

Universidade de Évora,
6 - 9 de Julho de 2026

V Curso de Verão de Biotecnologia

*A inovação aplicada a espécies
agroflorestais de clima mediterrânico*



LIVRO DE ABSTRACTS

Organização



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA



Apoios



Título: V Curso de Verão de Biotecnologia – A inovação aplicada a espécies agroflorestais de clima mediterrânico



Editores:

Hélia Cardoso
Lénia Rodrigues
Catarina Campos
Catarina Estêvão
Mónica Marques
Rita Pires

Morada:

Universidade de Évora,
Largo dos Colegiais, 2
7004-516 Évora

Publicado por:

Universidade de Évora, Largo dos Colegiais 2, 7004-516 Évora
Copyright © 2026, all rights reserved
ISBN 978-972-778-556

Caros participantes,

É com grande satisfação que vos damos as boas-vindas à V Edição do Curso de Verão de Biotecnologia, que decorre na Universidade de Évora entre os dias 6 e 9 de julho de 2026. Esta edição é dedicada ao tema “A Inovação Aplicada a Espécies Agroflorestais de Clima Mediterrânico” e reúne estudantes, investigadores, profissionais e todos os interessados nas aplicações da Biotecnologia aos sistemas vegetais e agroflorestais.

Com origem em Coimbra, onde se realizaram as quatro edições anteriores, o Curso de Verão de Biotecnologia tem vindo a afirmar-se como um espaço privilegiado de formação, partilha de conhecimento e discussão científica na área da Biotecnologia Vegetal. Este ano, a convite do CiB, o curso realiza-se na Universidade de Évora, proporcionando uma excelente oportunidade para reforçar a colaboração entre instituições e promover a disseminação de conhecimento científico e tecnológico relevante para os ecossistemas agroflorestais mediterrânicos.

O programa do curso reflete a natureza multidisciplinar da Biotecnologia, abordando diferentes estratégias e ferramentas aplicadas à conservação, valorização e melhoramento de espécies agroflorestais de clima mediterrânico. Ao longo dos quatro dias, os participantes terão a oportunidade de assistir a palestras proferidas por especialistas convidados, participar em atividades práticas e contactar com exemplos da aplicação da Biotecnologia em contextos de investigação e inovação.

A Universidade de Évora acolhe esta iniciativa num ambiente académico que favorece a aprendizagem, a troca de experiências e o estabelecimento de novas colaborações científicas e profissionais. A Comissão Organizadora agradece a todos os palestrantes, colaboradores e participantes pelo seu contributo para o sucesso desta edição.

Esperamos que desfrutem do programa científico e aproveitem também a oportunidade para conhecer a cidade histórica de Évora, classificada como Património Mundial pela UNESCO. Este livro de resumos reúne informação detalhada sobre o curso, incluindo o programa científico e os resumos dos trabalhos apresentados.

Sejam bem-vindos a Évora!

A comissão organizadora,

Hélia Cardoso
Augusto Peixe
Lénia Rodrigues
Catarina Campos
Catarina Estêvão
Mónica Marques
Rita Pires

Comissão Organizadora

- Hélia Cardoso – Professora Auxiliar, Universidade de Évora – MED I CHANGE
- Augusto Peixe – Professor Catedrático, Universidade de Évora – MED I CHANGE
- Lénia Rodrigues – Investigadora, Universidade de Évora – MED I CHANGE
- Catarina Campos – Investigadora, Universidade de Évora – MED I CHANGE
- Catarina Estêvão – Aluna de Doutoramento em Biologia, Universidade de Évora – MED I CHANGE
- Mónica Marques – Aluna de Doutoramento em Biologia, Universidade de Évora – MED I CHANGE
- Rita Pires – Aluna de Doutoramento em Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade de Évora – MED I CHANGE

Colaboradores

- Elsa Ganhão – Técnica Superior, Departamento de Biologia, Universidade de Évora
- Rafaela Santos – Mestre em Engenharia Agrónómica, Universidade de Évora
- Joana Rodrigues – Aluna do Mestrado em Engenharia Agrónómica, Universidade de Évora
- Ana Marques – Aluna do Mestrado em Biologia da Conservação, Universidade de Évora

Organização:



Apoios:



Patrocínios:



Índice

Programa	7
1. Programa da Componente Teórica	8
2. Programa da Componente Prática	11
3. Programa da Visita Técnica	14
Componente Teórica – Resumos	15
Inovação em biotecnologia de plantas – Da cultura <i>in vitro</i> à edição genética	16
Medronheiro: inovação biotecnológica de uma cultura emergente	17
Novas Técnicas Genómicas para o Desenvolvimento de Resistência a Vírus em Tomate	18
Biotecnologia vegetal aplicada à valorização de espécies mediterrânicas: o papel da Microplant	19
Dos genes à cortiça: avanços na genómica funcional da formação da cortiça	20
Dos Resíduos Agroflorestais aos Materiais Avançados: Oportunidades para uma Bioeconomia Sustentável.....	21
Cardo@Biotecnologia: valorização sustentável de uma planta mediterrânica	22
Abordagens biotecnológicas para a sustentabilidade e resiliência da videira	23
Morfogénese <i>in vitro</i> em variedades tradicionais de oliveira: do enraizamento adventício à embriogénese somática	24
Stress <i>priming</i> em castanheiro: tolerância à secura, regulação hormonal e reprogramação proteómica	25
Potencial de nanoformulações à base de óleo essencial de eucalipto como estratégia sustentável de proteção vegetal	26
Melhoramento genético do pinheiro-bravo.....	27
Novas técnicas genómicas para o melhoramento de culturas hortícolas.....	28
Componente Prática – Protocolos.....	29
1. Cultura <i>in vitro</i> de tecidos vegetais	30
1.1. Introdução à cultura <i>in vitro</i> de tecidos vegetais	30
1.2. Preparação do Meio de Cultura.....	31
1.2.1. Procedimento para preparação do meio de cultura	31
1.2.2. Procedimento de esterilização do meio de cultura	33
1.3. Desinfecção do material vegetal.....	33
1.4. Propagação <i>in vitro</i> por cultura de microestacas	34
1.5. Propagação <i>in vitro</i> por organogénese – rebentos adventícios	35
1.5.1. Procedimento para indução da formação de rebentos adventícios	35
1.5.2. Procedimento para indução de rizogénese (formação de raízes adventícias).....	35

1.6.	Aclimação das plantas às condições <i>ex vitro</i>	36
2.	Técnicas de Biologia Molecular	37
2.1.	Introdução às técnicas de Biologia Molecular.....	37
2.2.	Material vegetal e homogeneização	38
2.3.	Extração de DNA.....	38
2.3.1.	Preparação das soluções de extração	38
2.3.2.	Procedimento de extração de DNA	39
2.4.	Quantificação e análise da pureza da solução de DNA.....	40
2.5.	Solução de trabalho de DNA	41
2.6.	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	41
2.6.1.	Protocolo de PCR	42
2.7.	Eletroforese.....	44
2.7.1.	Procedimento para a realização da eletroforese	44

V Curso de Verão de Biotecnologia

*A inovação aplicada a espécies
agroflorestais de clima mediterrânico*



PROGRAMA

1. Programa da Componente Teórica



V Curso de Verão de Biotecnologia

Componente Teórica

 Anfiteatro 1, Colégio Luís António Verney, Universidade de Évora

1º Dia – 6 de Julho

08h30	Receção dos participantes
09h00	Sessão de boas vindas • Nuno Pedroso, Pró-Reitor para a Investigação • Maria João Cabrita, Vice-Diretora do MED • Jorge Canhoto, Presidente do CiB • Hélia Cardoso, representante da Comissão Organizadora
09h20	Palestra de abertura – Inovação em biotecnologia de plantas: da cultura <i>in vitro</i> à edição genética • Jorge Canhoto – CEF, Universidade de Coimbra
10h00	Coffee break
10h30	Medronheiro: inovação biotecnológica de uma cultura emergente • João Martins – CEF, Universidade de Coimbra
11h00	Novas técnicas genómicas para o desenvolvimento de resistência a vírus em tomate • Carla Varanda – CERNAS, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Santarém
11h30	Biotechnology vegetal aplicada à valorização de espécies mediterrânicas – O papel da Microplant Lda • João Cruz – Microplant Lda.
12h00	Fim do 1º dia da componente teórica

V Curso de Verão de Biotecnologia

Componente Teórica

📍 Anfiteatro 1, Colégio Luís António Verney, Universidade de Évora

2º Dia – 7 de Julho

09h00	Dos genes à cortiça: avanços na genómica funcional da formação da cortiça • Célia Miguel – BioISI, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
09h30	Dos Resíduos Agroflorestais aos Materiais Avançados: Oportunidades para uma Bioeconomia Sustentável • Bruno Medronho – MED, Universidade do Algarve
10h00	Coffee break
10h30	Cardo@Biotecnologia: valorização sustentável de uma planta mediterrânica • Fátima Duarte – CEBAL, MED & CHANGE
11h00	Abordagens biotecnológicas para a sustentabilidade e resiliência da videira • Catarina Estêvão e Mónica Marques – MED, Universidade de Évora
11h30	Morfogénese in vitro em variedades tradicionais de oliveira: do enraizamento adventício à embriogénese somática • Hélia Cardoso – MED, Universidade de Évora
12h00	Fim do 2º dia da componente teórica

V Curso de Verão de Biotecnologia

Componente Teórica

 Anfiteatro 1, Colégio Luís António Verney, Universidade de Évora

3º Dia – 8 de Julho

- | | |
|--------------|---|
| 09h00 | Stress priming em castanheiro: tolerância à seca, regulação hormonal e reprogramação proteómica <ul style="list-style-type: none">Filipa Sousa e Cristiano Soares – GreenUPorto, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto |
| 09h45 | Potencial de nanoformulações à base de óleo essencial de eucalipto como estratégia sustentável de proteção vegetal <ul style="list-style-type: none">Mafalda Pinto – GreenUPorto, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto |
| 10h15 | Coffee break |
| 10h45 | Melhoramento genético do pinheiro-bravo <ul style="list-style-type: none">Isabel Carrasquinho e Carmen Santos – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. |
| 11h30 | Novas técnicas genómicas para o melhoramento de culturas hortícolas <ul style="list-style-type: none">Ana Margarida Fortes – BioISI, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa |
| 12h00 | Fim do 3º dia da componente teórica |

2. Programa da Componente Prática



V Curso de Verão de Biotecnologia

Componente Prática

📍 Edifício António Santos Júnior, Pólo da Mitra, Universidade de Évora

1º Dia – 6 de Julho

14h30	Atividades Práticas: Grupo 1: Introdução à cultura in vitro • Hélia Cardoso – MED, Universidade de Évora Grupo 2: Introdução às técnicas de biologia molecular • Catarina Campos – MED, Universidade de Évora
15h30	Visita às instalações
16h00	Coffee break
16h30	Atividades Práticas: Grupo 1: Preparação de meio de cultura • Rodrigo Eugénio – Microplant Lda. Grupo 2: Extração de DNA • Catarina Estêvão – MED, Universidade de Évora
17h30	Fim do 1º dia da componente prática

V Curso de Verão de Biotecnologia

Componente Prática

📍 Edifício António Santos Júnior, Pólo da Mitra, Universidade de Évora

2º Dia – 7 de Julho

14h30	Atividades Práticas: Grupo 1: Introdução às técnicas de biologia molecular • Catarina Campos – MED, Universidade de Évora Grupo 2: Introdução à cultura in vitro • Hélia Cardoso – MED, Universidade de Évora
15h45	Coffee break
16h15	Atividades Práticas: Grupo 1: Extração de DNA • Catarina Estêvão – MED, Universidade de Évora Grupo 2: Preparação de meio de cultura • Rodrigo Eugénio – Microplant Lda.
17h30	Fim do 2º dia da componente prática

V Curso de Verão de Biotecnologia

Componente Prática

📍 Edifício António Santos Júnior, Pólo da Mitra, Universidade de Évora

3º Dia – 8 de Julho

14h30	Atividades Práticas: Grupo 1: Instalação de cultura de microestacas e organogénese • Lénia Rodrigues – MED, Universidade de Évora Grupo 2: PCR e eletroforese • Mónica Marques – MED, Universidade de Évora
15h45	Coffee break
16h15	Atividades Práticas: Grupo 1: PCR e eletroforese • Mónica Marques – MED, Universidade de Évora Grupo 2: Instalação de cultura de microestacas e organogénese • Lénia Rodrigues – MED, Universidade de Évora
17h30	Fim do 3º dia da componente prática

3. Programa da Visita Técnica



V Curso de Verão de Biotecnologia

Visita Técnica

INIAV (Polo de Inovação de Elvas) e InnovPlantProtect

4º Dia – 9 de Julho

08h30	📍 <i>Ponto de encontro a definir</i> Partida para Elvas
10h00	📍 INIAV – Polo de Inovação de Elvas – Coleção Nacional de Referência de Cultivares de Oliveira Apresentação da diversidade intervarietal, conservação e avaliação em coleção de germoplasma Carla Inês
10h45	📍 INIAV – Polo de Inovação de Elvas – Auditório da Estação de Melhoramento de Plantas Apresentação dos programas de melhoramento genético • Oliveira (<i>Olea europaea</i> L.) António Cordeiro • Cereais Rita Costa • Pratenses e forrageiras (leguminosas e gramíneas) Teresa Carita e Nuno Simões • Proteaginosas Graça Pereira
12h00	📍 InnovPlantProtect Visita às instalações
13h00	Almoço

V Curso de Verão de Biotecnologia

*A inovação aplicada a espécies
agroflorestais de clima mediterrânico*



COMPONENTE TEÓRICA

RESUMOS

Palestra de Abertura:**Inovação em biotecnologia de plantas – Da cultura *in vitro* à edição genética**

Jorge Canhoto

Department of Life Sciences, University of Coimbra - Center for Functional Ecology Science for People & the Planet
TERRA Associated Laboratory, Calçada Martim de Freitas, Coimbra 3000-456, Portugal
E-mail: jorgecan@ci.uc.pt

Plant biotechnology has become a key driver in the development of innovative solutions to address the challenges associated with sustainable food production, climate change adaptation, and the conservation of genetic resources. Over recent decades, advances in *in vitro* culture techniques and targeted genome modification tools have profoundly transformed strategies for plant propagation, conservation, and breeding.

This presentation will provide an integrated overview of the major innovations in this field, highlighting recent progress in plant tissue culture. Developments in the use of bioreactor-based culture systems, which enhance the efficiency and scalability of plant production, will be discussed, together with emerging approaches that exploit interactions between cultured tissues and beneficial microorganisms to promote regeneration, growth, and morphogenic competence.

Advances in our understanding of the molecular mechanisms underlying somatic embryogenesis will also be addressed, including the identification of genes and regulatory pathways involved in the acquisition of embryogenic competence and embryo development. The use of molecular markers and non-destructive methodologies for the early detection of embryogenic cells or tissues represents another significant innovation, enabling the optimization of protocols while reducing production time and costs.

Finally, the principles of genome editing and the potential of new editing technologies for plant breeding will be presented. These approaches offer unprecedented opportunities for the rapid and precise development of improved plant varieties with desirable agronomic traits, including enhanced resistance to pests and diseases, increased tolerance to abiotic stresses, improved quality characteristics, and greater sustainability of agricultural and forestry production systems.

Medronheiro: inovação biotecnológica de uma cultura emergente

João Martins^{1*}, Jorge Canhoto¹

¹Universidade de Coimbra, Centro de Ecologia Funcional, Laboratório Associado Terra, Departamento Ciências da Vida, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

*E-mail: joao.martins@uc.pt

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é uma espécie nativa do Mediterrâneo, com particular relevância em Portugal, onde assume importância ecológica, económica e cultural¹. Tradicionalmente associado a ecossistemas naturais e terrenos marginais, a espécie tem ganho interesse devido à sua resiliência a stresses bióticos e abióticos, potencial para produtos de valor acrescentado, e devido ao seu papel na preservação da biodiversidade e restauro de ecossistemas florestais^{1,2}. Este crescente interesse tem sido alavancado pelos avanços na investigação científica e ferramentas biotecnológicas que têm contribuído para revelar o seu potencial. Neste contexto, parte da investigação nesta espécie tem-se focado na otimização dos protocolos de propagação, compreensão das respostas adaptativas a stresses ambientais, e identificação de características relevantes para programas de melhoramento e/ou conservação.

Os protocolos de micropropagação foram melhorados para permitir a propagação clonal em larga escala de genótipos selecionados, fornecendo material geneticamente uniforme aos produtores^{3,4}. Estudos genéticos e reprodutivos permitiram a identificação da variabilidade nas populações e a produção de híbridos controlados, realçando a importância do genótipo e proveniência na performance da planta sob stress hídrico⁵. Análises metabólicas revelaram perfis bioquímicos distintos associados à tolerância à seca o que permitiu identificar metabolitos-chave envolvidos na resposta ao stress e que poderão funcionar como marcadores de seleção⁶. Alguns destes metabolitos, particularmente compostos fenólicos, apresentam atividade antifúngica, o que sugere o seu envolvimento em mecanismos de defesa da planta⁷. Paralelamente, a caracterização do microbioma revelou comunidades diversas de bactérias e fungos, incluindo microrganismos com potencial promotor de crescimento da planta, inibidor de patógenos e mitigação de stress⁸⁻¹⁰.

A integração de abordagens complementares em diferentes níveis biológicos fornece uma visão abrangente da biologia e capacidade adaptativa da espécie, que suporta a seleção de genótipos superiores, o desenvolvimento de estratégias de cultivo sustentáveis e a futura valorização do medronheiro, reforçando a sua crescente relevância em Portugal, num contexto de alterações climáticas.

Referências:

1. Martins J, Pinto G, Canhoto J (2022). *Journal of Forestry Research*, **33**, 377-390.
2. Martins J, Canhoto J, Canhoto C (2025). *Revista de Ciência Elementar*, **13**, 025.
3. Martins J, Correia S, Correia B, Pinto G, Canhoto J (2019). *Biologia Plantarum*, **63**, 278-286.
4. Martins J, Correia S, Pinto G, Canhoto J (2022). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **150**, 611-626.
5. Martins J, Monteiro P, Pinto G, Canhoto J (2021). *Forests*, **12**, 148.
6. Martins J, Pétriacq P, Flandin A, Cadenas A, Monteiro P, Pinto G, Canhoto J (2022). *Frontiers in Plant Science*, **13**, 1011542.
7. Martins J, Batista T, Pinto G, Canhoto J (2021). *Trees*, **35**, 1571-1586.
8. Martins J, Ares A, Costa J, Canhoto J (2021). *Scientia Horticulturae*, **292**, 110657.
9. Martins J, Ares A, Casais V, Costa J, Canhoto J (2021). *Plants*, **10**, 1569.
10. Martins J, Veríssimo P, Canhoto J (2021). *Protoplasma*, **259**, 659-677.

Novas Técnicas Genómicas para o Desenvolvimento de Resistência a Vírus em Tomate

Carla Varanda^{1,2*}, Cristiana Marques¹, Patrick Materatski^{1,2}

¹Centro de Estudos de Recursos Naturais Ambiente e Sociedade (CERNAS), Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária, Quinta do Galinheiro - S. Pedro, 2001-904 Santarém, Portugal; ²MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento & CHANGE – Instituto para as Alterações Globais e Sustentabilidade, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, 7006-554 Évora, Portugal

*E-mail: carla.varanda@esa.ipsantarem.pt

O tomateiro é uma das culturas hortícolas mais importantes a nível mundial, desempenhando um papel relevante na alimentação humana e na economia agrícola. Contudo, a sua produção enfrenta desafios crescentes associados às alterações climáticas e à emergência de novas doenças, entre as quais se destaca o *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). Este vírus tem provocado perdas económicas significativas em diversos países produtores, comprometendo a produtividade e a qualidade dos frutos e constituindo atualmente uma das principais ameaças à cultura do tomateiro ¹.

O controlo do ToBRFV baseia-se essencialmente em medidas sanitárias preventivas e na utilização de variedades resistentes, cuja obtenção através dos métodos convencionais de melhoramento é frequentemente morosa e limitada. Neste contexto, as Novas Técnicas Genómicas (NTGs), nomeadamente a edição genómica baseada em CRISPR/Cas, surgem como ferramentas promissoras para acelerar o desenvolvimento de plantas resistentes a vírus ^{2,3}.

Esta comunicação apresentará o projeto VirusRest, que tem como objetivo desenvolver plantas de tomate resistentes ao ToBRFV através da edição dirigida de genes de suscetibilidade do hospedeiro envolvidos no ciclo de infeção viral. A estratégia baseia-se na utilização de complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) constituídos por proteínas Cas e RNAs guia específicos, permitindo introduzir alterações genéticas precisas sem recurso à integração de DNA exógeno no genoma da planta.

Serão abordados os fundamentos biológicos da interação vírus-planta, os principais genes-alvo associados à multiplicação viral e as vantagens da utilização de sistemas CRISPR/Cas para a obtenção de resistência genética durável. Por fim, será discutido o potencial destas abordagens para uma agricultura mais sustentável.

Referências

1. FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO (2025). Rome: FAO.
2. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2012). *Science*, 337, 816–821.
3. Gaskell, G., Allansdottir, A., Hampel, J. et al. (2026). *npj Sustain. Agric.* 4, 45.

Financiamento: Este trabalho foi financiado pelo projeto “VIRUSREST – Desenvolvimento de plantas de tomate resistentes contra vírus, obtidas de acordo com a nova regulamentação europeia” (Projeto n.º 15821; COMPETE2030-FEDER-00693100), apoiado pelo FEDER através do COMPETE 2030 – Programa de Inovação e Transição Digital (PITD).

Biotecnologia vegetal aplicada à valorização de espécies mediterrânicas: o papel da Microplant

João Cruz^{1*}, Rodrigo Eugénio¹, Augusto Ribeiro¹, Rita Pires^{2,3}, Augusto Peixe^{1,3,4}, Hélia Cardoso^{1,3,5}

¹ Microplant Lda., Universidade de Évora, Évora, Portugal. <https://microplant.pt/>; ² IIFA Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Évora, Portugal; ³ MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE Global Change and Sustainability Institute, Évora, Portugal; ⁴ Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciência e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal; ⁵ Departamento de Biologia, Escola de Ciência e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal
*E-mail: joao.cruz@microplant.pt

A biotecnologia vegetal constitui uma ferramenta estratégica para valorizar as culturas mediterrânicas, permitindo ultrapassar limitações da propagação convencional, como o baixo enraizamento, a sazonalidade da recolha de material vegetal, a heterogeneidade genética e a reduzida capacidade de resposta à procura. Contudo, a transferência dos resultados da investigação para soluções disponíveis no mercado continua condicionada pela distância entre a academia e o setor empresarial. Neste contexto, as spin-offs desempenham um papel relevante na conversão do conhecimento científico em produtos e processos aplicáveis. A Microplant, spin-off da Universidade de Évora, desenvolve e aplica técnicas de cultura *in vitro* à produção clonal de material vegetal. A sua atividade inclui cultura de meristemas e de microestacas, enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, aclimatização e microenxertia. Estas abordagens são aplicadas à batata-doce, videira, oliveira, alfarrobeira, medronheiro e nogueira, incluindo a produção do porta-enxerto clonal 'Vlach' e de cultivares tradicionais. A micropropagação de oliveira demonstra o potencial destas metodologias na multiplicação de génotipos com interesse agronómico¹, enquanto a cultura de meristemas constitui uma base biológica para a regeneração de tecidos e órgãos². A propagação clonal permite obter plantas geneticamente uniformes, com maior previsibilidade produtiva, rastreabilidade e qualidade sanitária, particularmente relevante em culturas vegetativamente propagadas³. Persistem, porém, desafios associados à recalcitrância das espécies lenhosas, contaminação, oxidação fenólica, dependência genotípica, regulamentação e escalabilidade. A experiência da Microplant evidencia que a colaboração entre universidades, empresas e produtores é determinante para transformar inovação biotecnológica em valor económico, social e ambiental, contribuindo para sistemas agrícolas mediterrânicos mais sustentáveis e resilientes.

Referências

1. Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., Macedo, E. (2007). *Scientia Horticulturae*, 113, 1-7.
2. Wang, J., Su, Y., Kong, X., Ding, Z., Zhang, X.S. (2020). *aBIOTECH*, 1, 194-204.
3. Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs, M., Katis, N.I. (2015). *Advances in Virus Research*, 91, 175

Dos genes à cortiça: avanços na genómica funcional da formação da cortiça

André Mendes¹, Diana Martins¹, Ana Vila-Verde¹, Raquel Santos¹, Susana Lopes¹, Vera Inácio¹, Célia Miguel^{1*}

¹BiolSI – Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal

*E-mail: cmmiguel@ciencias.ulisboa.pt

O felema, vulgarmente designado por cortiça, é um dos tecidos produzidos pelo câmbio súbero-felodérmico ou felogénio, desempenhando um papel essencial na proteção de caules e raízes em plantas que apresentam crescimento secundário, face a stresses ambientais bióticos e abióticos. O sobreiro (*Quercus suber*) constitui um exemplo notável de atividade prolongada do felogénio durante grande parte da vida da árvore, permitindo a extração periódica de cortiça e a sua exploração sustentável com diversas aplicações industriais.

Apesar da sua importância ecológica e socioeconómica, o conhecimento dos mecanismos genéticos que regulam a formação da cortiça permanece ainda incompleto, tendo o seu avanço sido impulsionado por abordagens de sequenciação de alto rendimento, incluindo a sequenciação do genoma do sobreiro¹ e a identificação de genes diferencialmente expressos durante a formação da cortiça.

Com base em estudos de transcritómica em sobreiro^{2,3}, o nosso grupo de investigação no laboratório ForGen identificou genes candidatos associados à atividade meristemática do felogénio e à diferenciação das células de cortiça. A sua caracterização funcional é essencial para compreender os mecanismos moleculares subjacentes e explorar aplicações futuras. Atualmente, estão a ser estudadas as funções de fatores de transcrição e mecanismos epigenéticos associados à atividade do felogénio e diferenciação do felema, recorrendo a diferentes sistemas modelo, incluindo *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* e *Populus*. Estes estudos têm permitido aprofundar o conhecimento dos processos moleculares que regulam a formação da cortiça. Os resultados obtidos serão apresentados, discutindo-se igualmente potenciais aplicações orientadas para a produção e qualidade da cortiça.

Referências

1. Usié A, Serra O, Barros PM, Barbosa P, Leão C, Capote T, Almeida T, Rodrigues L, Carrasquinho I, Guimarães JB, Mendonça D, Nóbrega F, Egas C, Chaves I, Abreu IA, Saibo NJM, Marum L, Varela MC, Matos J, Simões F, Miguel CM, Oliveira MM, Ricardo CP, Gonçalves S, Ramos A (2023). *Tree Genetics & Genomes* 19, 54.
2. Lopes ST, Sobral D, Costa B, Perdiguero P, Chaves I, Costa A, Miguel CM (2020). *Tree Physiology* 20;40(2):129-141.
3. Lopes ST, Costa B, Chaves I, Costa A, Miguel CM (2025). *J Plant Growth Regul* 44:1753-1766.

Dos Resíduos Agroflorestais aos Materiais Avançados: Oportunidades para uma Bioeconomia Sustentável

B. Medronho^{1,2*}, H. Duarte¹, A. Romano¹, M. Aliaño-González^{1,3}, J. Brás¹, O. Boutoub¹, S. Gonçalves¹, A. Costa⁴, S. Magalhães⁵, C. Fernandes⁵, C. Varela⁵, L. Alves⁵, M. Graça Rasteiro⁵, F. Antunes^{6,7}, E. Melro⁶, A. Valente⁷, C. Dahlström², A. Eivazi² e M. Norgren²

¹MED – Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, CHANGE – Instituto para as Alterações Globais e Sustentabilidade, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, Ed. 8, 8005-139 Faro, Portugal; ²FSCN, Surface and Colloid Engineering, Mid Sweden University, SE-851 70 Sundsvall, Suécia;

³Departamento de Química Analítica, Universidade de Cádiz, 11510 Puerto Real, Espanha; ⁴Centro de Eletrónica, Optoeletrónica e Telecomunicações (CEOT), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, 8005-139 Faro, Portugal; ⁵CERES, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, 3030-790 Coimbra, Portugal; ⁶Science 351 – Disruptive & Sustainable R&D Innovations, Instituto Pedro Nunes, Ed. C, 3030-199 Coimbra, Portugal; ⁷CQC, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Rua Larga, 3004-535 Coimbra, Portugal

*E-mail: bmedronh@ualg.pt

As crescentes preocupações ambientais, a escassez de recursos e o aumento da população mundial estão a impulsionar a procura de materiais sustentáveis obtidos a partir de recursos renováveis. Ao longo dos últimos 15 anos, a nossa investigação tem-se centrado na valorização de biomassa lignocelulósica, em particular da lignina e da celulose, como elementos fundamentais para o desenvolvimento da bioeconomia. Embora a lignina permaneça amplamente subaproveitada, apesar da sua abundância e da sua estrutura aromática única, a celulose apresenta um enorme potencial, exigindo, contudo, estratégias inovadoras de processamento devido à sua limitada solubilidade e ausência de processabilidade térmica.

Esta apresentação destacará exemplos da conversão de resíduos agroflorestais e lignocelulósicos em materiais de elevado valor acrescentado, incluindo filmes de base biológica para colheita de energia, floculantes ambientalmente sustentáveis e formulações condicionadoras para o cabelo. Será dada especial ênfase a desenvolvimentos recentes envolvendo produtos derivados da alfarroba e ao seu potencial como matéria-prima versátil para aplicações em materiais avançados. A palestra demonstrará como a ciência dos biopolímeros, a ciência de coloides e interfaces e a química verde podem contribuir para o desenvolvimento de materiais sustentáveis e de soluções alinhadas com os princípios da bioeconomia circular.

Cardo@Biotecnologia: valorização sustentável de uma planta mediterrânica

M. Fátima Duarte^{1,2}

¹CEBAL – Alentejo Biotechnology Center for Agriculture and Agro-Food, Instituto Politécnico de Beja (IPBeja), Beja, Portugal;

²MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE—Global Change and Sustainability Institute, CEBAL, Beja, Portugal
E-mail: fatima.duarte@cebal.pt

O cardo (*Cynara cardunculus* L.) é uma espécie característica da região mediterrânica, tradicionalmente associada à produção de queijo através da utilização das suas flores como agente coagulante. Contudo, o conhecimento gerado nas últimas décadas tem revelado que esta planta encerra um potencial muito mais vasto, posicionando-se como um recurso estratégico para a bioeconomia e para o desenvolvimento de soluções sustentáveis baseadas em recursos biológicos.

O grupo dos compostos bioactivos do CEBAL, ao longo dos últimos 14 anos tem desenvolvido diferentes linhas de investigação que visam a valorização económica, baseada no potencial de aplicação biotecnológico da planta do cardo, desde a caracterização da sua diversidade genética, química e biotecnológica, incluindo o estudo da variabilidade natural, até à identificação de compostos bioativos com elevado valor acrescentado. Serão abordadas as diferentes abordagens biotecnológicas utilizadas para compreender e explorar o potencial desta espécie, incluindo ferramentas de genómica, caracterização fitoquímica e desenvolvimento de processos de extração e valorização de biomoléculas de interesse para os setores agroalimentar, farmacêutico e cosmético. A folha tem sido a parte da planta mais estudada no nosso grupo de investigação, devido às elevadas quantidades de um composto químico, uma lactona sesquiterpénica, denominada cinaropicrina, com um potencial biológico elevadíssimo, nomeadamente com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatório, anti-tumorais, entre outras.

Ao demonstrar como uma espécie tradicional pode ser transformada num recurso multifuncional para diferentes cadeias de valor, pretende-se evidenciar o papel da biotecnologia na promoção da sustentabilidade, da inovação e da valorização dos recursos endógenos do Mediterrâneo, contribuindo para uma agricultura mais resiliente e para o desenvolvimento de novos produtos e processos de base biológica, aliada com a tradição do uso da flor como coagulante vegetal para a produção de queijos, em particular queijos de índole tradicional.

Abordagens biotecnológicas para a sustentabilidade e resiliência da videira

C. Estêvão¹, C. Campos¹, L. Rodrigues¹, M. Marques¹, R. Santos¹, D. Tavares², Jorge Böhm², A. Peixe³, R. Pires¹, J. L. Silva⁴, A. C. Neto⁴, R. Flores⁴, M. J. Cabrita³, H. Cardoso^{5*}

¹MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE Global Change and Sustainability Institute, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Portugal; ²Viveiros PLANSEL, Plantas Seleccionadas Lda., Montemor-o-Novo, Portugal; ³MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE Global Change and Sustainability Institute, Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Portugal; ⁴ESPORÃO S.A., Herdade do Esporão, Reguengos de Monsaraz, Portugal; ⁵MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE Global Change and Sustainability Institute, Departamento de Biologia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Portugal

*Email: hcardoso@uevora.pt

As alterações climáticas e a crescente pressão exercida por agentes patogénicos representam desafios significativos para a viticultura, reforçando a necessidade de desenvolver estratégias inovadoras que promovam a sustentabilidade e a resiliência da cultura. Neste contexto, a biotecnologia disponibiliza um conjunto de ferramentas que permitem aprofundar o conhecimento sobre os processos biológicos envolvidos na adaptação da videira a diferentes constrangimentos ambientais, de natureza biótica e abiótica, bem como apoiar estratégias de melhoramento orientadas para o desenvolvimento de plantas mais resilientes.

Na Universidade de Évora, a colaboração entre o Laboratório de Biologia Molecular e o Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal, em articulação com empresas do setor vitivinícola, tem permitido integrar abordagens complementares aplicadas ao melhoramento da videira. A identificação dos mecanismos moleculares de resposta à seca contribui para a caracterização de vias metabólicas associadas a esta condição de stresse, permitindo a identificação de biomarcadores e a sua futura integração em programas de melhoramento genético, incluindo abordagens baseadas em novas ferramentas genómicas.

Paralelamente, a otimização de protocolos de embriogénese somática visa estabelecer sistemas de regeneração eficientes, essenciais para a obtenção de plantas melhoradas através de estratégias de engenharia genética ou edição genómica. Em complemento, o melhoramento convencional, baseado em cruzamentos controlados entre genótipos de elite e progenitores portadores de características de interesse, tem sido também acompanhado pela Universidade de Évora, com particular enfoque na aplicação de marcadores moleculares para a genotipagem de populações F1 e seleção de híbridos resistentes a agentes patogénicos.

Nesta apresentação, serão introduzidos os trabalhos que a Universidade de Évora tem vindo a desenvolver nestes diferentes domínios, evidenciando o seu contributo para a sustentabilidade, resiliência e competitividade do setor vitivinícola.

Financiamento: Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projetos BioGrapeSustain (C644866286-00000011), VITISAFE (ALT2030-FEDER-02669400) e PRR-C05-i03-I-000125. Os autores agradecem à Unidade de I&D MED – Instituto Mediterrânico para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento (<https://doi.org/10.54499/UID/05183/2025>) e ao Laboratório Associado CHANGE – Instituto para as Alterações Globais e Sustentabilidade (<https://doi.org/10.54499/LA/P/0121/2020>). RP agradece à FCT pela atribuição das bolsas de doutoramento UI/BD/153509/2022 e 2024.00814.BDANA.

Morfogénese *in vitro* em variedades tradicionais de oliveira: do enraizamento adventício à embriogénese somática

Hélia Cardoso^{1*}, Rita Pires², Lénia Rodrigues², Catarina Campos², Catarina Estêvão², Mónica Marques², Rafaela Santos², Augusto Peixe³

¹ MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Departamento de Biologia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Polo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal; ² MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, IIFA Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Polo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal; ³ MED Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia Universidade de Évora, Polo da Mitra, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal.

*Email: hcardoso@uevora.pt

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das culturas mais emblemáticas da região mediterrânica, assumindo elevada importância económica, ambiental e cultural. A preservação e valorização de variedades tradicionais, aliadas à necessidade de desenvolver materiais vegetais mais adaptados aos atuais desafios agrícolas, reforçam o interesse na aplicação de ferramentas biotecnológicas que apoiem a propagação e o melhoramento desta espécie.

A investigação desenvolvida na Universidade de Évora tem contribuído para a otimização de sistemas de propagação *in vitro* de variedades tradicionais de oliveira, explorando diferentes vias de regeneração e o seu potencial em estratégias de melhoramento, em particular o enraizamento adventício e a embriogénese somática. O enraizamento adventício constitui uma etapa fundamental na propagação clonal de cultivares de oliveira. No entanto, algumas cultivares tradicionais portuguesas apresentam um comportamento recalcitrante face ao estímulo de enraizamento, sobretudo quando são utilizados métodos convencionais baseados na estacaria semi-lenhosa. Em alguns génotipos de elite, o estabelecimento de protocolos de cultura de microestacas permitiu ultrapassar esta limitação, contudo, esta abordagem não se tem revelado igualmente eficaz para todos os génotipos de interesse.

Neste contexto, a embriogénese somática pode ser considerada uma via alternativa de regeneração, com elevado potencial para futuras aplicações em melhoramento genético, incluindo abordagens baseadas em ferramentas moleculares e edição genómica. Porém, muitos génotipos de elite revelam igualmente elevada recalcitrância à indução de embriogénese somática quando se utiliza material vegetal adulto. A eficiência deste processo tende a aumentar com o recurso a material juvenil, frequentemente proveniente de embriões zigóticos, o que limita a aplicabilidade da metodologia ao melhoramento de génotipos previamente selecionados.

Assim, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na aquisição de competência morfogénica e na resposta eficiente aos estímulos *in vitro* assume particular relevância, podendo contribuir diretamente para aumentar a eficiência dos protocolos de regeneração e apoiar o desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento aplicadas à oliveira.

Financiamento: Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projetos OLEAVALOR (ALT20/45/2015/08), GESCERTOLIVE (ALT20-03-0246-FEDER-000058) e MED projeto exploratório ID 10_2021. Os autores agradecem à Unidade de I&D MED – Instituto Mediterrânico para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento (<https://doi.org/10.54499/UID/05183/2025>) e ao Laboratório Associado CHANGE – Instituto para as Alterações Globais e Sustentabilidade (<https://doi.org/10.54499/LA/P/0121/2020>). RP agradece à FCT pela atribuição da bolsa de doutoramento UI/BD/153509/2022.

***Stress priming* em castanheiro: tolerância à secura, regulação hormonal e reprogramação proteómica**

Filipa Sousa^{1,2*}, Pedro Mateus¹, Maria Martins¹, Bruno Sousa¹, Cristiano Soares^{1*} e Fernanda Fidalgo¹

¹GreenUPorto – GreenUPorto – Sustainable Agrifood Production Research Centre & INOV4AGRO, Department of Biology, Faculty of Sciences of University of Porto, Rua do Campo Alegre s/n, 4169-007 Porto, Portugal; ²CITAB- Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-801, Vila Real, Portugal

*E-mail: filipasousa@fc.up.pt; cristiano.soares@fc.up.pt

Nos últimos anos, a produtividade do castanheiro tem vindo a ser ameaçada pela rápida progressão das alterações climáticas, nomeadamente pela ocorrência de secas prolongadas. Esta situação, que se prevê agravar num futuro próximo, reforça a necessidade de desenvolver estratégias de mitigação que promovam a resiliência climática desta espécie. Neste trabalho, investigou-se o papel do *stress priming* como indutor de memória vegetal e o seu efeito na modulação das respostas fisiológicas, da regulação hormonal e do proteoma do castanheiro ao stress induzido pela secura. Para tal, castanheiros jovens foram expostos a condições de secura moderada [35% da capacidade máxima de retenção hídrica do solo (WHC_{max}); 3 semanas], seguidas de um período de recuperação (70% WHC_{max} ; 2 semanas) e de uma posterior exposição a secura severa (25% WHC_{max} ; 4 semanas). Os resultados demonstraram que, nas plantas não sujeitas a *priming*, a secura induziu dano oxidativo, acompanhado por uma sobreacumulação de ácido abscísico (ABA) e de proteínas associadas ao *stress*. Por outro lado, as plantas previamente expostas a *priming* revelaram menor suscetibilidade ao deficit hídrico, sendo capazes de manter a homeostasia redox através de ajustes coordenados ao nível do proteoma e da regulação hormonal. Esta maior estabilidade metabólica em condições de *stress* foi associada à indução de memória, uma vez que a ativação de vias de proteção e a repressão de processos energeticamente dispendiosos foram igualmente observadas em plantas *primed* mantidas em condições de não *stress* (controlo). Em suma, os resultados demonstram que o *priming* mediado pela secura é capaz de induzir memória de stress no castanheiro, através da modulação coordenada das respostas proteómicas, redox e hormonais, permitindo uma resposta mais eficiente e energeticamente menos dispendiosa a condições de secura severa.

Financiamento: Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Programa Promove da Fundação “la Caixa”, em colaboração com o BPI e a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto de investigação CC&NUTS (PD21-00007). O trabalho beneficiou ainda do apoio da FCT/MCTES no âmbito dos Projetos Estratégicos UID/05748/2025 e UID/PRR/05748/2025 (<https://doi.org/10.54499/UID/05748/2025> e <https://doi.org/10.54499/UID/PRR/05748/2025>, respetivamente), bem como pela atribuição de bolsas de doutoramento a FS (2021.04941.BD) e PM (2024.02726.BD).

Potencial de nanoformulações à base de óleo essencial de eucalipto como estratégia sustentável de proteção vegetal

Mafalda Pinto^{1,2,3,4*}, Cristiano Soares¹, Inês Maria Valente⁵, Bruno Sousa¹, Artur Ribeiro^{6,7},
Tatiana Andreani^{1,8}, Fernando Tavares^{2,3,4}, Fernanda Fidalgo¹

¹GreenUPorto – Centro de Investigação para a Produção Agroalimentar Sustentável/INOV4AGRO, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, s/n, 4169-007 Porto, Portugal; ²CIBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, InBIO Laboratório Associado, Campus de Vairão, Universidade do Porto, 4485-661 Vairão, Portugal; ³Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, s/n, 4169-007 Porto, Portugal; ⁴Programa BIOPOLIS em Genómica, Biodiversidade e Ordenamento do Território, CIBIO, Campus de Vairão, 4485-661 Vairão, Portugal; ⁵REQUIMTE, LAQV, ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal; ⁶CEB – Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 4710-057 Braga, Portugal; ⁷LABBELS – Laboratório Associado, Braga e Guimarães, Portugal; ⁸CIQUP – Centro de Investigação em Química e IMS – Instituto de Ciências Moleculares, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal

*E-mail: mafalda.pinto@fc.up.pt

Os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* Labill. têm emergido como alternativas promissoras aos pesticidas convencionais, devido às suas múltiplas propriedades biológicas e elevada disponibilidade de biomassa. No entanto, a baixa estabilidade físico-química destes compostos pode comprometer a sua eficácia em condições de campo. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver duas nanoformulações contendo um óleo essencial comercial de eucalipto (OEE): nanopartículas lipídicas (NL-OEE) e nanopartículas de queratina (NQ-OEE), avaliando o seu potencial para a gestão sustentável de ervas daninhas e doenças bacterianas. Ambas as nanoformulações apresentaram boa estabilidade físico-química e perfis de libertação distintos, com as NL-OEE a promoverem uma libertação mais lenta do óleo essencial do que as NQ-OEE. A atividade herbicida foi avaliada em *Portulaca oleracea* L. (beldroega) após aplicação foliar do OEE não encapsulado, NL-OEE e NQ-OEE. O OEE livre apresentou atividade herbicida dependente da dose, enquanto a nanoencapsulação reduziu os seus efeitos fitotóxicos. Posteriormente, a segurança ambiental foi avaliada em plântulas de *Solanum lycopersicum* L. cultivadas em solos tratados com as formulações. Os resultados mostraram que o OEE livre e as NL-OEE estimularam as defesas antioxidantes sem afetar o crescimento, enquanto as NQ-OEE induziram desequilíbrios oxidativos e reduziram o desenvolvimento vegetal. Paralelamente, o potencial antibacteriano das formulações foi avaliado contra *Xanthomonas euvesicatoria* (Xeu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). O OEE livre e as nanoformulações inibiram o crescimento bacteriano por contacto direto e através da emissão de compostos orgânicos voláteis, sendo Xeu a espécie mais suscetível e a Pst a mais tolerante. Em ensaios in vivo, aplicações preventivas de OEE reduziram a severidade da doença no tomateiro em 73%, enquanto as NL-OEE foram mais eficazes após o estabelecimento da infeção, reduzindo a sintomatologia em 51%. De modo geral, os resultados demonstram o potencial do OEE, livre ou nanoencapsulado, como uma ferramenta sustentável para a proteção das culturas.

Financiamento: Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), através da bolsa de doutoramento 2021.07342.BD e do projeto de investigação PCIF/GVB/0150/2018. O trabalho beneficiou ainda do apoio da FCT/MCTES no âmbito dos Projetos Estratégicos UID/05748/2025 e UID/PRR/05748/2025 (DOI <https://doi.org/10.54499/UID/05748/2025> e <https://doi.org/10.54499/UID/PRR/05748/2025>, respetivamente), bem como da Unidade de I&D UID/50006/2025 – Laboratório Associado para a Química Verde – Tecnologias e Processos Limpos.

Melhoramento genético do pinheiro-bravo

Isabel Carrasquinho¹, Carmen Santos¹

¹Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Avenida da República, Quinta do Marquês, Edifício Florestal, 2780-159 Oeiras

E-mail: isabel.carrasquinho@iniav.pt; Carmen.santos@iniav.pt

O pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton) é atualmente a terceira espécie com maior representação no continente, ocupando cerca de 714 mil hectares em Portugal Continental (23%) da superfície florestal, depois do eucalipto com 844 mil hectares (26%) e do sobreiro com 720 mil hectares (23%).

O sucesso dos programas de reflorestação depende da disponibilidade de plantas de elevada produtividade e bem-adaptadas às condições ambientais, com destaque para uma maior resiliência a alterações nas condições climáticas mais adversas e mais tolerantes aos efeitos de pragas e doenças. O melhoramento genético é uma das ferramentas mais poderosas para atingir estes objetivos.

A primeira estratégia de melhoramento genético para o pinheiro-bravo, iniciada nos anos 60 do século passado, focou-se no aumento da produção e volume de material lenhoso, na retidão do fuste e na diminuição do grão espiralado. Mais tarde, já nos anos 90, a identificação da Doença da Murchidão do Pinheiro (DMP), em Portugal, e os fogos florestais das últimas décadas condicionaram fortemente o programa de melhoramento, não só pelo desaparecimento de vários campos experimentais, como também, pela necessidade de identificar material genético mais resistente à DMP. Recentemente, iniciou-se um novo programa de melhoramento genético focado na produção de resina, com o objetivo de reforçar a capacidade produtiva do pinhal.

Neste contexto, esta apresentação aborda a evolução do melhoramento genético do pinheiro-bravo, integrando abordagens clássicas com ferramentas modernas de biotecnologia e genética molecular. A utilização de marcadores moleculares permite caracterizar a variabilidade genética existente e apoiar a identificação de genes candidatos associados a características de interesse. A integração desta informação em programas de melhoramento assistido por marcadores contribui para uma seleção mais eficiente, acelerando o desenvolvimento de materiais genéticos mais produtivos, resilientes e adaptados às atuais exigências do setor florestal.

Novas técnicas genómicas para o melhoramento de culturas hortícolas

Rute Amaro, Beatriz Ribeiro, Diana Pimentel, Flávio Soares, Catarina Neves, Ana Margarida Fortes^{1*}

¹ BIOISI, FCUL, Campo Grande, 1749-016 Lisboa

*E-mail: amfortes@ciencias.ulisboa.pt

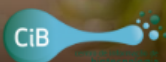
A crescente procura por culturas hortícolas resilientes ao clima, de alta produtividade e com perfil nutricional enriquecido acelerou a adopção de tecnologias moleculares avançadas no melhoramento de plantas. No laboratório de Genómica Funcional e Biotecnologia de Frutos (<https://ffgb.pt/>), aplicamos principalmente genómica, transcriptómica e metabolómica para compreender os mecanismos subjacentes a características hortícolas importantes, como a qualidade dos frutos e a tolerância a doenças. Essas tecnologias permitem identificar vias metabólicas, bem como genes determinantes que podem ser posteriormente validados com recurso a Novas Técnicas Genómicas (NGTs), como a edição genómica CRISPR-Cas. Em comparação com os métodos de melhoramento convencional, as NGTs reduzem significativamente o tempo necessário para desenvolver cultivares melhoradas, ao mesmo tempo em que aumentam a precisão e a eficiência do processo de melhoramento. Nesta apresentação, abordamos a integração de dados multiómicos com tecnologias de edição genómica aplicadas para aumentar o tempo de prateleira do tomate¹ e melhorar a tolerância a fungos patogénicos na videira e no morangueiro^{2,3}. Foram discutidos os desafios associados a cada uma dessas espécies frutícolas, nomeadamente a recalcitrância da videira ao cultivo *in vitro* e a elevada ploidia do morangueiro, o que dificulta a edição genómica. Destacou-se também que, em 17 de Junho, o Parlamento Europeu aprovou uma regulamentação histórica para flexibilizar as restrições a plantas desenvolvidas por meio de NGTs. Por fim, foram apresentadas as perspectivas futuras das ómicas e das NGTs no melhoramento moderno de frutícolas, enfatizando o seu papel na salvaguarda da segurança alimentar global e de uma produção agrícola sustentável.

Referências

1. Catarina Neves, Beatriz Ribeiro, Rute Amaro, Jesús Expósito, Jérôme Grimplet, Ana Margarida Fortes (2023). *Horticulture Research*, 10, uhac220.
2. Diana Pimentel, Rute Amaro, Alexander Erban, Nuria Mauri, Flávio Soares, Cecília Rego, José M Martínez-Zapater, Axel Mithöfer, Joachim Kopka, Ana Margarida Fortes (2021). *Journal of Experimental Botany*, 72, 6544-6569.
3. Flávio Soares, Diana Pimentel, Alexander Erban, Catarina Neves, Pedro Reis, Marcelo Pereira, Cecília Rego, Margarida Gama-Carvalho, Joachim Kopka, Ana Margarida Fortes (2022). *Horticulture Research*, 9, uhac217.

V Curso de Verão de Biotecnologia

*A inovação aplicada a espécies
agroflorestais de clima mediterrânico*



COMPONENTE PRÁTICA

PROTOCOLOS

1. Cultura *in vitro* de tecidos vegetais

1.1. Introdução à cultura *in vitro* de tecidos vegetais

A cultura *in vitro* de tecidos vegetais baseia-se no princípio da totipotência celular, segundo o qual uma célula vegetal viável, com núcleo intacto, possui a capacidade de regenerar uma planta completa quando sujeita a condições de cultura adequadas. Este conceito foi inicialmente proposto por Haberlandt no início do século XX, constituindo um dos fundamentos da biotecnologia vegetal moderna. Para que esse potencial se manifeste, é essencial garantir condições rigorosamente controladas, nomeadamente ao nível da assepsia, da composição do meio de cultura, da presença de reguladores de crescimento e das condições ambientais, como temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa.

Existem diversos sistemas de cultura *in vitro*, por exemplo, a cultura de meristemas e de segmentos nodais, a cultura células em suspensão, a cultura de anteras e micrósporos, a cultura de embriões, ou a cultura de protoplastos. A seleção do sistema mais adequado depende da espécie vegetal, do tipo de explante disponível e dos objetivos pretendidos, tais como a regeneração de plantas, a propagação clonal, a conservação de germoplasma, o melhoramento genético, ou a produção de metabolitos de interesse.

Um dos requisitos fundamentais da cultura *in vitro* é a assepsia. Todos os materiais utilizados, incluindo os meios de cultura, devem ser esterilizados de forma a evitar a introdução de microrganismos contaminantes, como bactérias e fungos. De igual modo, o material vegetal deve ser sujeito a procedimentos de desinfecção que assegurem a remoção de microrganismos presentes na sua superfície, os quais poderiam proliferar em condições *in vitro* e comprometer a eficiência do sistema. A contaminação constitui uma das principais causas de insucesso, uma vez que os microrganismos competem pelos nutrientes disponíveis e frequentemente apresentam taxas de crescimento superiores às dos tecidos vegetais, podendo ainda alterar as propriedades do meio através da libertação de metabolitos.

Outro requisito essencial consiste na utilização de um meio de cultura devidamente controlado, cuja composição é definida em função das necessidades nutricionais e fisiológicas do material vegetal. O meio de cultura corresponde a um sistema artificial constituído por nutrientes orgânicos e inorgânicos, incluindo elementos minerais essenciais (macro e micronutrientes), compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos e uma fonte de carbono, geralmente sacarose. Entre os meios de cultura mais

utilizados destaca-se o meio de Murashige e Skoog (MS), desenvolvido em 1962, que constitui ainda hoje uma referência padrão em cultura de tecidos vegetais.

A formulação do meio pode ser ajustada em função dos objetivos experimentais, sendo frequente a incorporação de reguladores de crescimento, como auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico. A proporção destes reguladores influencia processos fundamentais como divisão celular, organogénese, embriogénese somática, alongamento caulinar e enraizamento. Paralelamente, é indispensável manter condições ambientais controladas, incluindo temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo, que afetam diretamente o metabolismo e o desenvolvimento dos explantes.

A cultura *in vitro* apresenta um vasto conjunto de aplicações, diretas e indiretas, dentro das diretas, destacam-se, a micropropagação clonal, ou a obtenção de plantas isentas de patógenos e a conservação de germoplasma, nas indiretas, salienta-se, a haploidização no apoio ao melhoramento clássico ou a embriogénese somática, no apoio à transformação genética e a produção de metabolitos secundários com interesse farmacêutico, alimentar e industrial. Estas aplicações tornam a cultura *in vitro* uma ferramenta biotecnológica de elevada relevância, tanto na investigação científica como em aplicações práticas na agricultura e na conservação dos recursos genéticos vegetais.

1.2. Preparação do Meio de Cultura

No presente curso serão considerados dois sistemas de propagação de plantas, um focado na multiplicação por cultura de microestacas – Ponto 1.4, e outro na indução de rebentos adventícios (organogénese direta) – Ponto 1.5.

Para a realização de ambos os protocolos será utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), preparado a partir das soluções-mãe descritas na Tabela 1. Para além da composição base é necessário adicionar ao meio de cultura para indução de organogénese direta 0.1 mg L⁻¹ de NAA e 1 mg L⁻¹ de BAP.

1.2.1. Procedimento para preparação do meio de cultura

1. Num balão volumétrico de 2000 ml coloque aproximadamente 500 mL de água destilada;
2. Adicione o volume de cada solução stock de macronutrientes indicadas na Tabela 1;
3. Adicione da mesma forma os micronutrientes;
4. Adicione o volume correspondente à fonte de ferro;
5. Adicione a solução stock de vitaminas e mio-inositol;

6. Adicione os reguladores de crescimento;
7. Adicionar fonte de carbono;
8. Perfaça o volume de 2000 mL com água destilada.

Tabela 1: Composição basal do meio de cultura MS.

Soluções stock	Concentração (mg l ⁻¹)
Macronutrientes	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Fonte de Ferro	
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
Vitaminas	
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina.HCl	0.5
Tiamina.HCl	0.1

Uma vez concluída a preparação da solução correspondente ao de meio de cultura deverá transferir a solução para um gobelé para mais facilmente proceder à correção do pH para 5.7 Esta correção do pH deverá realizar-se com a adição de hidróxido de potássio (KOH) ou ácido clorídrico (HCl) em contínua agitação.

O meio de cultura a utilizar no Protocolo 1.4 deverá ser distribuído em tubo de ensaio, pelo que será necessário adicionar o agar ao meio ainda no gobelé, aquecer a solução até solubilização do agar para posteriormente proceder à distribuição.

O meio de cultura a utilizar no Protocolo 1.5 deverá ser distribuído em Erlenmyers de 500 mL, sendo o agar adicionado a estes, não sendo por isso necessário a etapa de aquecimento.

1.2.2. Procedimento de esterilização do meio de cultura

Os meios de cultura são esterilizados por autoclavagem a uma temperatura de 121 °C, 1 atm durante 20 minutos. Uma vez decorrido o procedimento de autoclavagem, o meio em tubos de ensaio deverá ser homogeneizado e colocado a arrefecer na câmara de fluxo.

O meio de cultura em Erlenmyer deverá ser distribuído em placas de Petri, devendo as mesmas permanecer abertas até completo arrefecimento do meio de modo a evitar a formação de condensação dentro da Placa.

Os meios de cultura deverão ser preparados com alguns dias de antecedência à sua utilização permitindo ver se o procedimento de esterilização correu bem através da inexistência de desenvolvimento de contaminações bacterianas ou fúngicas.

1.3. Desinfecção do material vegetal

O estabelecimento de culturas *in vitro* constitui um passo crítico no processo de micropropagação de todas as espécies de plantas. No caso das culturas lenhosas, o estabelecimento *in vitro* é, muitas vezes, uma etapa difícil devido à elevada percentagem de contaminações por bactérias ou fungos da superfície do material vegetal. O aparecimento destas contaminações poderá ser devido à ineficiência dos protocolos de desinfecção, ou por outro lado, ao crescimento de organismos endófitos, estes mais difíceis de controlar mesmo que otimizando protocolos de desinfecção, sendo por vezes necessária a aplicação de soluções fungicidas específicas. A presença destes microrganismos pode originar contaminações tardias, comprometendo o estabelecimento e a manutenção das culturas *in vitro* e conduzindo frequentemente à perda do material instalado *in vitro*.

A condição de assepsia exige assim a desinfecção da superfície dos explantes por utilização de diferentes agentes desinfetantes, sendo o etanol e o hipoclorito de sódio os mais utilizados. Por vezes torna-se necessário recorrer a agentes mais agressivos como o cloreto de mercúrio, os hipocloritos de cálcio e de sódio, o peróxido de hidrogénio e o nitrato de prata.

A desinfecção superficial do material vegetal é efetuada por imersão dos explantes (segmentos do caule com vários gomos axilares: Protocolo 1.4; folhas jovens: Protocolo 1.5) em soluções aquosas de diferentes agentes de desinfecção e a diferentes concentrações, as quais se encontram descritas abaixo:

1. Num frasco graduado com os explantes, adicionar etanol a 70%. Agitar durante 30 segundos;
2. Retirar o etanol e lavar os explantes com água destilada estéril;
3. Retirar água destilada estéril e adicionar algumas gotas de Tween-20 (4 gotas por cada 100ml) e a solução de hipoclorito de sódio a 10%;
4. Agitar os explantes com a solução de desinfecção, durante 20 minutos;
5. Retirar a solução e realizar 3 lavagens com água destilada estéril (até sair o excesso de espuma).

1.4. Propagação *in vitro* por cultura de microestacas

Como material vegetal serão utilizados segmentos de caule recolhidos de rebentos jovens de diferentes castas de videira (*Vitis vinifera*) estabelecidas em campo, manifestando um aspeto saudável. A instalação *in vitro* decorrerá em condições de assepsia, na câmara de fluxo laminar, com recurso a material previamente esterilizado. Os instrumentos de corte utilizados para a transferência e manipulação do material vegetal, pinças e bisturis, são esterilizados através da sua imersão em álcool etílico a 70% e por passagem pelo esterilizador de esferas de vidro a 250°C. O material vegetal a instalar *in vitro* também deverá ter sido desinfetado previamente seguido o protocolo descrito acima.

O procedimento a ser realizado para a instalação *in vitro* das culturas compreende 4 passos:

1. Retirar os rebentos do frasco, após a desinfecção, para uma folha de papel esterilizada com auxílio de uma pinça;
2. Individualizar o material vegetal em segmentos que contenham só um gomo axilar (segmentos uninodais);
3. Colocar os explantes nos tubos de ensaio com o gomo direcionado para cima;
4. Identificar tubo.

No fim, coloque os tubos de ensaio com os explantes num suporte e coloque-os numa câmara de crescimento com condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz / 8 h de escuro) e temperatura 24°±1° C.

1.5. Propagação *in vitro* por organogénese – rebentos adventícios

1.5.1. Procedimento para indução da formação de rebentos adventícios

Como material vegetal serão utilizadas folhas de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha*) provenientes de plantas mantidas em estufa. Serão selecionadas folhas saudáveis, sem sinais de contaminação, necrose ou senescência, provenientes de plantas em crescimento ativo.

Após o procedimento de desinfecção do material vegetal as folhas deverão ser transferidas dos frascos de vidro onde decorreram as diversas lavagens para placas de Petri esterilizadas, devendo esta transferência decorrer em ambiente de assepsia (câmara de fluxo laminar).

De seguida as folhas deverão ser seccionadas colocando os explantes (página abaxial em contacto com o meio de cultura) nas placas de Petri com o meio de cultura de iniciação procedendo da forma abaixo indicada:

1. Com recurso a uma pinça e um bisturi esterilizado corte um quadrado (1 x 1 cm) do centro da folha - o quadrado deve conter uma porção da nervura central da folha;
2. Coloque a secção da folha numa placa de Petri contendo o meio de cultura de iniciação de forma que a secção fique perpendicular à superfície do meio e um terço da secção esteja inserido no meio de cultura;
3. Sele as placas de Petri com película aderente e identifique-as com o seu nome, data e cultura estabelecida;
4. Coloque as culturas numa câmara de crescimento de plantas sob luz fluorescente com condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz / 8 h de escuro) e temperatura (24 °C e 27 °C).

1.5.2. Procedimento para indução de rizogénese (formação de raízes adventícias)

Aproximadamente após seis semanas de estabelecimento em meio de indução serão visíveis os rebentos adventícios (pequenas protuberâncias verdes) nas zonas de corte das folhas que se desenvolverão em pequenas plântulas. No âmbito do presente curso será fornecido material vegetal

previamente preparado com este objetivo que será disponibilizado para realização das etapas subsequentes.

Abaixo encontra-se descrito o procedimento que deverá seguir:

1. Deverá selecionar os rebentos mais desenvolvidos individualizando-os com a ajuda de uma pinça e bisturi;
2. Estabeleça cada um dos rebentos num pote contendo meio de cultura de composição basal idêntico ao inicialmente utilizado, mas desprovido de reguladores de crescimento;
3. Feche os potes e identifique-os com o seu nome, data e cultura estabelecida;
4. Coloque as culturas numa câmara de crescimento de plantas sob luz fluorescente com condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz / 8 h de escuro) e temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

1.6. Aclimação das plantas às condições *ex vitro*

As plantas regeneradas *in vitro* e que apresentem um sistema radicular bem desenvolvido serão cuidadosamente removidas dos recipientes de cultura. As raízes serão lavadas com água para remover os resíduos de meio de cultura.

Posteriormente, as plantas serão transferidas para vasos contendo um substrato adequado e mantidas em condições de elevada humidade relativa durante os primeiros dias, de forma a facilitar a adaptação às condições *ex vitro*. A humidade será gradualmente reduzida ao longo do período de aclimação.

As plantas serão mantidas em ambiente controlado, com condições adequadas de temperatura e luminosidade, sendo monitorizadas regularmente para avaliar a sua sobrevivência e crescimento.

2. Técnicas de Biologia Molecular

2.1. Introdução às técnicas de Biologia Molecular

A biotecnologia molecular de plantas constitui uma área fundamental da biotecnologia vegetal, permitindo o estudo, caracterização e manipulação do material genético das plantas com vista à compreensão dos seus processos biológicos e ao desenvolvimento de aplicações em agricultura, melhoramento genético, conservação e produção sustentável. As técnicas moleculares atualmente disponíveis são ferramentas indispensáveis para a identificação de genes, análise da expressão génica, deteção de variabilidade genética e monitorização de organismos vegetais e dos seus agentes patogénicos.

Nesta secção do livro, elaborada no âmbito do V Curso de Verão de Biotecnologia, serão abordados alguns dos principais protocolos de biotecnologia molecular utilizados em estudos com plantas e que serão explorados durante as atividades práticas do curso. Em particular, serão apresentados os procedimentos de extração de DNA genómico (DNA), uma etapa essencial para a maioria das análises moleculares, bem como os princípios e aplicações da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da eletroforese em gel.

A obtenção de DNA de elevada qualidade constitui a base de inúmeras metodologias de biologia molecular, permitindo a realização de análises genéticas, estudos de diversidade, identificação de genes e aplicação de marcadores moleculares. As diferentes variantes da PCR possibilitam a amplificação e quantificação de sequências específicas de DNA ou mRNA, enquanto a eletroforese permite a separação, visualização e análise dos fragmentos obtidos. Em conjunto, estas técnicas fornecem as ferramentas necessárias para a caracterização molecular de plantas e para o estudo da sua variabilidade genética.

Neste contexto, os marcadores moleculares assumem um papel central na biotecnologia vegetal, permitindo a identificação e caracterização da diversidade genética diretamente ao nível do DNA. A sua utilização tem revolucionado os programas de melhoramento de plantas, possibilitando a seleção precoce de características de interesse agronómico, como a resistência a doenças, a tolerância a stresses abióticos e a melhoria da produtividade e qualidade das culturas. Além disso, os marcadores moleculares são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, mapeamento de genes, identificação de variedades e análise de relações filogenéticas. O desenvolvimento de tecnologias de genotipagem de elevada precisão, particularmente aquelas baseadas em SNPs (*Single Nucleotide*

Polymorphisms), tem contribuído para acelerar o desenvolvimento de novas variedades mais resilientes e adaptadas aos desafios da agricultura moderna e das alterações climáticas.

Embora os seguintes protocolos representem apenas uma pequena parte das metodologias utilizadas em biotecnologia molecular de plantas, constituem ferramentas fundamentais e de utilização rotineira em investigação e diagnóstico molecular. Por esse motivo, a sua compreensão e execução prática assumem uma importância central na formação dos participantes deste curso.

2.2. Material vegetal e homogeneização

O primeiro passo da extração de DNA genómico consiste em romper as paredes celulares para libertar o conteúdo das células. Para isso, o material vegetal é congelado com azoto líquido e triturado num almofariz com pilão até formar um pó muito fino, que deve permanecer congelado. O material macerado deve ser armazenado a -80 °C.

2.3. Extração de DNA

2.3.1. Preparação das soluções de extração

Previamente ao procedimento de extração deverá preparar o tampão de extração num frasco previamente esterilizado, utilizando as soluções stock indicadas na Tabela 2. Todas as soluções stock devem ser previamente preparadas e esterilizadas separadamente. A solução de CTAB não deve ser esterilizada, devendo ser preparada com água destilada previamente esterilizada. Caso a solução CTAB se encontre precipitada ou caso precipite após mistura de todos os componentes para preparar o tampão, deverá ser aquecida a 65°C durante alguns minutos.

Tabela 2. Composição do tampão de extração.

Soluções stock	[solução stock]	[solução final]
Tris-HCl pH 8.0	1M	100mM
NaCl	5M	1.4M
EDTA pH 8.0	0.5M	20mM
CTAB	10%	2%
Água destilada estéril	-	-

Para finalizar o tampão de extração deve 0.2% de β -mercaptoetanol (para 10 mL adicionar 20 μ L).

O tampão de extração contém CTAB (*brometo de cetiltrimetilamônio*) para solubilizar as membranas, facilitar a precipitação do DNA e para auxiliar a remoção de polissacarídeos. Uma vez exposto a todo o conteúdo celular o DNA pode sofrer degradação, pelo que o tampão de extração deve apresentar um pH próximo de 8.0 (mantido pela adição de Tris-HCl 100mM a pH 8.0) de modo a inibir ação das DNases endógenas. Para além do pH, a inativação das DNases também é garantida pela adição de EDTA (*ácido etilenodiaminotetracético*) a 20mM. O tampão inclui ainda β -mercaptoetanol para evitar a oxidação do DNA por compostos fenólicos, e NaCl para criar condições favoráveis à sua estabilidade.

Deverá igualmente preparar a solução de tampão TE a utilizar posteriormente na eluição do DNA (Tabela 3).

Tabela 3. Composição do tampão Tris-EDTA (Tampão TE pH 8.0).

Soluções stock	[solução stock]	[solução final]	Para 10mL de tampão
Tris-HCl pH 8.0	1.0M	100mM	0.100 mL
EDTA pH 8.0	0.5M	20mM	0.020 mL
Água destilada estéril	-	-	9.880 mL

2.3.2. Procedimento de extração de DNA

1. Com a ajuda de uma espátula previamente arrefecida deverá colocar cerca de 100 mg de material vegetal no tubo de 1.5 mL previamente colocado em gelo.
2. Adicione 600 μ L de tampão CTAB ao tubo de 1.5 mL onde colocou o material vegetal macerado.

Nota: Este procedimento bem como todos os passos que se seguem deverão ser realizados na Hotte.

3. Homogeneizar o material vegetal com a solução de extração agitando o tubo vigorosamente (utilizar vórtex) durante 30 seg.
4. Coloque o tubo no banho seco a 65°C durante 20 min, misturando por inversão a cada 5 min.
5. Adicione 600 μ L da solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Esta solução tem como função desnaturar as proteínas permitindo a sua separação da fase aquosa onde se encontra o DNA.
6. Misture vigorosamente (utilizar vórtex) durante 5 seg.
7. Centrifugue 10 min a 16000 rpm.

8. Identifique um novo tubo de 1.5 mL e adicione 800 μ L de etanol absoluto a -20°C mantendo o tubo em gelo.
9. Recupere a fase aquosa (superior) para o tubo onde previamente contém o etanol e misture cuidadosamente por inversão.
10. Se os filamentos forem claramente visíveis poderá transferi-los diretamente para um novo tubo com o auxílio de um ponta de micropipeta, em caso contrário centrifugue a solução durante 10 min a 16000 rpm.
11. Descarte o sobrenadante.
12. Adicione ao precipitado (DNA) 500 μ L de etanol a 70% previamente arrefecido em gelo (ou armazenado a 4°C) e misture com toques de dedo para soltar o DNA.
13. Centrifugue durante 10 min a 16000 rpm.
14. Deixe secar o precipitado à temperatura ambiente.

Nota: O DNA deverá ficar bem seco, uma vez que a existência de resíduos de etanol poderá inibir a ação de enzimas a utilizar nos trabalhos subsequentes (DNA polimerases ou enzimas de digestão).

15. Adicione ao precipitado 100 μ L tampão de eluição TE (pH 8.0).
16. Adicione 1 μ L de RNase A e incube a 37°C com agitação suave (125 rpm) durante algumas horas.

2.4. Quantificação e análise da pureza da solução de DNA

Após o procedimento de extração é necessário proceder à determinação da concentração da solução de DNA, avaliar a pureza da solução e integridade do DNA. Para determinação da concentração e pureza da solução deverá recorrer-se à técnica de espectrofotometria, utilizando para tal um equipamento de NanoDrop (Thermo) ou similar. Estes parâmetros são determinados utilizando entre 1 e 2 μ L da solução de DNA. Previamente deverá ser realizada uma medição controlo (branco) com a solução em que foi eluído o DNA.

A concentração dos ácidos nucleicos, neste caso o DNA, são lidos a uma absorvância de 260 nm, enquanto a pureza é avaliada pelos rácios A260/280 e A260/230. Uma amostra de DNA puro apresenta valores de A260/280 próximos de 1,8 e de A260/230 entre 2,0 e 2,2. Valores inferiores indicam contaminação por proteínas ou compostos fenólicos, respetivamente, alterando o perfil esperado da curva de absorvância de A260/230 entre 2,0 e 2,2.

2.5. Solução de trabalho de DNA

Após a quantificação, é comum preparar uma solução de trabalho de DNA com uma concentração padronizada (por exemplo, 10 ng/ μ L). Esta estratégia permite utilizar quantidades uniformes de DNA nas diferentes aplicações experimentais, reduz o risco de contaminação ou degradação da amostra original, minimiza erros de pipetagem e evita ciclos repetidos de congelação e descongelação da solução stock de DNA.

Esta solução é preparada diluindo a solução de DNA extraído previamente. O volume a utilizar dependerá da concentração determinada no ponto anterior. Deverá preparar apenas um volume de solução de trabalho adequado para os trabalhos posteriores, mantendo a solução stock armazenada.

2.6. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) é uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular, permitindo a amplificação específica de regiões de DNA e a obtenção de milhões de cópias de uma sequência-alvo num curto período de tempo. Esta técnica tira partido da capacidade de enzimas DNA polimerases, que toleram elevadas temperaturas sem degradar, realizarem a replicação *in vitro*.

Ao contrário da maquinaria da replicação que tem associadas enzimas com funções diferentes (desnaturação, estabilização das cadeias simples, amplificação, etc.), a PCR depende exclusivamente da atividade da DNA polimerase. Conhecendo as propriedades físico-químicas das moléculas de DNA, foi possível substituir a ação destas enzimas pela utilização de ciclos de temperatura. Em cada ciclo de reação, as moléculas são duplicadas levando a uma amplificação exponencial do DNA, sendo cada ciclo constituído por três fases:

1. **Desnaturação (94-98°C):** nesta etapa, a dupla hélice do DNA é separada em duas fitas simples através do aumento da temperatura, quebrando as ligações de hidrogénio entre as bases nitrogenadas.
2. **Annealing (50-65°C):** a enzima Taq polimerase necessita de um ponto de partida para iniciar a síntese de DNA. Esse ponto de partida é dado pelos *primers* que se ligam a cada uma das cadeias simples de DNA. Para tal, é necessário diminuir a temperatura para intervalos entre 50-65 °C, consoante a composição da sequência dos *primers* a utilizar.

3. Extensão (72°C): O ciclo completa-se com a síntese de DNA pela enzima DNA polimerase.

Utilizando os nucleótidos livres adicionados à solução, esta enzima faz a elongação dos *primers* usando como molde a cadeia a que cada *primer* está ligado, sempre no sentido de 5'→3'.

Com esta técnica é possível obter uma grande quantidade de DNA alvo a partir de uma mistura complexa em que o mesmo pode estar presente numa cópia única. Devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, a PCR constitui uma ferramenta fundamental em diversas áreas da biotecnologia, incluindo a genotipagem, a identificação de organismos, a deteção de genes de interesse e a utilização de marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares correspondem a sequências específicas de DNA que permitem identificar diferenças genéticas entre indivíduos ou confirmar a presença de determinadas características genéticas. Na biotecnologia vegetal, estes marcadores são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, identificação de variedades, seleção assistida por marcadores e validação de eventos de transformação genética.

2.6.1. Protocolo de PCR

Uma PCR necessita essencialmente de:

- uma amostra de DNA que apresenta a sequência que se pretende amplificar.
- dois oligonucleótidos iniciadores (do inglês *primers*) correspondentes a pequenas sequências de nucleótidos (~20 nts) que funcionam como ponto de partida para a síntese das novas cadeias de DNA na região de interesse. Na região a 5' do fragmento de interesse estará posicionado o *primer forward* e na região 3' o *primer reverse*.
- quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dATP: desoxiadenosina trifosfato, dTTP: desoxitimidina trifosfato, dCTP: desoxicitidina trifosfato e dGTP: desoxiguanosina trifosfato) – dNTPs.
- enzima DNA polimerase responsável pela síntese das novas cadeias (*Taq* DNA polymerase).
- tampão da enzima, responsável pela manutenção de um ambiente ótimo para que a enzima apresente a sua máxima eficiência. Este tampão é específico de cada enzima sendo por isso fornecido pela empresa aquando da aquisição da enzima.
- magnésio Mg^{2+} , geralmente adicionado sob a forma de $MgCl_2$, é um cofator essencial para a atividade da DNA polimerase. A concentração de $MgCl_2$ deve ser otimizada, uma vez que

concentrações insuficientes podem reduzir ou impedir a amplificação, enquanto concentrações excessivas podem promover amplificações inespecíficas e a formação de produtos secundários, como dímeros de *primers*.

Para a realização da PCR, deverá preparar a reação num tubo de 0,2 mL, adicionando os reagentes de acordo com os volumes e concentrações apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Concentrações dos stocks dos componentes de PCR.

Soluções stock	Concentração
Supreme NZYTaqlI® Buffer	10x
MgCl ₂	50 mM
PCR Nucleotide Mix (dNTPs)	10 mM
primer <i>forward</i>	10 µM
primer <i>reverse</i>	10 µM
Supreme NZYTaqlI® DNA Polimerase	5 U/µL
DNA	10 ng/µL
Água nuclease-free	-

Tabela 5. Concentrações e volumes da mix de PCR.

Soluções stock	Concentração	Volume a pipetar (µL)
Supreme NZYTaqlI® Buffer	1x	5
MgCl ₂	3 mM	3
PCR Nucleotide Mix (dNTPs)	0.2 mM	1
primer <i>forward</i>	200 nM	1
primer <i>reverse</i>	200 nM	1
Supreme NZYTaqlI® DNA Polimerase	2.5 U	0,5
DNA	40 ng	4
Água nuclease-free	-	34,5

O programa que deverá considerar no termociclador é o que se encontra na Tabela 6.

Tabela 6. Programa da corrida de PCR.

Ciclo de PCR	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	35
Hibridação	54°C	30 seg	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	10 min	1

2.7. Eletroforese

A eletroforese realizada com DNA baseia-se na migração de moléculas ionizadas sob a ação de um campo elétrico, permitindo a sua separação de acordo com o tamanho (peso molecular) de diferentes fragmentos em solução. Esta técnica é fundamental para a análise dos resultados de diversos protocolos de biologia molecular, como a PCR e a análise de padrões de restrição gerados pela utilização de enzimas de restrição. Além da separação dos fragmentos de tamanho diferentes, a eletroforese permite que fragmentos de interesse sejam recuperados e posteriormente purificados, possibilitando a utilização desses fragmentos em aplicações subsequentes, como reações de ligação ou recombinação em vetores de clonagem, bem como em procedimentos de sequenciação.

Sendo o DNA uma molécula com carga negativa, todas as moléculas presentes numa solução de reação (ex. produto de uma PCR) irão migrar em direção ao pólo positivo (ânodo). Se existirem moléculas de pesos moleculares diferentes será possível realizar a sua separação na matriz utilizada, sendo que as moléculas de menores dimensões (menor peso molecular) migram mais rapidamente que moléculas de tamanhos superiores, sendo por isso observadas mais afastadas do ponto em que a amostra foi carregada.

2.7.1. Procedimento para a realização da eletroforese

1. Pesar a agarose necessária para preparação de 100 ml de gel a 1%. O gel é preparado geralmente com agarose (extraída de algas marinhas) mas em casos muito específicos poderá ser de outro tipo, como por exemplo de acrilamida (trabalhos que exigem elevada resolução). A concentração do gel de agarose pode variar, sendo comumente utilizado uma concentração menor (0.8%) quando se avaliam moléculas de maiores dimensões (ex. análise da integridade de DNA genómico) e concentrações maiores quando se avaliam moléculas de menores dimensões (normalmente entre 1.2% e 2%).
2. Colocar 100 ml de tampão de eletroforese Tris-acetato-EDTA (TAE) ou Tris-borato-EDTA (TBE) (0.5X) num frasco que permita ser fechado (evitar a evaporação de modo a evitar a alteração da concentração). Esta solução fornece as condições ideais para a passagem da corrente elétrica (permitindo a migração das moléculas de DNA) e a manutenção do pH (importante para que o DNA não sofra degradação). O tampão de eletroforese é previamente preparado a uma concentração de

50x sendo a partir desta solução preparada a solução de trabalho, normalmente a uma concentração de 1x ou 0.5x.

3. Adicionar a agarose previamente pesada ao tampão de eletroforese e levar a solução ao micro-ondas até ferver obtendo uma solução translúcida.
4. Deixar a solução arrefecer e adicionar 2 µL de GreenSafe (NZytech) homogeneizando de seguida. O GreenSafe, devido à sua capacidade de ligação ao DNA, é um dos corantes fluorescentes mais utilizados para visualização das bandas quando o gel é exposto à luz UV.
5. Montar o sistema de eletroforese colocando o pente no berço, o qual permitirá formar os poços onde as amostras serão carregadas. O tamanho do berço, o número de poços e a sua espessura, variam com o número de amostras a analisar e com o volume que se pretende carregar em cada poço.
6. Verter a solução do gel para o berço tendo o cuidado de retirar as eventuais bolhas de ar com a ajuda de uma ponta de micropipeta.
7. Deixar arrefecer durante 20 – 30 min de modo que fique devidamente solidificado.
8. Retirar o pente e colocar o gel na tina de eletroforese onde já foi colocado tampão de eletroforese de igual composição ao utilizado para preparação do gel. O gel deverá ficar completamente submerso.
9. Carregar 10 µL da solução reação de PCR no poço do gel. Caso o tampão da polimerase utilizada no PCR não tiver tampão de amostra (*loading buffer*) é necessário adicionar este tampão separadamente à reação de PCR antes da corrida eletroforética. O tampão de amostra, ao apresentar na sua composição glicerol, dar densidade à amostra permitindo que a mesma permaneça no fundo do poço, evitando assim a sua dispersão no tampão de eletroforese. Adicionalmente, contém um ou mais corantes de migração (por exemplo, Azul de Bromofenol ou Orange G), que conferem cor à amostra e permitem acompanhar visualmente o progresso da corrida eletroforética.
10. Carregar 3 µL de marcador molecular disponibilizado durante o curso. A corrida simultânea das amostras com um marcador molecular permite-nos determinar o tamanho dos fragmentos de interesse. O marcador molecular deve ser selecionado de acordo com o tamanho das bandas esperadas.
11. Fechar a tina de eletroforese e ligar a fonte a 80V.
12. O gel poderá ser analisado num transiluminador (luz UV) após cerca de 45 min de corrida.