



Estabelecimento de esteva (*Cistus ladanifer* L.) *in vitro* e análise molecular de medronheiro (*Arbutus unedo* L.)

Ana Beatriz dos Santos Barata
20160728

Orientadores

Prof. Doutora Maria Teresa Coelho, do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Prof. Doutora Margarida Ataíde, do Instituto Politécnico de Castelo Branco

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 Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professor Doutora Maria Teresa Coelho, Professor Adjunto e da Professor Doutora Margarida Ataíde, Professor Adjunto do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Outubro de 2021

Este trabalho foi realizado no âmbito dos projetos:

RG-PCMG – “Conservação e Melhoramento Genético Vegetal para o medronheiro (*Arbutus unedo* L.)”, PDR2020-784-042742 RG-PCMG. Projeto cofinanciado pelo FEADER – Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural, através do Acordo de Parceria Portugal 2020, Programa PDR2020, Operação 7.8.4 – Recursos Genéticos - Conservação e melhoramento de recursos genéticos vegetais.

CULTIVAR (CENTRO-01-0145-FEDER-000020), cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Centro 2020, Portugal 2020 e União Europeia, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

À minha família.

Agradecimentos

Em especial, à Professora Doutora Maria Teresa Coelho e à Professora Doutora Maria Margarida Ataíde Ribeiro, por terem aceite orientar o meu trabalho de estágio e por todo o apoio prestado quer neste período de estágio, quer ao longo de toda a licenciatura

À equipa do Centro de Biotecnologia das Plantas da Beira Interior pela disponibilidade, apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas de laboratório, Tatiana Diamantino, Mariana Cordeiro e Celina Barroca pelo acolhimento e por se terem demonstrado sempre disponíveis para ajudar desde o início.

Ao colega, David Frazão por ceder o material vegetal necessário à realização dos vários ensaios.

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

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 obrigado!

Estabelecimento de esteva (*Cistus ladanifer* L.) *in vitro* e análise molecular de medronheiro (*Arbutus unedo* L.)

Ana Beatriz dos Santos Barata

Resumo

Pretendeu-se com este trabalho: 1) Otimizar um método de estabelecimento de esteva (*Cistus ladanifer* L.) *in vitro*; 2) Estudar 30 amostras diferentes de medronheiro (*Arbutus unedo* L.) e realizar a sua análise molecular.

Ambas as plantas em estudo são facilmente encontradas na região pretendendo-se assim, dar a conhecer e valorizar o interior.

A esteva (*C. ladanifer*) é caracterizada pela fragrância e pelas suas partes aéreas bastante viscosas. Atualmente é procurada para produção de láudano e óleo de *Cistus* para a indústria farmacêutica e perfumaria.

O medronheiro (*A. unedo*) é uma árvore frutífera igualmente do tipo arbustivo que ao longo de vários anos tem sido utilizado na produção de aguardente e, mais recentemente, no fabrico de geleias e outro tipo de produtos derivados do fruto do medronheiro.

Para o primeiro objetivo foram realizados quatro estabelecimentos da planta de esteva proveniente de várias origens. Em cada um dos estabelecimentos pretende-se otimizar a desinfeção superficial, o ajuste do tempo de colocação de fungicida e hipoclorito de sódio.

Os resultados mostraram que a fase de estabelecimento ainda não está otimizada, mas quando ultrapassada, a fase seguinte, de multiplicação, mostra-se promissora.

Foram efetuados testes de otimização para amplificação de DNA de 30 amostras de medronheiro e posteriormente realizada a análise dos fragmentos com base na amplificação de microssatélites nucleares.

Em relação aos resultados, o PCR convencional verificou que todos os “primers” selecionados permitiram amplificações específicas originando fragmentos reprodutíveis e obteve-se a impressão digital (“fingerprinting”) de todos os genótipos estudados.

Palavras chave

Esteva, Medronheiro, Micropropagação, fingerprinting, Sequenciador capilar.

Establishment of gum rockrose (*Cistus ladanifer*) *in vitro* and molecular analysis of strawberry tree (*Arbutus unedo*)

Ana Beatriz dos Santos Barata

Abstract

The aim of this work was to: 1) Optimise a method for establishing rockrose (*Cistus ladanifer* L.) *in vitro*; 2) Study 30 different samples of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) and carry out molecular analysis.

Both plants under study are easily found in the region and the aim is to raise awareness of and add value to the hinterland.

The gum rockrose (*C. ladanifer*) is characterised by its fragrance and by its very viscous aerial parts. It is currently sought after for the production of laudanum and Cistus oil for the pharmaceutical and perfumery industries.

The strawberry tree (*A. unedo*) is a fruit tree, also of the shrub type, which for many years has been used for the production of eau-de-vie and, more recently, for the manufacture of jellies and other products derived from the fruit of the strawberry tree.

For the first objective, four establishments of the rockrose plant from various origins were performed. In each of the establishments, the aim was to optimise surface disinfection, adjustment of the fungicide and sodium hypochlorite placement time.

The results showed that the establishment phase is not yet optimised, but when overcome, the next phase, multiplication, shows promise.

Optimization tests were carried out for DNA amplification of 30 samples of arbutus and later analysis of the fragments based on the amplification of nuclear microsatellites.

Regarding the results, the conventional PCR verified that all the selected primers allowed specific amplifications originating reproducible fragments and the fingerprinting of all the studied genotypes was obtained.

Keywords

Capillary sequencer, fingerprinting, gum rockrose, micropropagation, strawberry tree.

Índice geral

Introdução	1
1. Micropropagação de Esteva- fase de estabelecimento	2
1.1 Material e métodos.....	6
1.1.1 Material Vegetal	6
1.1.2 Estabelecimento das culturas <i>in vitro</i>	6
1.2 Resultados e discussão	9
2. Caraterização molecular do medronheiro.....	16
2.1 O medronheiro	16
2.2 Impressão digital e diversidade genética.....	17
2.3 Técnicas de Biologia Molecular	18
2.3.1 Extração de DNA.....	18
2.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	18
2.3.3 Análise de fragmentos	19
2.4 Material e métodos.....	21
2.5 Resultados.....	23
2.6 Discussão e conclusões	24
3. Referências bibliográficas	25

Índice de figuras

Pág.

Figura 1 - Planta em flor de <i>Cistus ladanifer</i> L. Fonte: Rafael Carvalho, 2014 - http://jardinautoctone.blogspot.com/2014/05/esteva-cistus-ladanifer.html	2
Figura 2 - Locais de colheita do material vegetal no distrito de Castelo Branco.....	6
Figura 3 - Estabelecimento de material vegetal (esteva) em tubo de ensaio (1 explante por tubo). Fotografia: Celina Barroca.....	8
Figura 4 - Material vegetal não viável: a) necrose, b) contaminação.....	9
Figura 5 - Resultados do primeiro estabelecimento de esteva em meio de cultura MS + 0,5mg/L de BAP, apresentado o número de explantes estabelecidos para cada local e o número de explantes viáveis ao fim de um mês respetivamente.	10
Figura 6 - Resultados do segundo estabelecimento de esteva em meio de cultura MS+ 0,5mg/L de BAP e 10mg/L de ácido ascórbico, apresentado o número de explantes estabelecidos para cada local e o número de explantes viáveis ao fim de um mês respetivamente.....	11
Figura 7 - Resultados do terceiro estabelecimento de esteva em meio de cultura MS + 5mg/L de BAP e 10mg/L de ácido ascórbico, apresentado o número de explantes estabelecidos para cada local e o número de explantes viáveis ao fim de um mês respetivamente. Desinfecção por hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio em Sarnadas de S. Simão.....	12
Figura 8 - Resultados do quarto estabelecimento de esteva em meio de cultura MS + 5mg/L de BAP e 10mg/L de ácido ascórbico, apresentado o número de explantes estabelecidos para cada local e o número de explantes viáveis ao fim de um mês respetivamente.....	13
Figura 9 - Material vegetal para multiplicação: a) explante viável, b) explantes para repicagem, c) novo material em novo meio de cultura. Fotografia: Celina Barroca.	14
Figura 10 - Planta (<i>Arbutus unedo</i> L.) com porte arbustivo e frutos maduros Fonte: Patrícia Tiago https://brigadadafloresta.abae.pt/medronheiro	16

Lista de tabelas

Pág.

Tabela 1 - Sobrevivência, contaminação e necrose (em %) dos explantes estabelecidos no primeiro ensaio.....	10
Tabela 2 - Sobrevivência, contaminação e necrose (em %) dos explantes estabelecidos no segundo ensaio.....	11
Tabela 3 - Sobrevivência, contaminação e necrose (em %) dos explantes estabelecidos no terceiro ensaio.....	12
Tabela 4 - Sobrevivência, contaminação e necrose (em %) dos explantes estabelecidos no quarto ensaio.	13
Tabela 5 - Parâmetros de diversidade genética por locus para das 30 amostras de <i>Arbutus unedo</i> (Na- Número de alelos; Ne- número efetivo de alelos; Ho- homozigosidade; He -heterozigosidade; F -índice de fixação.).....	23
Tabela 1 – Meio de cultura MS (Anexo I).....	27
Tabela 1 - Identificação das amostras de medronheiro e respetiva localização geográfica (Anexo II).....	28
Tabela 1 - Composição e seus respetivos volumes dos compostos utilizados por cada amostra a analisar (Ta (°C) = temperatura ótima de hibridação) (Anexo III).....	39
Tabela 1 - Composição e seus respetivos volumes dos compostos utilizados por cada amostra a analisar, para o <i>primer</i> M2-CA421F. (Anexo IV)	30
Tabela 2 - Composição e seus respetivos volumes dos compostos utilizados por cada amostra a analisar, para o multiplex. (Anexo IV)	30
Tabela 1 - Composição e seus respetivos volumes dos compostos utilizados por cada amostra a analisar, para o <i>primer</i> M2-CA421F (Anexo V).	31
Tabela 2 - Composição e seus respetivos volumes dos compostos utilizados por cada amostra a analisar, para o multiplex (Anexo V).....	31

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

- CBPBI – Centro de Biotecnologia das Plantas da Beira Interior
- CEGOT - Centro de Estudos de Geografia e Ordenamento do Território (CEGOT)
- CATAA - Centro de Apoio Tecnológico Agroalimentar
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- ESACB- Escola Superior Agrária de Castelo Branco
- ESAC- Escola Superior Agrária de Coimbra
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
- SSRs- Microssatélites