.) é um arbusto perene, bem adaptado ao clima mediterrânico e possivelmente às futuras alterações ambientais. A Esteva possui um potencial económico muito vasto, desde a produção até às aplicações, destacando também atividades biológicas conhecidas de extratos e seus compostos (Raimundo *et al*, 2018).

Em Portugal Continental, concentrado mais a sul, o esteval denso é a quinta tipologia florestal mais dominante, ocupando 249 382ha que representa 7,5% da área florestal, para além de estar também presente nas quatro tipologias florestais mais dominantes que representam cerca de 48,9% da área florestal (Frazão *et al*, 2022).

Atualmente a exploração económica da esteva em Portugal não é muito acentuada, encontrando-se mais concentrada na extração de óleos essenciais e resina lábdano, sendo, estes produtos utilizados principalmente no setor das fragrâncias e perfumaria (Frazão *et al*, 2022).

Também são coletadas evidências sobre a adaptação extrema da Esteva às condições estressantes na região do Mediterrâneo, como a capacidade de sobreviver em condições de baixa exposição hídrica e alta exposição solar condições climáticas, permanência em solos pobres e contaminados (Frazão *et al*, 2018).

## 4.2 Trabalho prático desenvolvido- método

A utilização deste recurso natural pode ser uma solução viável para solos pobres e contaminados, sem necessidade de grandes técnicas agrícolas, pois esta espécie é altamente resistente a pragas, doenças e fatores ambientais extremos. Além disso, esta espécie revela aptidões interessantes que pode ser aplicado às indústrias alimentícia (Frazão *et al*, 2018).

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos trabalhos de investigação que demonstram as várias utilidades deste recurso vegetal e que podem ser geridos integradamente. Destes destacam-se o uso da biomassa herbácea para alimentação animal, o uso da biomassa lenhosa para valorização energética e o uso dos metabolitos secundários para os setores da farmacêutica e cosmética (Frazão *et al*, 2022).

No entanto, existe pouca informação acerca dos frutos de *Cistus ladanifer* L. (Figura 18) que são significativos em estevais com mais de 3 anos de idade, quando a floração é mais notória. Estes frutos consistem em cápsulas lenhosas que contêm cerca de 1000 sementes pequenas poliédricas (1mm). Normalmente, as cápsulas começam a abrir e a libertar sementes no meio do Verão (Frazão *et al*, 2022).

De acordo com estudos etnobotânicos, o consumo humano destas sementes em algumas províncias espanholas era uma realidade sem nenhuma indicação do seu uso inseguro. As sementes costumavam ser consumidas cruas, com um sabor similar a noz, ou usada na confeção de pão e bolos na forma de farinha (Frazão *et al*, 2022).

Na ESACB está a ser realizado um ensaio de proveniências do Projeto Cultivar. Para a realização desse projeto foram utilizadas estevas provenientes de locais diferentes (Figura 19), 8 populações que foram selecionadas ao longo da área de distribuição da esteva e 2 populações locais provenientes de Vila Velha de Rodão e Penha Garcia para comparação, de modo a identificar qual a proveniência da esteva que melhor se adapta às condições mediterrânicas.



Figura 18- Esteva (*Cistus ladanifer* L.).



Figura 19- Campo de ensaio do Projeto Cultivar.

Por cada proveniência selecionaram-se 5 plantas-mãe que deram origem às diferentes famílias do ensaio.

Foram introduzidas bordaduras a envolver o ensaio para acautelar as dinâmicas competitivas. São feitas medições no campo (altura das plantas e os diâmetros cruzados da copa do arbusto).

Durante o processo foram feitas análises destrutivas, com o objetivo do estudo e análise do material vegetal, ou seja, das cápsulas, biomassa lenhosa e biomassa herbácea (Figura 20), bem como para determinar qual o peso verde e em seco, sendo este último determinado após a secagem da biomassa lenhosa, da biomassa herbácea e também das cápsulas, na estufa de secagem a 105°C durante 24h (Figura 21).



Figura 20- Separação das cápsulas, biomassa lenhosa e biomassa herbácea.



Figura 21- Estufa de secagem utilizada no trabalho para secar o material vegetal.

Os **principais objetivos** do projeto são os seguintes:

- Estudos de gestão do esteval espontâneo com vista à produção dos subprodutos a valorizar;
- Metodologias mais eficientes de extração de resina;
- Avaliação das características nutricionais das sementes de esteva, para alimentação humana;
- Avaliação das características nutricionais das cápsulas de esteva (sem sementes), para alimentação animal;
- Inovação e desenvolvimento de um produto alimentar contendo farinha de sementes de esteva.

(Frazão *et al*, 2022).

## Utilidades da esteva

### ➤ Óleo essencial e Resina lábano

A luminosidade extrema provoca danos nas plantas e as plantas da zona mediterrânea, bem adaptadas possuem mecanismos de defesa. A esteva possui um mecanismo de defesa, que se trata da produção de resina, que impede que a luz afete como afetaria outra planta menos resistente. A esteva apresenta sob as suas folhas resina durante o período de Julho a Outubro.

Em geral, os ácidos fenólicos, taninos, favonóides e terpenos estão sempre presentes como principais constituintes químicos dos extratos de *Cistus ladanifer* L.

O óleo essencial e a resina lábano são os produtos mais importantes da esteva por possuírem valor comercial para a indústria da perfumaria e das fragâncias, para produção de produtos cosméticos, como protetores UV e também produtos medicinais.

(Raimundo *et al*, 2018).

Os produtos de *Cistus ladanifer* L. possuem um excelente odor e por isso são utilizados na fabricação de perfumes, cosméticos, sabões, detergentes e desodorantes (Groom 1997; Moyler e Cléry 1997).

Para além disso o óleo essencial também é utilizado como anti-inflamatório, antimicrobiano (Guinoiseau *et al*. 2011; Rossi *et al*. 2007; Vieira e outros. 2017), antioxidante (Amensour *et al*. 2010; Andrade *et al*. 2009; Guimarães *et al*. 2010), antiulcerogênico, antitumoral (Dimas e outros. 1998), vasodilatador e antiespasmódico (Deforce 2006).

O maior rendimento da extração quer do óleo essencial quer da resina lábano é obtido em plantas com idades compreendidas entre 1 a 2 anos.

### ➤ Cápsulas com sementes

O fruto da Esteva trata-se das cápsulas (Figura 22), no interior destas encontram-se as sementes de esteva (Figura 23), que constituem um alimento humano pois possuem características nutricionais equilibradas, nomeadamente proteína, gordura, fibras e são uma fonte de ácido gordo essencial (ómega 3) bem como minerais, como magnésio e potássio.



Flora On 2024.

*Figura 22- Cápsula de esteva.*



Flora On 2024.

*Figura 23- Sementes de esteva.*

➤ **Biomassa verde (não lenhosa/herbácea)**

Biomassa de onde é extraído o óleo essencial e a resina ládano. Pode ser utilizada na alimentação animal especialmente de ruminantes, com benefícios comprovados na qualidade final da carne.

➤ **Biomassa lenhosa**

Biomassa que possui elevado poder calorífico, sendo usada como produção de energia.

**Conclusões sobre a esteva**

Na gestão dos estevais, cortes anuais permitem rendimentos de biomassa verde e resina, enquanto que cortes bianuais favorecem formação de cápsulas com sementes e acumulação de biomassa lenhosa.

Os terrenos constituídos por grandes massas arbustivas de *Cistus ladanifer* L. são limpos, sendo as estevas cortadas principalmente para fins de controle populacional bem como para prevenção de incêndios e também para limpeza de campos agronómicos.

Com a atribuição do valor para a esteva, consegue-se assim um maior controlo nos matos de esteva. A esteva pode ser utilizada para recuperar solos pobres e também solos contaminados com metais pesados.

É principalmente uma fonte importante de pólen de abelha nos países mediterrâneos (Ortiz 1994). É ainda considerado muito importante para o desenvolvimento da colmeia, dado o seu florescimento precoce.

Deste modo estão a ser realizados estudos de investigação sobre a Esteva, tal como o Projeto Cultivar, com o objetivo de atribuir valor comercial para a Esteva, com o intuito de controlo sobre os matos de Esteva, mitigação dos incêndios florestais, realçar e fazer sobressair todo o potencial desta espécie.

## 5 Considerações finais

A elaboração deste trabalho de acompanhamento de várias práticas desenvolvidas na Estufa do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior bem como no seu laboratório, foi bastante produtivo para o aprofundamento de conhecimentos acerca de todos os aspetos retratados ao longo do trabalho.

Foram acompanhados os trabalhos de propagação vegetativa da Manjerona (*Origanum majorana* L.), sendo usado o método de propagação vegetativa da Estacaria.

Foi realizado um trabalho de micropropagação de Pitaya (*Hylocereus undatus* L.), no qual foram selecionadas as plantas-mãe, quer da variedade 06- Pitaya Royal Red, e também da variedade 07- Pitaya Jindu N<sup>o</sup>1, sendo retirados destas alguns explantes.

Os explantes foram desinfetados e preparados, para posterior estabelecimento *in vitro* para tubos de ensaio contendo um meio de cultura específico para a espécie em causa. Todo este procedimento foi realizado em condições assépticas dentro da Câmara de fluxo laminar horizontal (CFL).

Em relação à gestão e manutenção da Estufa/viveiro do CBP-BI foram realizadas diariamente diversas atividades essenciais para o correto desenvolvimento das plantas e também para garantir uma boa higiene e segurança do local de trabalho.

Para além disso foi acompanhado o trabalho de investigação sobre a Esteva (*Cistus ladanifer* L.), a decorrer no CBP-BI, tratando-se de um ensaio de proveniências do Projeto Cultivar, com o objetivo principal de atribuir valor à esteva, visando um controlo sobre os matos de esteva para mitigação dos incêndios florestais e também para realçar e fazer sobressair todo o potencial desta espécie.

Todos os trabalhos elaborados e acompanhados ao longo deste período de Estágio decorreram adequadamente conforme o previsto com o apoio de todos os profissionais envolvidos, contribuindo positivamente para o CBP-BI quer para um desenvolvimento profissional, bem como alargamento dos conhecimentos pessoais.

## 6 Referências Bibliográficas

- Amensour M, Sendra E, Pérez-Alvarez JA, Skali-Senhaji N, Abrini J, Fernández-López J (2010) Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods Hum Nutr* 65:170–178. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0168-2>
- Castro, L. O., & Ramos, R. L. D. (2003). Descrição botânica, cultivo e uso de *Origanum majorana* L., manjerona e de *Origanum vulgare* L., orégano (Lamiaceae). Porto Alegre: FEPAGRO, Circular Técnica 22, 15.
- Cruz, M. J. da S., Clemente, E., Cruz, M. E. da S., Mora, F., Cossaro, L., & Pelisson, N. (2010). Efeito dos compostos naturais bioativos na conservação pós-colheita de frutos de mangueira cv. Tommy Atkins. *Ciênc. Agrotec*, 34(2), 428-433.
- Deforce K (2006) The historical use of ladanum. Palynological evidence from 15th and 16th century cesspits in northern Belgium. *Veg Hist Archaeobot* 15:145–148. <https://doi.org/10.1007/s00334-005-0021-y>
- Dimas K, Demetzos C, Marsellos M, Sotiriadou R, Malamas M, Kokkinopoulos D (1998) Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Med* 64:208–211. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957410>
- Frazão, D.(UTAD/CBPBI); Delgado, F.(IPCB); Rodrigues, A.(IPCB); Peres, F.(IPCB); Pitacas, I.(IPCB); Barroca, C.(IPCB); Paulo, L.(CATAA); Espírito Santo, C.(CATAA) (2022). Valorização da resina, dos frutos e sementes de esteva (*C. ladanifer* L.). Projeto Cultivar.
- Frazão, D.; Raimundo, J.; Domingues, J.; Quintela-Sabarís, C.; Gonçalves, J.; Delgado, F. (2018). *Cistus ladanifer* (Cistaceae): a natural resource in Mediterranean-type ecosystems.
- Freire, J. M., Cardoso, M. G., Batista, L. R., & Andrade, M. A. (2011). Essential oil of *Origanum majorana* L., *Lllicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 13(2), 209-214.
- Groom N (1997) *The new perfume handbook*. Blackie Academic & Professional, London
- Guimarães R, Sousa MJ, Ferreira ICFR (2010) Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Ind Crops Prod* 32:152–156. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.011>

- Guinoiseau E, Lorenzi V, Luciani A, Tomi F, Casanova J, Berti L (2011) Susceptibility of the multi-drug resistant strain of *Enterobacter aerogenes* EA289 to the terpene alcohols from *Cistus ladaniferus* essential oil. *Nat Prod Commun* 6:1159–1162
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. (2002). *Plant Propagation: Principles and Practices*. (7a ed.) New York: Englewood Clippings, p. 880.
- Lorenzi, H., & Matos, F. J. A. (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512.
- Moyler DA, Clery RA (1997) The aromatic resin: their chemistry and uses. In: Swift KAD (ed) *Flavours and fragrances*. Royal Society of chemistry, Great Britain, pp 96–115
- Ortiz PL (1994) The Cistaceae as food resources for honey bees in SW Spain. *J Apic Res* 33:136–144.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.1994.11100861>
- Raimundo, J.; Frazão, D.; Domingues, J.; Quintela-Sabarís, C.; Dentinho, T.; Anjos, O.; Alves, M.; Delgado, F. (2018). Neglected Mediterranean plant species are valuable resources: the example of *Cistus ladanifer*
- Ribeiro, M. (2021). Apontamentos fornecidos pela docente Maria Ribeiro na unidade curricular de Genética e melhoramento - IPCB. Escola Superior Agrária e Instituto Nacional de Investigação Agrária.
- Rossi P-G, Berti L, Panighi J, Luciani A, Maury J, Muselli A, Serra DR, Gonny M, Bolla J-M (2007) Antibacterial action of essential oils from Corsica. *J Essent Oil Res* 19:176–182.  
<https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699254>
- Ruppelt, B. M., Kozera, C., Zonetti, P da C., Paulert, R., & Stefanello, S. (2015). *Plantas medicinais: utilizadas na região oeste do Paraná*. (267), 91.
- Sales, G. B., Alencar, J. B. de, Santos, R. O., Rodrigues Neto, S. da C., Sousa, A. P. de, & Oliveira Filho, A. A. de (2020). *Origanum majorana* como agente ansiolítico em Odontologia: uma revisão literária. *Research, Society and Development*. 9(5).
- Scalon, S. P. Q., Ramos, M. B. M., & Vieira, M do C. (2003). Auxinas e boro no comprimento da maior raiz e número de estacas enraizadas de guaco (*Mikania glomerata Sprengel*), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e carqueja (*Baccharis trimera* Less A. P. D. C) em duas épocas de plantio. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 5(2), 71-76.
- Signor, D., Kowalski, A. P de J., Alves, M.A, Lima, F. I de., & Biase, L. A. (2007). Estaquia herbácea de orégano. *Sci. Agrária*, 8(4), 431-434.
- Souza, N. A. B., Lima, E de O., Guedes, D. N., Pereira, F de O., Souza, E. L de., & Sousa, F. B de. (2010). Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Braz. J. Pharm. Sci.* 46(3).

Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira APS, Mendes Â, da Costa PM, Belo ADF (2017) Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. Chem Biodivers 14(6):e1700006. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700006>

Flora on:

<https://flora-on.pt/#/1cistus+ladanifer>

<https://flora-on.pt/#/1origanum+majorana>