



Biotización del pino piñonero

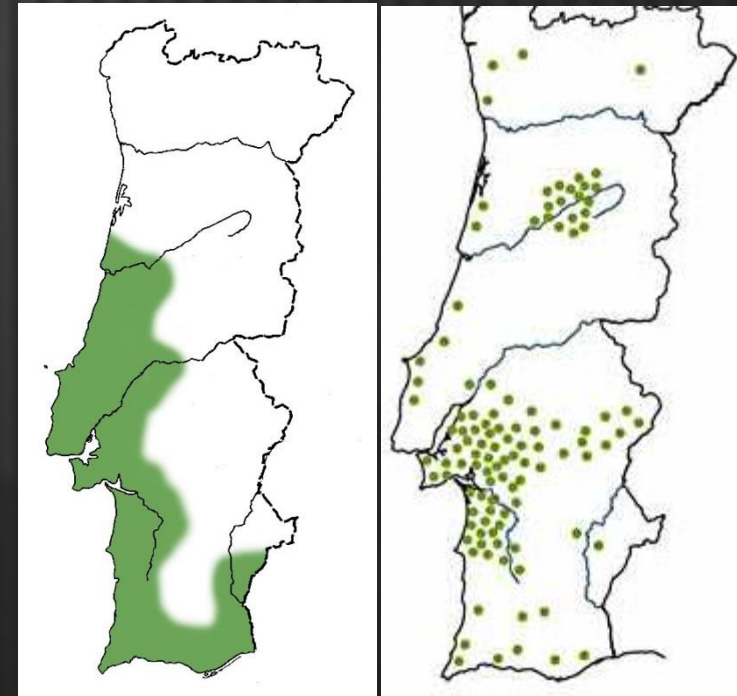
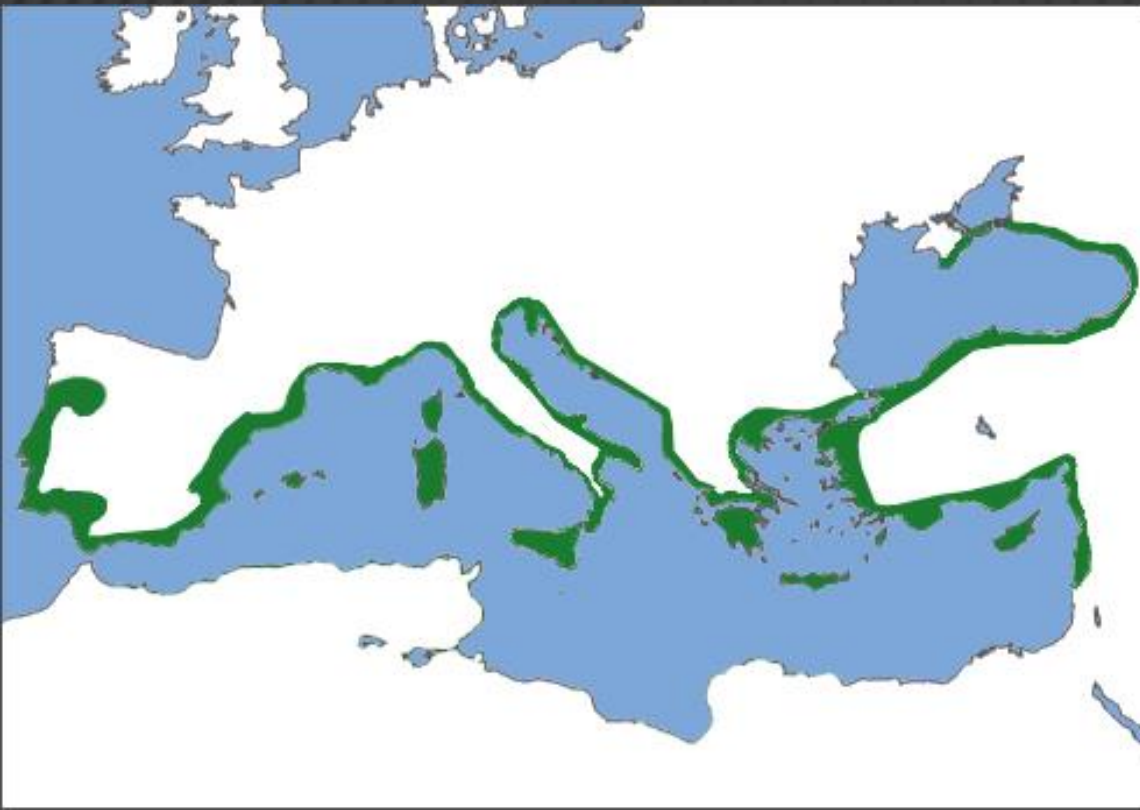
Pinus pinea L



INTRODUCCIÓN

Pinheiro manso (*Pinus pinea* L.)

Stone pine,
Italian stone pine,
Umbrella pine
Parasol pine
Pino piñonero



Mediterranean pines

Mediterranean (some into Asia)

Pinus brutia - Calabrian Pine-Turkish Pine

Pinus canariensis - Canary Island Pine

Pinus halepensis - Aleppo Pine

Pinus heldreichii - Bosnian Pine

Pinus mugo - Mountain Pine

Pinus nigra - European Black Pine or Austrian Pine

Pinus peuce - Macedonian Pine

Pinus pinaster - Maritime Pine

Pinus pinea - Stone Pine

Pinus sylvestris - Scots Pine

Pinus eldarica or *Pinus brutia* subsp. *Eldarica*, Elder Pine; Mondell Pine; Ider Pine.



**MEDPINE 4: 4th International Conference on Mediterranean Pines
Conservation, Ecology, Restoration and Management of Mediterranean Pines and
their Ecosystems: Challenges under global change**



Costa de la luz (Spain)



Palma de Mallorca (Spain)



Near Rome (Italy)



Greece



La Maremma (Italy)



Sancti Petri (Spain)



Coliseo Rome (Italy)



Rome (Italy)



Camogli - Mar Ligure *Viva Pinus*



Peloponnese-Greece



Península de Setúbal-Portugal



Arcachon-France



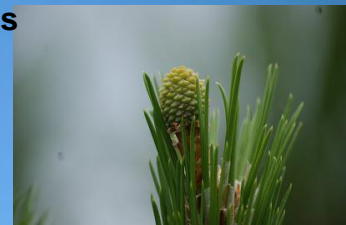
Alcácer do Sal-Portugal

Piñones: alto valor nutricional, con un elevado porcentaje de proteínas; de calcio, hierro, fósforo y potasio y micronutrientes. Vitaminas del complejo B y E. Sin colesterol. Ricos en ácidos grasos insaturados. Ricos en antioxidantes Omega 3 y 6



**Pinõn; Pinhãõ;
Pinoli**

La madera es muy dura y resinosa, y altamente impermeable. Los troncos producen buenas vigas utilizadas en la construcción de durmientes de ferrocarril y en la industria naval.



Usado desde la antigüedad por su belleza en jardines (densa sombra). Alto valor paisajístico y ecológico



La cáscara es usada para extracción de taninos para la industria de cueros.



La resina tiene un leve perfume a limón, siendo apreciada en perfumería



La cascara de las semillas y las escamas de las piñas son aprovechadas para la producción de combustibles de caldera y para la producción de biomasa (biodiesel)

Fijación de dunas costeras y en suelos sin estructuras



Particularidades de esta **Arqueófita** (originada em el Plioceno)

An Iberian perspective on Upper Paleolithic plant consumption. Plant use by prehistoric Mediterranean hunter-gatherers

Jonathan A. Haws

Universidade do Algarve / University of Louisville

Cataluña: (**9,760 hasta el presente**) numerosos restos de semillas diversas, frutos silvestres y semillas de pino piñonero recuperadas de cuevas. (Hunters-gatherers.

Olària *et al.* (1988) recoje semillas de pino, bellotas y avellanas en Cova Fosca (**9,460 bp**).

Teofrasto (**372 a.C. — 287 a.C.**) – considerado como el padre de la Taxonomía - hace mención em sus estúdios al llamado “Pino doméstico”.

El poeta romano Ovídio (**séc. I a.C.**) se refiere también em su obra “Ars Amatoria” (El arte del amor) las propiedades afrodisíacas de las semillas de este pino

Galeno (séc. II d.C.) sugiere una mezcla de pinoli com miel y almendras para mejorar el desempeño sexual.



As Naus que dobraram o Cabo da Boa Esperança (1488) tiveram na sua construção pinheiros mansos de Alcácer do Sal , tendo o próprio Bartolomeu Dias escolhido as árvores.

Productividad

Portugal: 78 mil ha. de pino piñonero;

Cada ha de pino piñonero produce aprox. 250 Kg de piñas; si es injertado hasta 1000 Kg./ha.

Producción media anual de piñas en Portugal: 73.000 tn (60-70 millones de piñas).

Ganancias totales productores/año: 20 millones Euros

Ganancias totales industria: 40 millones Euros.

Cada año se producen entre 600 a 700 tn de piñones (sin cascara) en Portugal, siendo 90% exportado, principalmente para Italia y España.

En 2013 el piñon alcanza niveles históricos, que llegan a los 100 euros por Kg



BACKGROUND Y OBJETIVOS

- ❑ En **1988** la Estación Forestal Nacional (EFN, Oeiras) lanza un programa de investigación con el fin de mejorar genéticamente la calidad y la cantidad de piñones producidos (Barreira e Alpuim 1988): **PAMAF 2090** "Melhoria de *P. pinea* L. para a produção de sementes comestíveis no Sul de Portugal" y **212 PIDDAC** "Melhoria de *P. pinea* L. para produção de pinhão" (Estação Florestal Nacional).
- ❑ Casi 10 años después (**1997**) se inician estudios de micropropagación financiados pelo PAMAF 2090 en el LMBV del ICAAM, UE
- ❑ En los años 90 también se inician estudios en esta especie en España (García-Ferriz et al. 1994; Gonzalez et al., 1998) e na Itália, Capuana e Gianini (1995).
- ❑ Entre **2000 a 2010**, se mejoran protocolos de micropropagación en la región de la Península Ibérica. (Valdés et al. 2001, Ordás et al., 2000; Moncalean et al. 2005, Alonso et al. 2006, Cortizo et al. 2009); en Portugal nuestro grupo comienza a publicar os primeros resultados en 2003 (Oliveira et al. 2003).

Existem 20 especies de pinos que producen semillas comestíveis (*P. koraiensis*, *P. Sibirica* y *P. pinea* son conocidos internacionalmente por sus semillas comestibles, las otras especies son usadas para consumo de las poblaciones locales.



	Species	Shape
A	<i>P. armandii</i> ^c	Oval-shaped, flattened at tip, some with ridge
K	<i>P. koraiensis</i> ^c	Corn-kernel, some more rounded at the base, narrow tip
S	<i>P. sibirica</i> ^c	Plump egg-shape, similar size to <i>P. armandii</i> but rounder
P	<i>P. pinea</i> ^e	Long plump, one side usually more curved than the other
G	<i>P. gerardiana</i> ^b	Long cylindrical, some resemble <i>P. pinea</i> but are longer
M	<i>P. massoniana</i> ^c	Small tear drops / corn-kernels, like miniature <i>P. sibirica</i>
U1	<i>P. yunnanensis</i> ^{c,*}	Plump egg-shaped, rounded version of <i>P. armandii</i>
U2	<i>P. pumila</i> ^{c,*}	Tiny, shaped like sesame seeds

Pine nuts can cause taste disturbances, lasting from a few days to a few weeks after consumption

PNS: PINE NUT DISTURBANCES

^a from Mediterranean region (Italy, Turkey, Spain, etc); ^b f
^{*} identity based on declarations of sample provider, not y

PRIMEROS ESTUDIOS

Effects of Carbon Source, Carbon Concentration and Culture Conditions on in vitro Rooting of *Pinus pinea* L. Microshoots (2007; Acta Horticulturae 812)

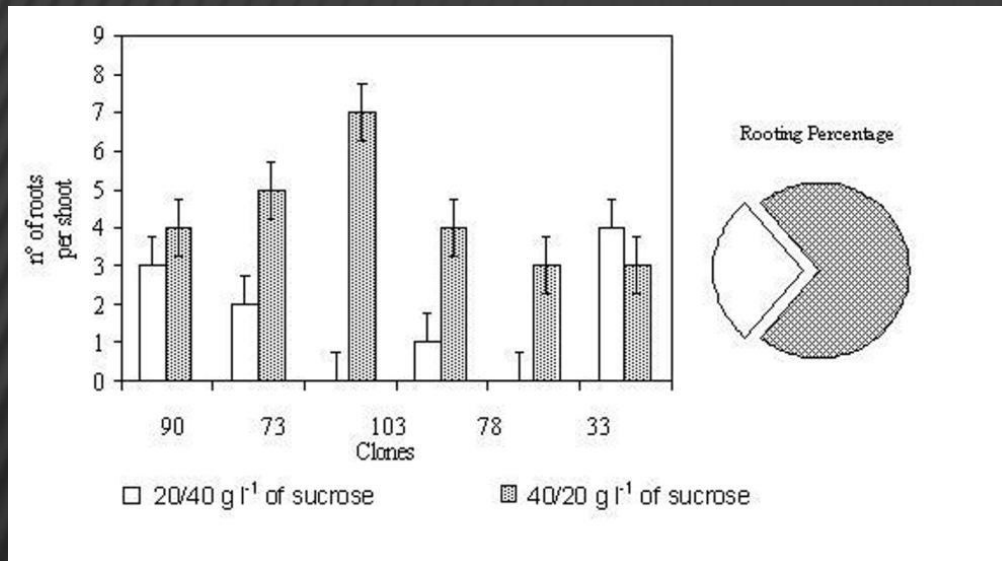


Fig.1. Effect of sucrose concentration in the induction and expression phases on the number of roots formed per clone ($p < 0.05$) and in the total percentage of rooted plantlets for the tested concentrations

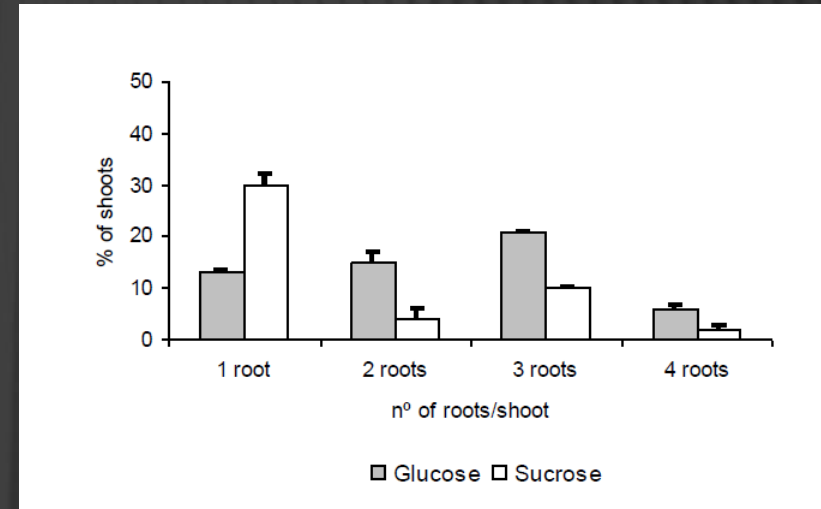
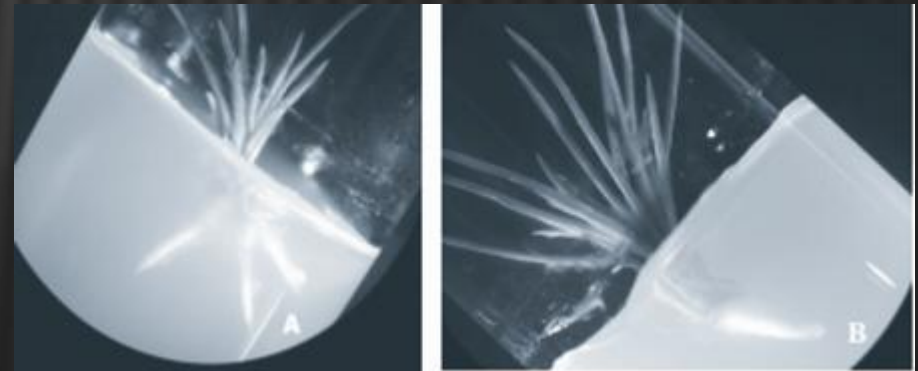


Fig. 2. Percentage of shoots that formed 1, 2, 3 or 4 roots on sucrose or glucose supplemented media

Fig. 3. Glucose induced the formation of various roots per shoot (A), while sucrose formed preferentially one well defined root.



Factor luz

- ❖ Fig 1. Enraizamento de rebentos de *P. pinea* em diferentes qualidades e intensidades de luz.

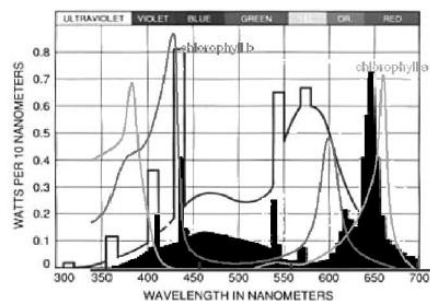
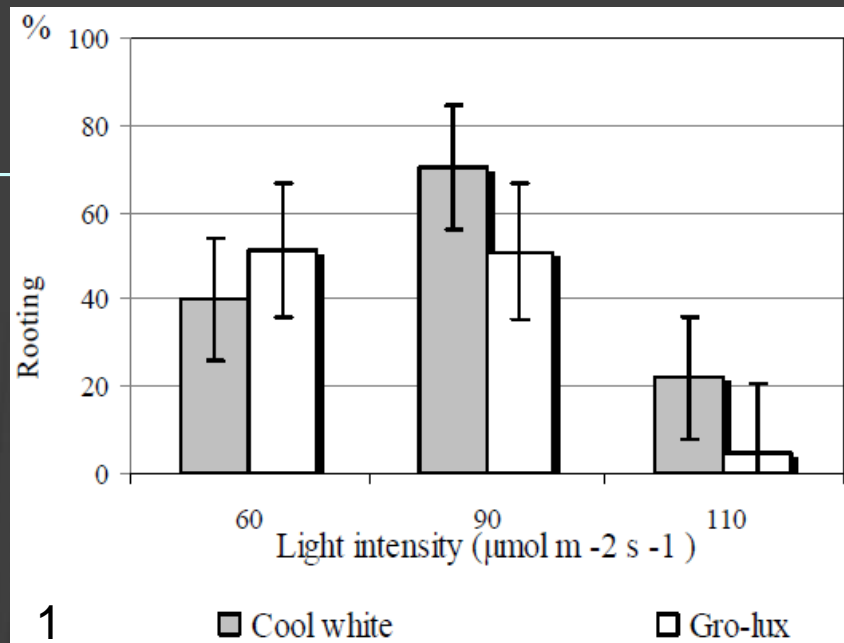
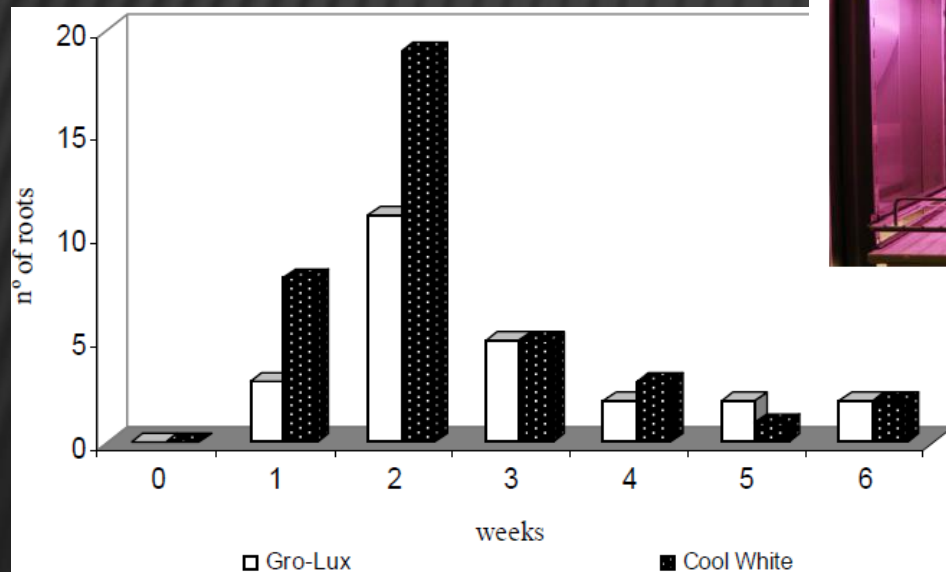


Fig. 1. Spectra of Sylvania Gro-lux lamps (white) and Philips Cool-white lamps (black).



- ❖ Fig 2. Número de raízes produzidas por semana, considerando todos os rebentos para cada tratamento de luz sob Cool-white e Gro-Lux a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors

Carla Ragonezi · Krystyna Klimaszewska ·
Mário Rui Castro · Mónica Lima · Paulo de Oliveira ·
Maria Amely Zavattieri

Received: 23 December 2009 / Revised: 22 July 2010 / Accepted: 18 August 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In conifers, vegetative propagation of superior genotypes is the most direct means for making large genetic gains, because it allows a large proportion of genetic diversity to be captured in a single cycle of selection. There are two aims of vegetative propagation, namely large-scale multiplication of select genotypes and production of large numbers of plants from scarce and costly seed that originates from controlled seed orchard pollinations. This can be achieved, in some species, either through rooted cuttings or rooted microshoots, the latter regenerated through tissue culture in vitro. Thus far, both strategies have been used but often achieved limited success mainly because of difficult and inefficient rooting process. In this overview of technology, we focus on the progress in defining the physical and chemical factors that help the conifer cuttings and microshoots to develop adventitious roots. These factors include plant growth regulators, carbohydrates, light quality, temperature and rooting substrates/media as major variables for

development of reliable adventitious rooting protocols for different conifer species.

Keywords Cuttings · Gymnosperms · In vitro culture · Micropropagation · Microshoots

Abbreviations

ACC	1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
AOA	Aminoxyacetic acid
ARF	Adventitious root formation
AVG	Aminoethoxyvinylglycine
BA	6-Benzyladenine
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CW	Cool white light
DCR	Gupta and Durzan (1985)
GA ₃	Gibberellic acid
GD medium	Gresshoff and Doy (1972)
GL	Growth-lux
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
L9 medium	Ewald (2007b)
LP medium	Quorin and Lepoivre (1977)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MS medium	Murashige and Skoog (1962)
NAA	Naphthalene acetic acid
PGR	Plant growth regulator
PPFD	Photosynthetic photon flux densities
PS medium	<i>Pinus strobus</i> medium-Tang and Newton (2005a)
PBZ	Paclitaxel
RD	Red-rich daylight
RIM medium	Abo El-Nil (1982)
RW medium	Risser and White (1964)
SH medium	Schenk and Hildebrandt (1972)

Communicated by M. Buckeridge.

C. Ragonezi · M. R. Castro · M. Lima · M. A. Zavattieri (✉)
Laboratory of Breeding and Plant Biotechnology,
Institute of Mediterranean Agricultural Sciences,
University of Évora, 7002-554 Évora, Portugal
e-mail: zavattieri@uevora.pt

K. Klimaszewska
Natural Resources Canada, Canadian Forest Service,
Laurentian Forestry Centre, 1055 du PEPS, P.O. Box 10380, Stn.
Sainte-Foy, Québec, QC G1V 4C7, Canada

P. de Oliveira
Laboratory of Soil Microbiology,
Institute of Mediterranean Agricultural Sciences,
University of Évora, 7002-554 Évora, Portugal

Revisão da bibliografia

- ✓ La propagación de la mayoría de las coníferas es limitada por la fase de enraizamiento.

-
- ❖ Aun cuando los protocolos se habían establecido para las diferentes fases de la cultura in vitro del pino piñonero y ajustado muchos de los factores de crecimiento in vitro el número final de plantas aclimatadas era muy bajo debido a un **escaso nº de plantas enraizadas**.
 - ❖ En estudios paralelos, el grupo del LMBV demuestra que **algunos hongos podrían** ayudar a superar esta dificultad: la co-cultura con un sistema de bi-camada o bifásico fue creado para rescatar el crecimiento de la raíz, con una transición bien sucedida para las fases de aclimatación (Oliveira et al. 2003).
 - ❖ Estos resultados abrieron un nuevo campo en el estudio de los efectos benéficos de microorganismos en mejorar las fases de enraizamiento y aclimatación. Así en **2007**, la Fundación para a la Ciencia y la Tecnología (**FCT**) nos financia el proyecto para estudiar el crecimiento radicular y los señales bioquímicos que se establecen entre la planta y los hongos para dar inicio a las relaciones simbióticas.

DEFINICIÓN DE BIOTIZACIÓN

- El co-cultivo de plantas con microorganismos benéficos produce cambios en el desarrollo y también cambios metabólicos en las plantas derivadas, las que mejoran su resistencia a factores de stress biótico y abiótico. Estos cambios en la resistencia y performance de las plantas causadas por los inoculantes es referida como BIOTIZACIÓN.
- Existen suficientes evidencias experimentales con bacterias (bacterización) y con micorrizas arbusculares (micorrización) para recomendar la utilización de esta técnica en la micropropagación comercial

METODOLOGIA

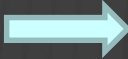
Producción de plantulas de pino *in vitro*



Geralmente sem crescimento posterior



Recolección de las fructificaciones de los hongos



Lactarius deliciosus



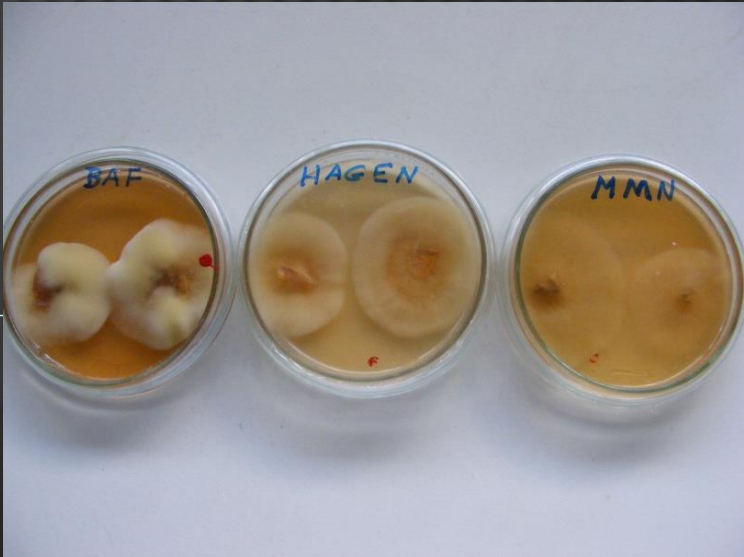
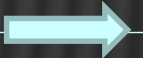
Amanita



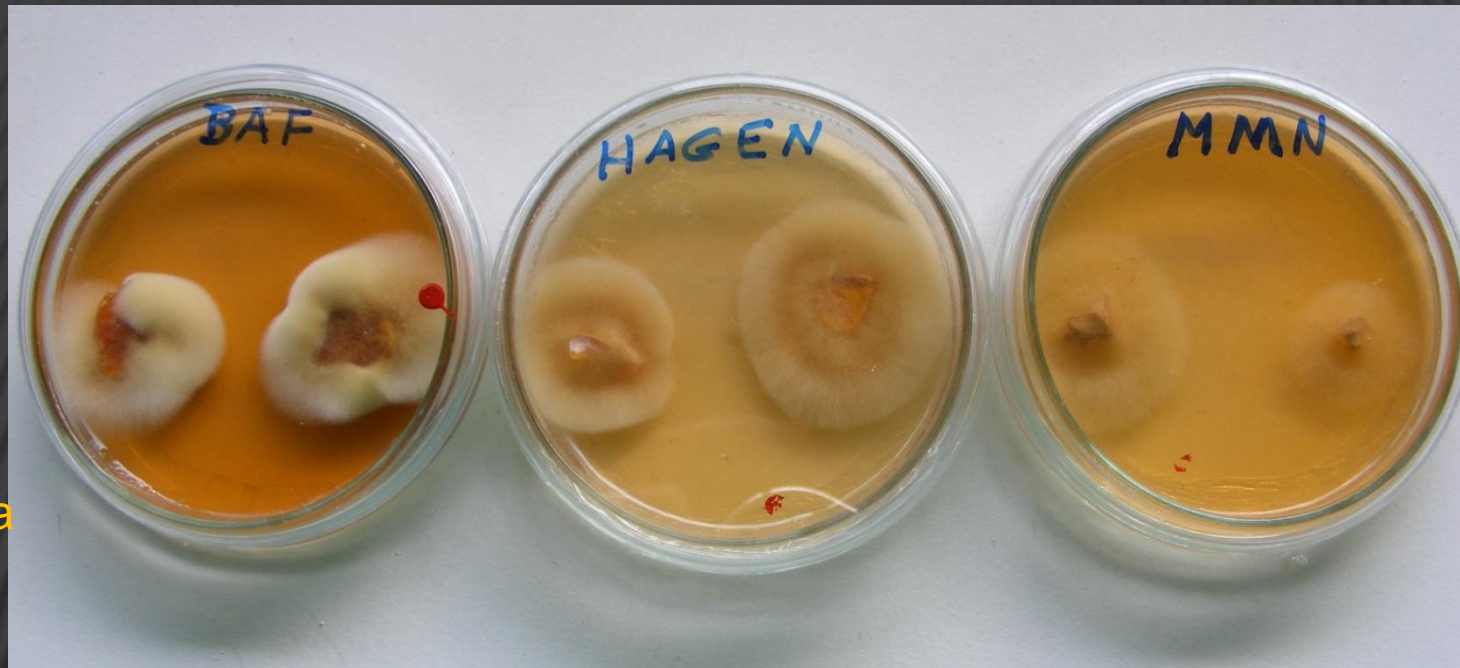
Pisolithus



Russula



Micelio aislado de las fructificaciones de los hongos (testes de varios medios de cultura)



Esto para
todos los
hongos
colectados a
campo

Table 1 . Media del diametro del micelio (cm) de *P. arhizus* en tres medios de culivo diferentes

Dias despues de la inoculación	BAF	Hagen	MMN	F(Anova)	P(Anova)
7	1.71 ± 0.09 a	1.49 ± 0.13 a,b	1.14 ± 0.08 b	7.94	0.003
14	3.31 ± 0.21 a	3.18 ± 0.08 a	2.81 ± 0.13 a	2.97	0.073

Identificação dos isolados e preparação de uma coleção de fungos

Depósito de seqüências no NCBI



DNA foi amplificado utilizando o primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3')

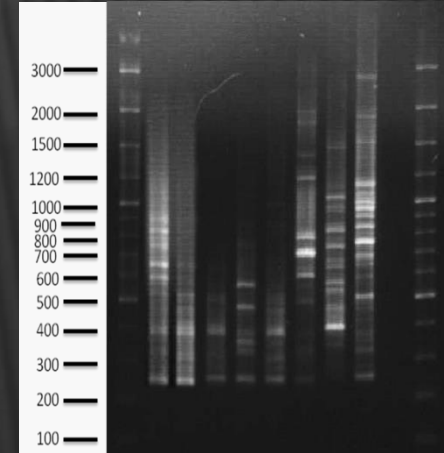
Denaturação: 5min at 94°C

Amplificação: 1min at 94°C

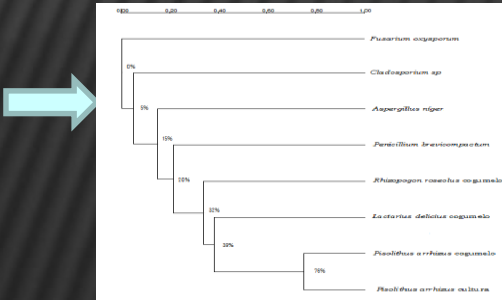
1 min at 50°C

2 min at 72°C

Extensão: 6 min at 72°C



Extração de DNA feita pelo método de microesferas modificado



Lactarius deliciosus isolate UEZB1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JQ066791.1

AUTHORS Ragonezi,C., Caldeira,A.T., Martins,M.R., Salvador,C., Santos-Silva,C., Ganhao,E., Klimaszewska,K. and Zavattieri,A. TITLE Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from Mediterranean pine stands in Portugal

Análises filogenéticas foram realizadas utilizando o método UPGMA (Quantity one 1 – análise de DNA)

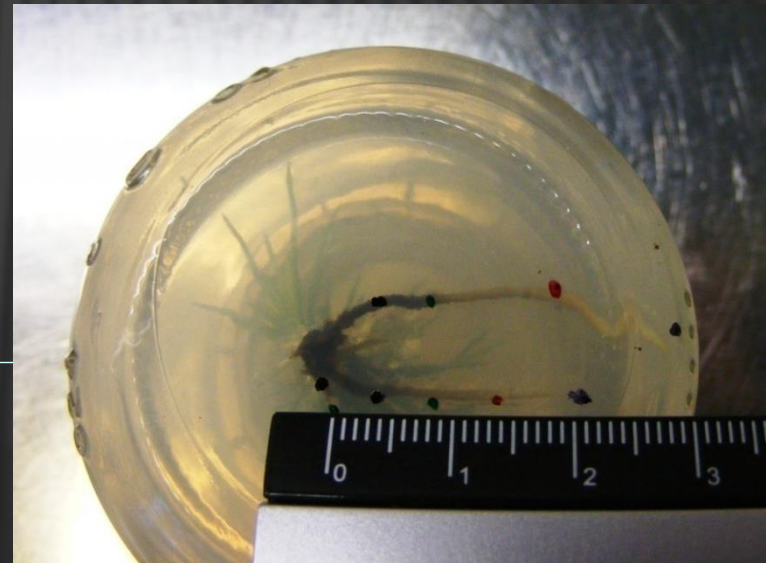
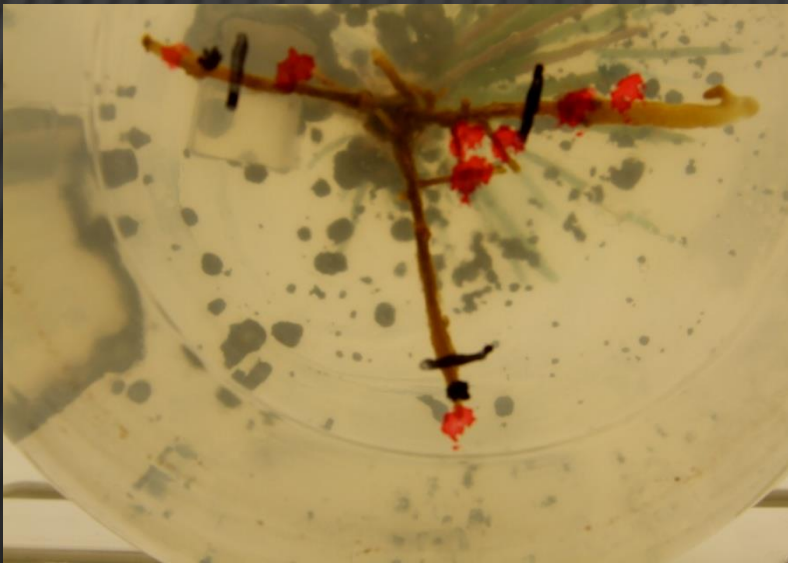
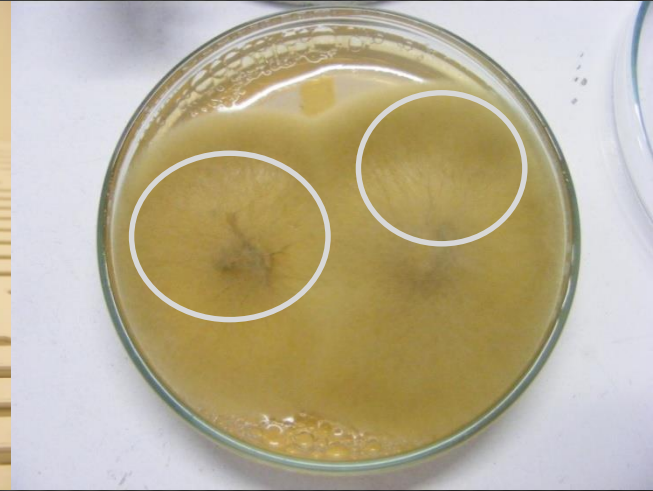
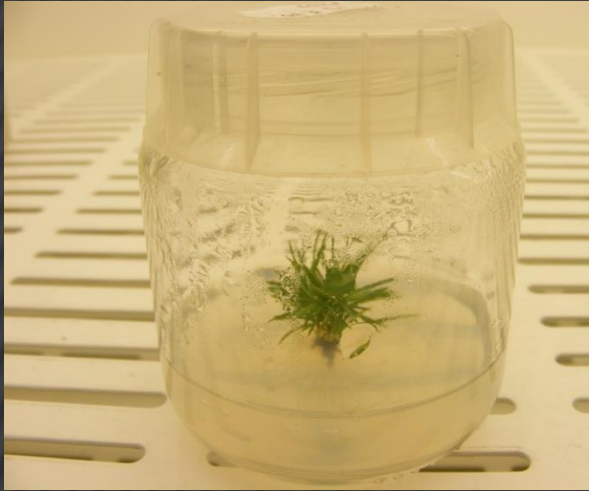
Pisolithus sp. P1001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: HQ896485.1

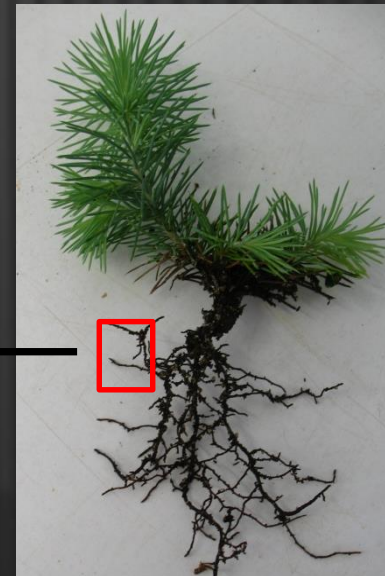
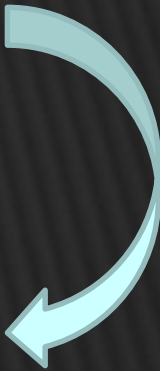
AUTHORS Ragonezi,C., Caldeira,A.T., Martins,M.R., Salvador,C., Santos-Silva,C., Ganhao,E., Klimaszewska,K. and Zavattieri,A. TITLE Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from Mediterranean pine stands in Portugal

CO-CULTURA

Inoculación in vitro en medio bi-camada y toma de datos comparativos del efecto de cada hongo ECM



Aclimatación y estudios anatómicos e histológicos de las micorrizas con micrótopo de congelación y con ultramicrótopo



Preparación de las micorrizas en glutaraldeído y sacarosa. Bloques de gelatina; corte a -30°C

Micrótopo de congelación Leica 3050 S

Aclimatación

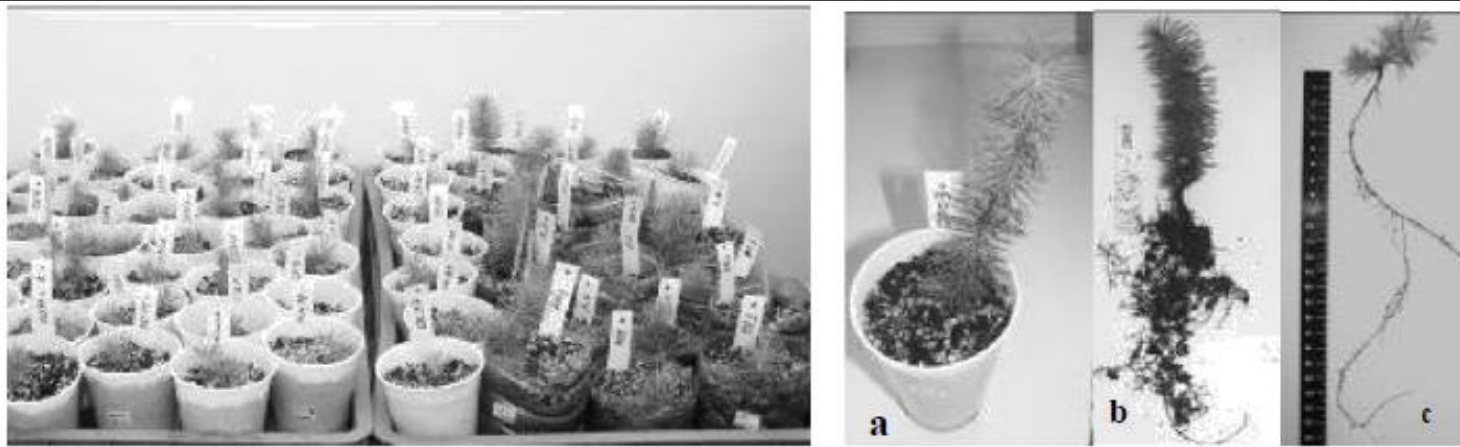


Fig. 3. Left: Rooted plants in the acclimation phase. Plants after 4 month in the acclimation phase. (a) Inoculated pine plant, identified as DD03, shows a good development of the aerial part and (b) also compact and dichotomous branched root system. (c) Control plant, not inoculated with less aerial part development and a linear root system 23 cm long.

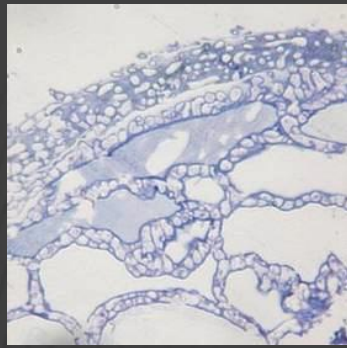
Parámetros evaluados

- Largo de la raíz principal; n^o de raíces secundarias
- Crecimiento del
- Tasas de sobrevivencia de las plantas enraizadas e inoculadas





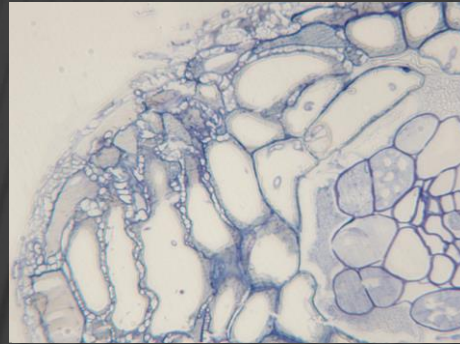
Hongo 2Da



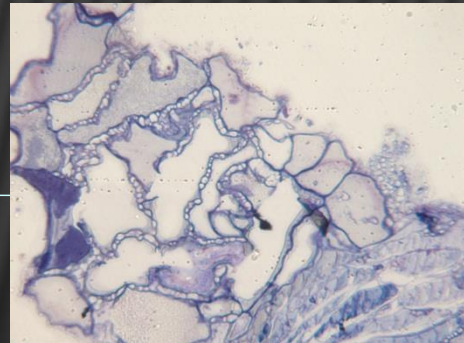
Hongo 1Pa



Hongo 1M-2a

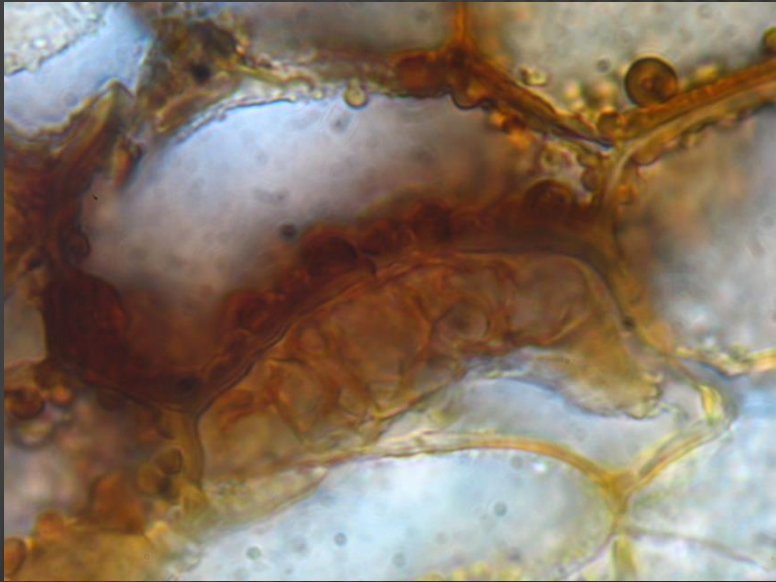
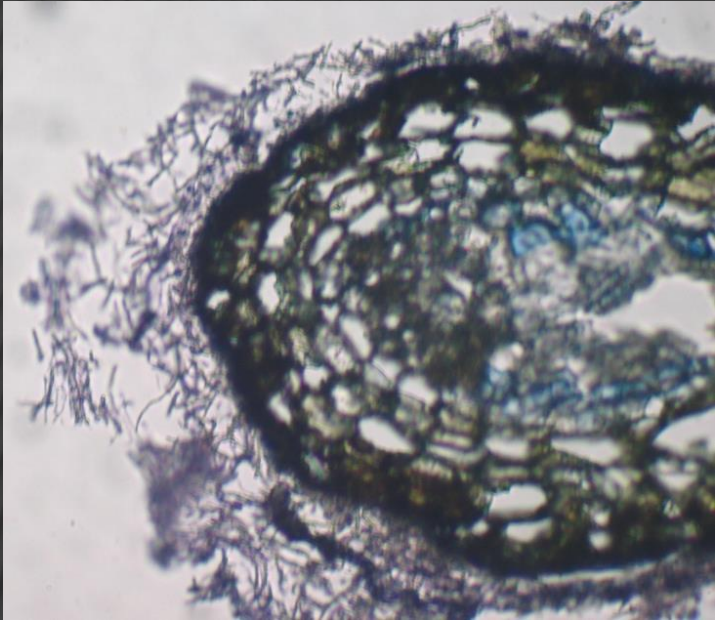


Hongo 1K 2(a)



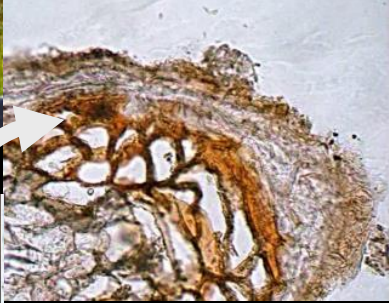
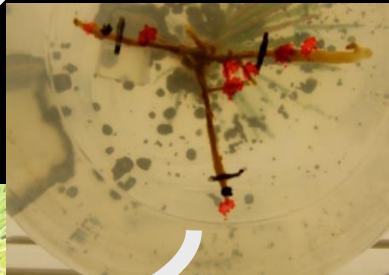
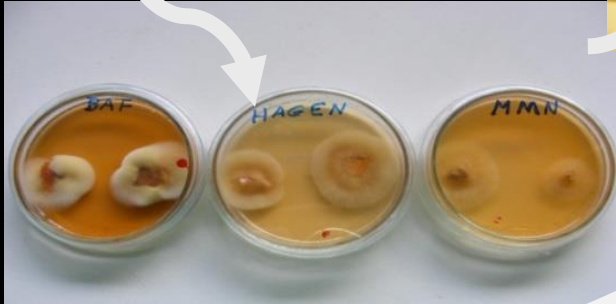
Fijación en 2,5% de glutaraldeído en 0,1 M Hepes Buffer (Ph 6.8) Massicotte *et al.*, 2008. Seguidamente el material foi incluído en resina Spurr y seccionado en cortes semifinos de (1 μ m) con el ultramicrotomo Leica Reichert Supernova, siendo posteriormente coloreados con azul de toliudina 0.05% . Los cortes obtenidos se observaron en un microscópio fotónico Dialux 20 de Leitz y las imagenes fueron obtenidas por una camara digital Leica DC 30.

Estudios anatómicos e histológicos



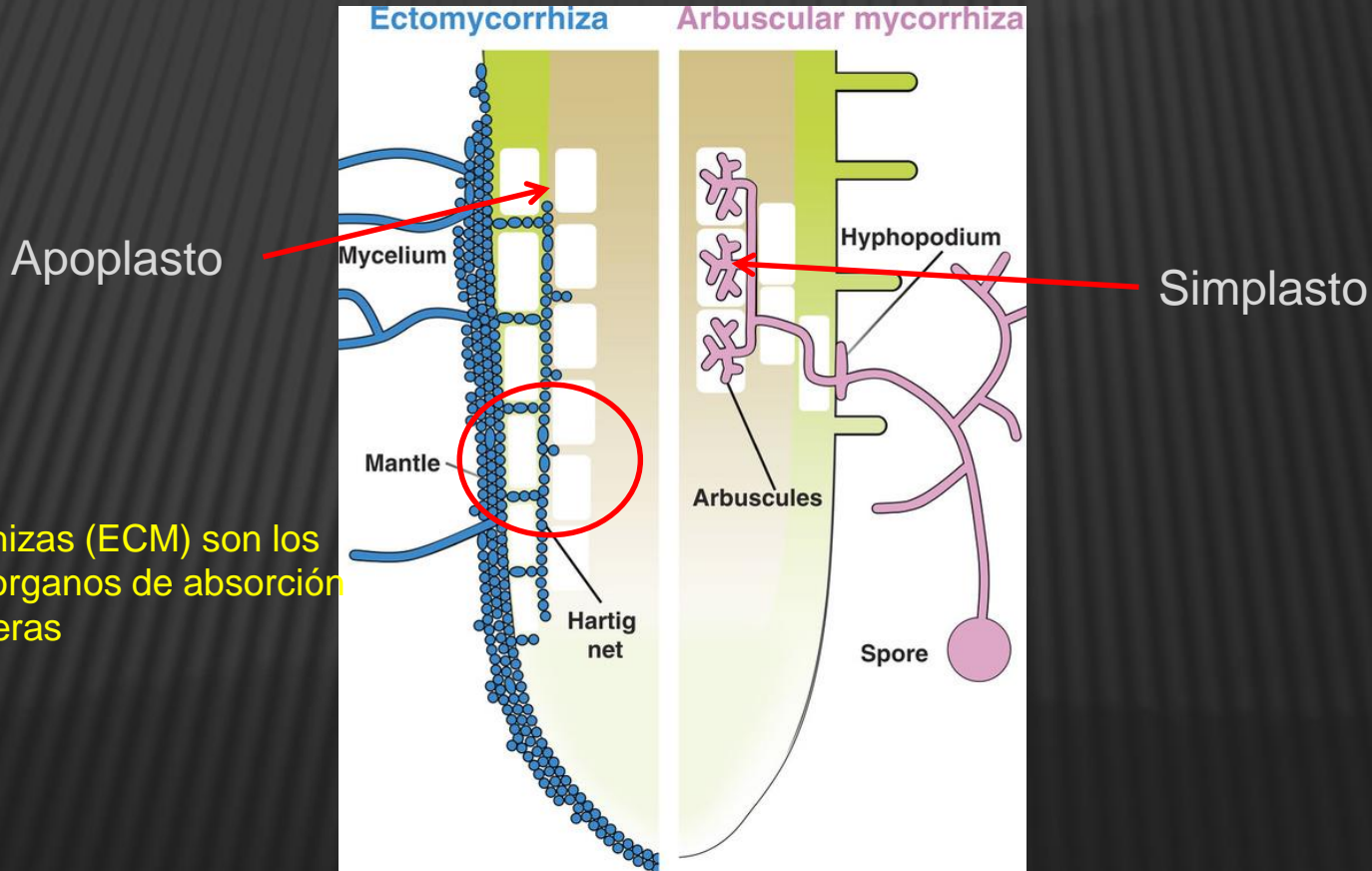
Planta no inoculada

Resumen de la Metodología de Trabajo



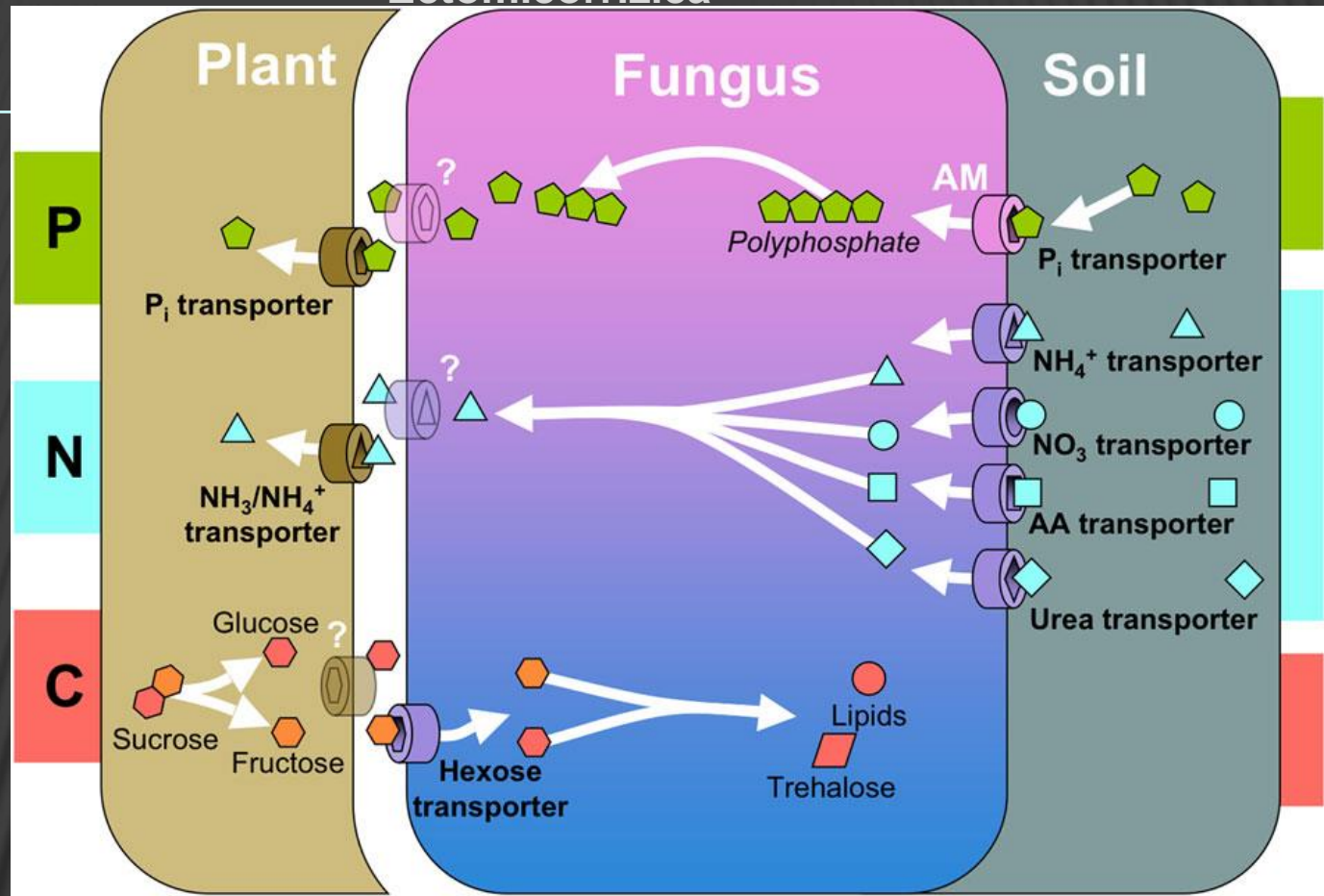
Las micorrizas son estructuras simbióticas entre las raíces de las plantas y los hongos. Existen básicamente dos tipos principales ENDOMICORRIZAS o Micorrizas arbusculares y ECTOMICORRIZAS

Esta relación mutualista con los hongos garantiza a las coníferas una ventaja ecológica en condiciones adversas o difíciles



Ectomycorrizas (ECM) son los principales órganos de absorción en las coníferas

Esquema que resume los procesos de intercambio de nutrientes en la simbiosis Ectomicorrizica

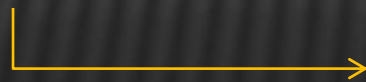
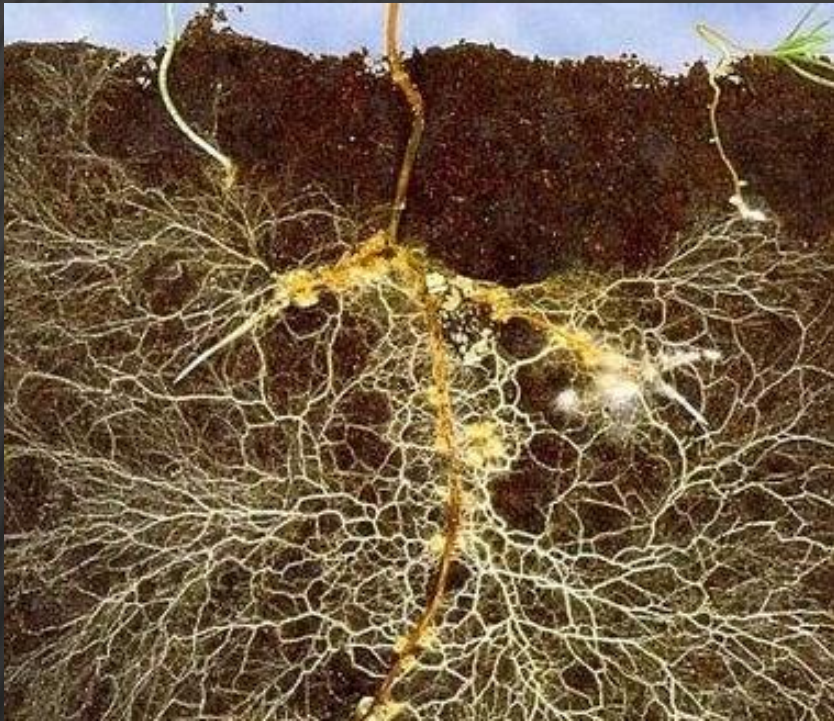


Emphasis is placed on the translocation of phosphorus (P), nitrogen (N) and carbon (C) at the soil–fungus and fungus–plant interface. Inorganic P and mineral or organic forms of N, such as NH_4^+ , NO_3^- and amino acids (AA), are taken up by specialized transporters located on the fungal membrane in the extraradical mycelium. NH_3/NH_4^+ and P_i (the latter originated in AM fungi from the hydrolysis of polyphosphate) are imported from the symbiotic interface to the plant cells through selective transporters. Hexose transporters import plant-derived carbon to the fungus, whereas transporter proteins involved in the export of nutrients from either the plant or fungus have not been identified yet. This questions whether such processes indeed result from active, protein-mediated transport or involve passive export mechanisms.

Paola Bonfante & Andrea Genre

Nature Communications 1, Article number: 48 doi:10.1038/ncomms1046

- ❖ Diferentes espécies de ECM que podem ser associadas ao *P. pinea* em Portugal (*Hebeloma* sp., *Lactarius* sp., *Rhizopogon* sp., *Pisolithus* spp).



Mayor area explorada
por las raices

Algunos beneficios para las plantas micorrizadas

- ❖ Aumento de la eficiencia de absorción de agua e nutrientes;
- ❖ Promueve el crecimiento radicular y la ramificación de las raíces
- ❖ Reducción de las necesidades de fertilización e irrigación;
- ❖ Aumento de la resistencia y protección contra patógenos;
- ❖ Protección de las plantas en suelos con metales pesados
- ❖ Beneficia el vigor de las plantas minimizando el estrese, promover el crecimiento de semillas, así como el enraizamiento de estacas;
- ❖ Aumenta la eficiencia en protocolos de embriogénesis somática *in vitro*;

Vantajas para los hongos

- ❖ Absorción de grandes cantidades de materia orgánica y azúcares;
- ❖ Aumento de la humedad para crecimiento de las hifas

Señalización

- ❖ Existen muchos compuestos de señalización encontrados en las asociaciones mutualísticas.
- ❖ IBA e IAA (auxinas)
- ❖ Rutina (flavonoides)
- ❖ Zeatina (citocininas)
- ❖ Los exudados de las plantas pueden activar el crecimiento y alterar la morfología del micelio.
- ❖ Los hongos por otra parte liberan **auxinas** que promueven la rizogénesis e inhiben el crecimiento de los pelos radiculares

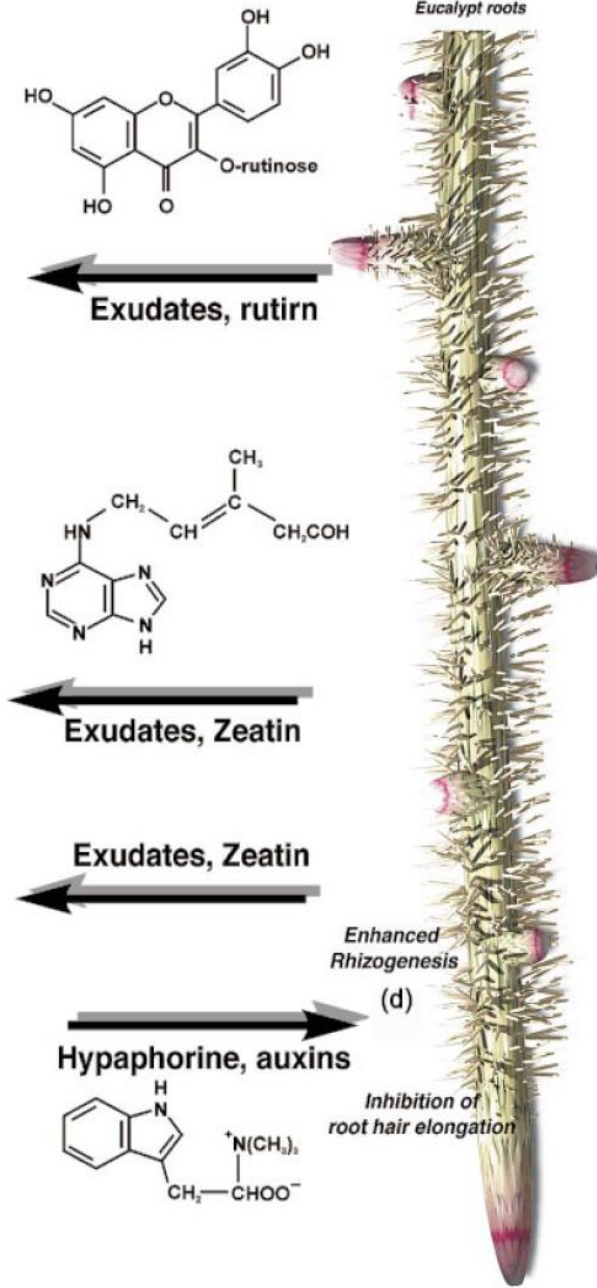
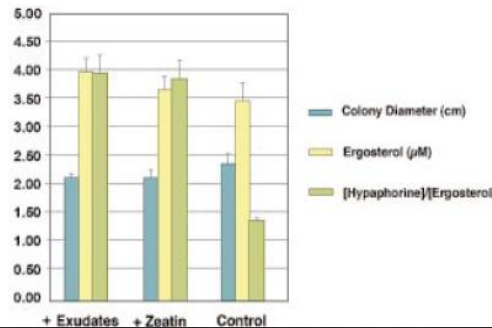
(a) Fungal growth



(b) Hyphae branching



(c) Hypaphorine accumulation

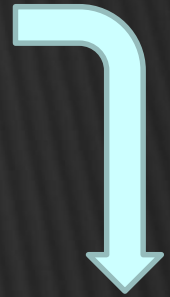


OBJETIVOS

- ❑ Utilizar la técnica de co-cultura *in vitro* (biotización) para resolver los problemas de enraizamiento y aumentar la tasa de sobrevivencia en la fase de aclimatación;
- ❑ Caracterizar las interacciones hongo-raíz que permitan el desarrollo de un sistema radicular eficiente;
- ❑ Evaluar las relaciones promotoras entre el enraizamiento *in vitro* y posterior desempeño de las plantas inoculadas;
- ❑ Caracterizar las diferentes especies de hongos ECM colectados en plantaciones de pino durante todas las fases de la biotización;
- ❑ Identificar los principales factores que controlan el desarrollo de la simbiosis y la señalización entre hongos ECM y brotes de *P. pinea*.

METODOLOGIA

Estudos bioquímicos (meio de cultura dupla-fase)



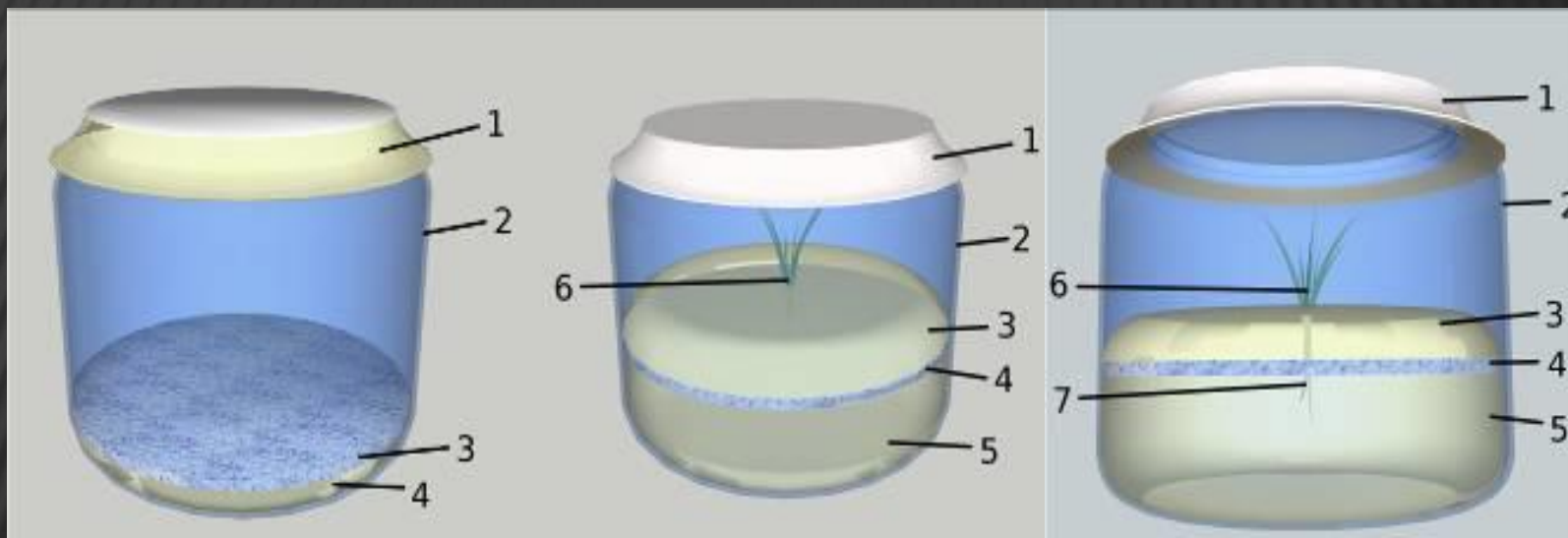
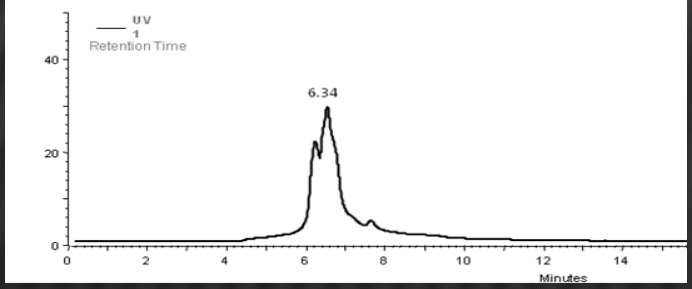
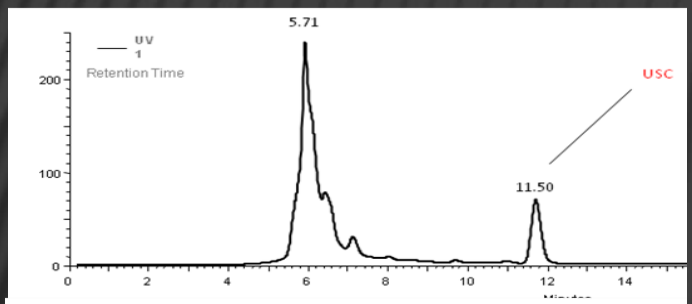
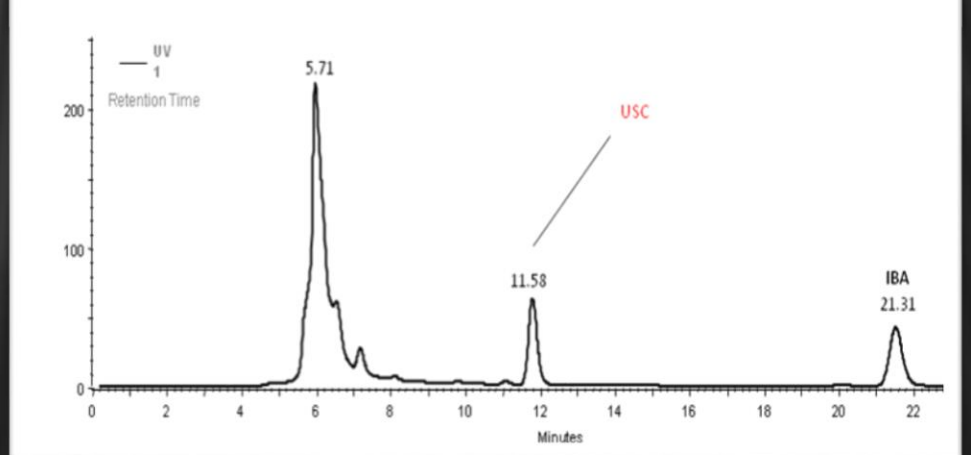
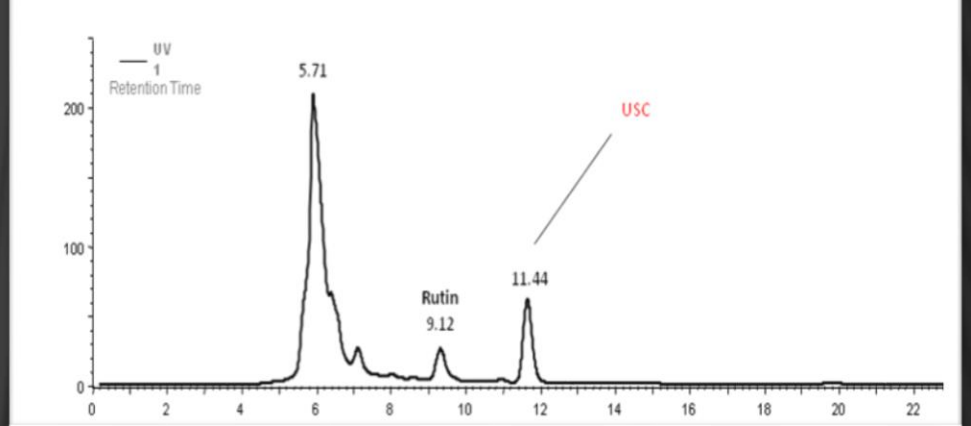
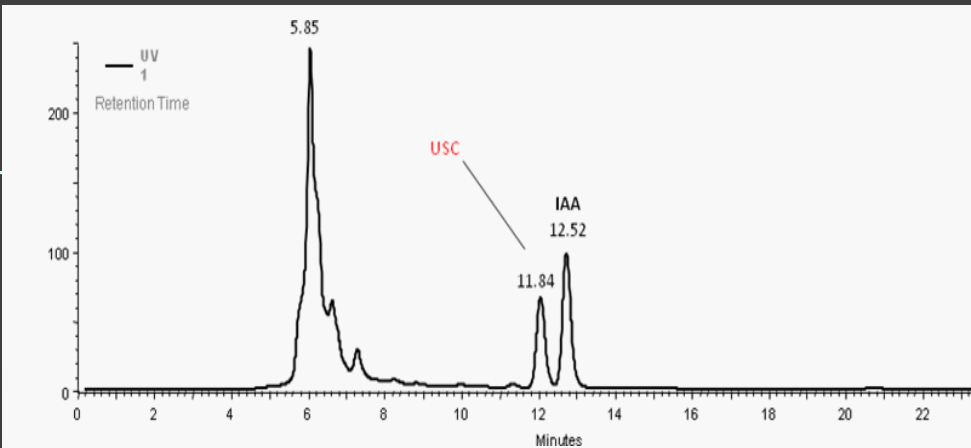


Ilustración de la preparación del medio de cultivo de doble fase, a, 1 - tapa, 2 - frasco, 3 y 4 – medio de WPMS con perlita na parte superior. b y c, 3 y 4 – medio WPMS con perlita hacia abajo, 5 - WPML, 6 - plantas, 7 – raiz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos bioquímicos **con**
HPLC-UV system ELITE LaChrom VWR
HITACHI equipped with a VWR HITACHI L-
2100 pump, a Rheodyne injector and a
VWR® HITACHI L-2400 UV detector.
LC-DAD-MS analyses were carried out in a
LCQ Advantage Thermo Finnigan mass
spectrometer equipped with an
electrospray ionization source and using an ion
trap mass
analyzer.

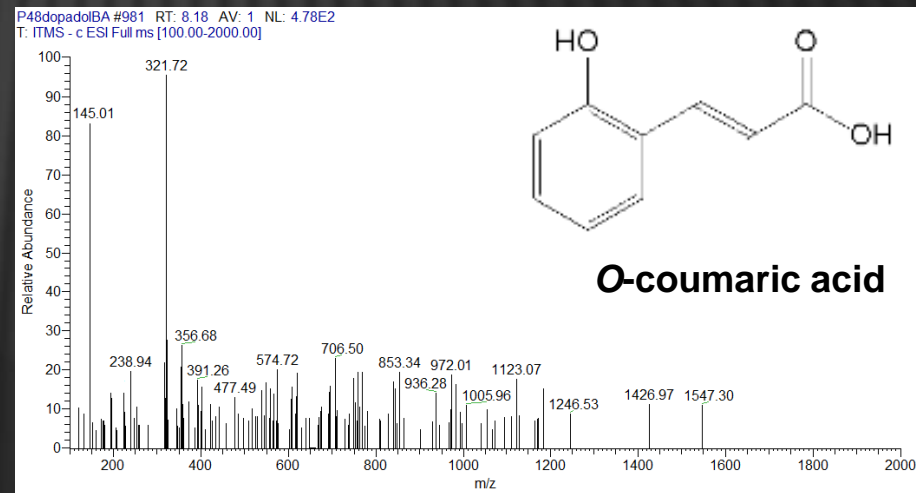
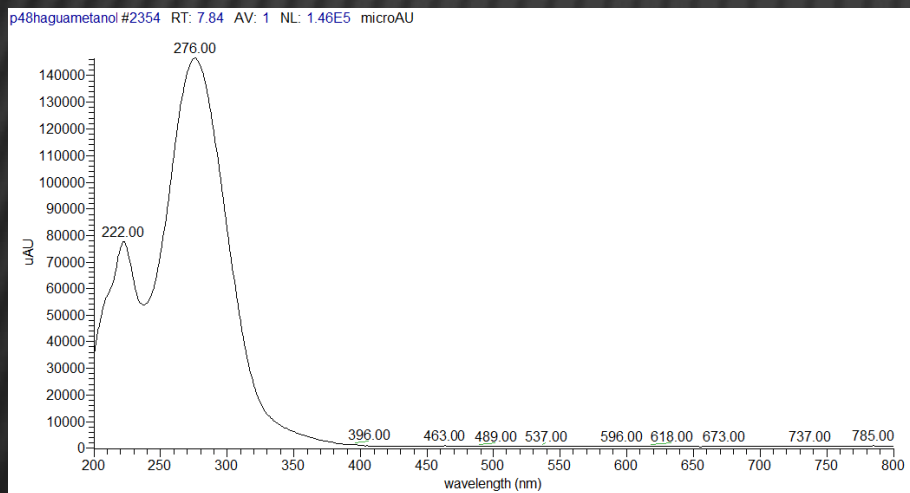
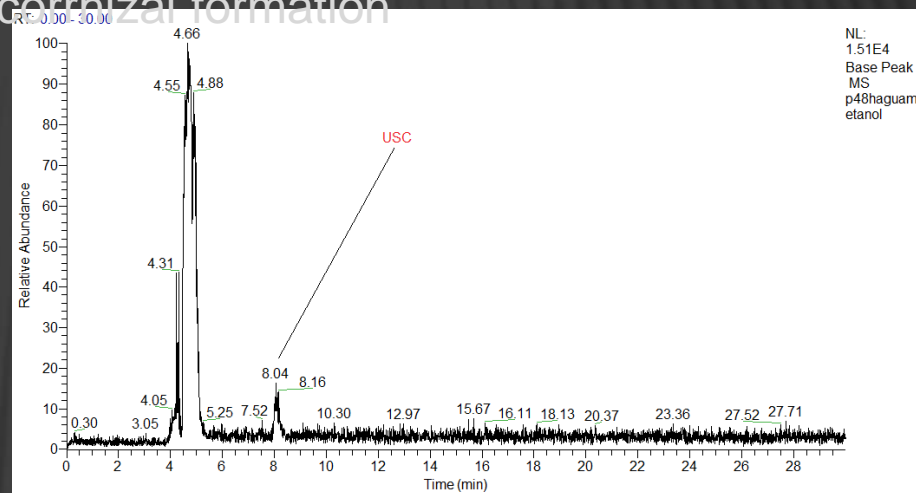
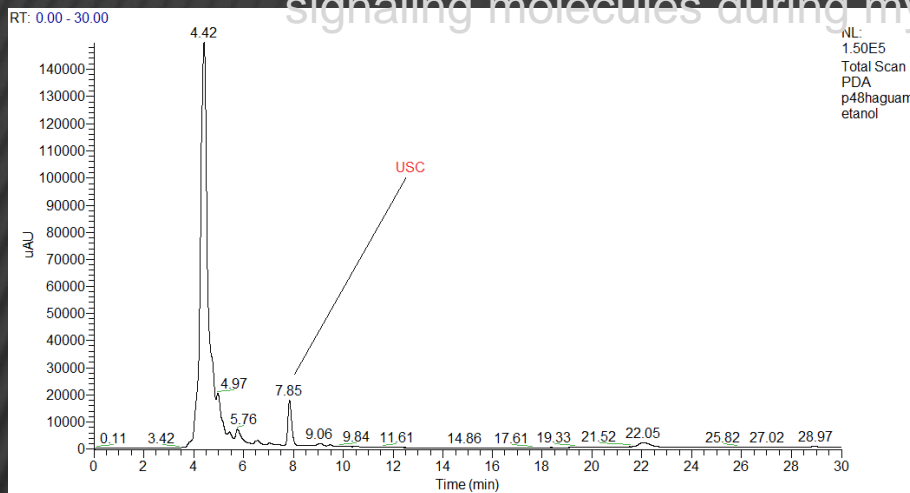


24h

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Estudos bioquímicos

ounds, root flavonoids have been demonstrated to play an important role in the root-microbe interaction. Compounds like p-coumaric acid, coumarin, naringenin, and other flavonoids were cited as potential signaling molecules during mycorrhizal formation



CONCLUSIONES

- Fueron estudiados una gran cantidad de factores que influyen en el enraizamiento *in vitro*.
- Con base en estas informaciones se ajustaron factores físicos y químicos, pasando de un 30% de enraizamiento hasta 70% en una gran mayoría de los clones testados (protocolo definido).
- La estrategia desarrollada con base en el co-cultivo de plántulas de pino con hongos ectomicorrízicos (biotización) produce resultados positivos, una vez que efectivamente contribuyen para **ultrapasar el cese del crecimiento de raíces y preparar las plantas para su aclimatación, mejorando varios parámetros del enraizamiento.**
- El co-cultivo puede usarse para **inocular hongos de interés en el mercado**

CONCLUSÕES

- ❖ Usando el primer do PCR-M13, fue posible separar los diferentes grupos de hongos que pueden ser encontrados en piñales. Además nos permitió hacer una monitorización durante todas las etapas de la culturas.
- ❖ En el análisis de la señalización fué identificado un éster del ácido o-cumárico. El aparecimiento de esta substancia nos permitió comprender el papel de los compuestos fenólicos en la simbiosis planta-hongos ECM
- ❖ Fué además patentado un nuevo sistema de cultivo compuesto por un medio de cultura semi-sólido-líquido, que permitió el análisis de los metabolitos liberados por las raíces (Patente).
- ❖ Durante este trabajo fué importante el nº de técnicas y personal especializado que trabajo de una forma multi-disciplinar .

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ❑ Este protocolo puede ser aplicado en otras especies vegetales o inoculantes microbianos, desde que la asociación promueva efectos positivos en ambos partners.
- ❑ Hay un largo espectro de posibilidades de estudio, como la sobrevivencia de los hongos inoculados cuando las plantas son colocadas en el vivero y cuando son plantadas en el lugar definitivo

Publicaciones (posters/presentaciones orales; secuencias NCBI)

Ragonezi C, Caldeira AT, Martins MR, Teixeira D, Dias LS, Miralto O, Ganhão E, Klimaszewska K, Zavattieri A 2012 Micropropagation of recalcitrant pine (*Pinus pinea*, L.) – An overview of the effects of ectomycorrhizal inoculation. In 2nd International Conference of the IUFRO WORKING PARTY 2.09.02. Brno, Czech Republic.

Ragonezi C, Caldeira AT, Martins MR, Klimaszewska K, Santos-Silva C, Peixe A, Dias LS, Ganhão E, Miralto O, Louro R, Zavattieri A 2011 Biotization of the mediterranean stone pine (*Pinus pinea* L.). In *Current Opinion in Biotechnology* 22, 1: 46 - 46. doi: 10.1016/j.copbio.2011.05.118.

Zavattieri A, Miralto O, Ragonezi C, Klimaszewska K, Dias LS, Pereira I 2011. Mycorrhiza-like structures during *in vitro* culture of stone pine (*Pinus pinea* L.). A matter of stress?. In XVI Congress of European Mycologists, In Book of Abstracts XVI Congress of European Mycologists, Neos Marmaras.

Ragonezi C, Klimaszewska K, Dias LS, Caldeira AT, Martins MR, Santos-Silva C, Louro R, Miralto O, Ganhão E, Zavattieri A 2011 The use of ectomycorrhizal fungi to restore root growth during *In vitro* rooting and minimize losses during the acclimation of stone pine (*Pinus pinea* L.). In XVI Congress of European Mycologists, In Book of Abstracts XVI European Mycologists Congress, Neos Marmaras.

Santos-Silva, Ragonezi C, Pires P, Castro MR, Lima M, Zavattieri A, Klimaszewska K. 2010 Misleading Mycorrhiza? Latest developments and new insights. In Book of Abstracts Cost 870 – Efficient Plant – AMF Interaction, Évora, Portugal.

Castro M, Ragonezi C, Klimaszewska K, Lima M, Oliveira P, Santos-Silva C, Zavattieri A 2009 Mycorrhiza-like structures in rooted microshoots of *Pinus pinea* L. Latest developments of a new insight. In XIII^o World Forestry Congress, In Actas Congreso Forestal Mundial, Buenos Aires.

Ragonezi C, Castro M, Santos-Silva C, Lima M, Oliveira P, Klimaszewska K, Oliveira P, Vaz M, Zavattieri A 2009 Misleading Mycorrhizae? In ICOM 6 Internacional Conference on Mycorrhiza, Belo Horizonte, Brazil.

Zavattieri A, Lima M, Castro M, Ragonezi C, Oliveira P, Klimaszewska K 2009 Analysis and mastering of root growth signalling by ectomycorrhizal fungi in *Pinus pinea* L. microshoot cultures. In IUFRO Tree Biotechnology Conference, Whistler, BC, Canada Page 58 P-114.

Zavattieri A, Ragonezi C, Castro MR, Zavattieri A, Lima M 2008 Achieving *in vitro* rooting in recalcitrant pine. In 5th International Symposium on Adventitious Root Formation. From cell fate flexibility to root meristem determination and biomass formation, Alcalá de Henares, Spain.

Publicaciones en revistas internacionales con referee

Ragonezi, Carla; Caldeira, A. T; Rosário Martins, M; Salvador, Cátia; Santos-Silva, Celeste; Ganhão, Elsa; Klimaszewska, Krystyna; Zavattieri, Amely. 2013. "Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from Mediterranean pine stands in Portugal", *Brazilian Journal of Microbiology*. JCR® factor de impacto (2013): 0.452

2.Ragonezi, C.; Teixeira, D.; Caldeira, A.T.; Martins, M.R.; Santos-Silva, C.; Ganhão, E.; Klimaszewska, K.; Zavattieri, M.A.. 2013. "O-coumaric acid ester, a potential early signaling molecule in *Pinus pinea* and *Pisolithus arhizus* symbiosis established in vitro", *Journal of Plant Interactions* 0, 0: 1 - 9.

3.Ragonezi, Carla; Caldeira, Ana T; Rosário, Martins M.; Silva, Celeste S; Ganhão, Elsa; Miralto, Otilia; Pereira, Isabel; Louro, Rogério; Klimaszewska, Krystyna; Zavattieri, Maria A. 2012. "PISOLITHUS ARHIZUS (SCOP.) RAUSCHERT IMPROVES GROWTH OF ADVENTITIOUS ROOTS AND ACCLIMATIZATION OF IN VITRO REGENERATED PLANTLETS OF PINUS PINEA L.", *Propagation of Ornamental Plants* 12, 3: 139 - 147.

4.Castro, Mário R; Belo, Anabela F; Afonso, Anabela; Zavattieri, Maria A. 2011. "Micropropagation of *Juniperus navicularis*, an endemic and rare species from Portugal SW coast", *Plant Growth Regulation* 65, 2: 223 - 230.

5.Ragonezi, Carla; Caldeira, Ana T; Martins, Rosário; Klimaszewska, Krystyna; Silva, Celeste S; Peixe, Augusto; Dias, Luís; Ganhão, Elsa; Miralto, Otilia; Louro, Rogério; Zavattieri, Amely. 2011. "Biotization of the mediterranean stone pine (*Pinus pinea* L.)", *Current Opinion in Biotechnology* 22, 1: 46 – 46. CR® factor de impacto (2013)

6.Ragonezi, Carla; Klimaszewska, Krystyna; Castro, Mário R; Lima, Mónica; Oliveira, Paulo; Zavattieri, Maria A. 2010. "Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors", *Trees* 24, 6: 975 - 992.

7.Castro, Mário R; Ragonezi, Carla; Klimaszewska, Krystyna; Lima, Mónica; Oliveira, Paulo; Zavattieri, Maria A. 2010. "Mycorrhiza-like structures in rooted microshoots of *Pinus pinea* L. Latest developments of a new insight", *Acta horticulturae* 865, 1: 179 - 185.

8.Ragonezi, Carla; Castro, Mário R; Klimaszewska, Krystyna; Lima, Mónica; Zavattieri, Maria A. 2010. "Influence of light quality and intensity on adventitious root formation in microshoots of *Pinus pinea* L.", *Acta Horticulturae* 865, 1: 287 - 291.

9..Zavattieri, Maria A; Lima, Mónica; Sobra, Virginia; Oliveira, Paulo; Costa, Alexandra R.. 2009. "Effects of carbon source carbon concentration and culture conditions on in vitro rooting of *Pinus pinea* L. microshoots.", *Acta Horticulturae* 812, 1: 174 - 180.

10. Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from Mediterranean pine stands in Portugal
C Ragonezi, AT Caldeira, M Rosário Martins... - *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013.



Prof. Ana Teresa Cladeira.
Departamento de Química
Hecules Lab.



Krystyna Klimaszewska.
PhD Research Scientist. Natural Resources
Canada.
Canadian Forest Service.



Prof. Paulo de Oliveira
Departamento de Biologia



Prof. Celeste Santos Silva
Departamento de Biologia



Prof. Luís Silva Dias
Departamento de Biologia



Prof. Maria do Rosário Martins.
Departamento de Química



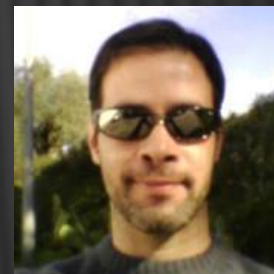
PhD. Carla Aparecida Ragonazi Lópes



Master Mário Rui Castro
Universidade da Beira Interior



Prof. Isabel Pires Pereira
Departamento de Biologia



Master Rogério Louro



Elsa Ganhão
Tec. Sup. Departamento de Biologia



Maria Otília Miralto
Tec. Sup. Departamento de Biologia



Prof. Dora Maria Martins Teixeira
Departamento de Química

