



RELATÓRIO DE ACTIVIDADES
Sabática 2015

Prof. Dra. Maria Amely Zavattieri

Departamento de Biologia
Universidade de Évora

Índice

	Pag.
Introdução	3
Objectivos da Sabática	4
A Instituição de Acolhimento	5
A Estação Experimental Agropecuária INTA Bella Vista	8
Características da Mesopotâmia Argentina	10
Espécies alvo da Cooperação	15
<i>Grevillea robusta</i> A. Cunn. ex R. Br.	15
<i>Corymbia citriodora</i> (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson	17
<i>Pinus taeda</i> L.	20
Trabalhos realizados na propagação <i>in vitro</i> na Estação Experimental Bella-Vista	22
Micropropagação de <i>Grevillea robusta</i>	22
Micropropagação de <i>Corymbia citriodora</i> subsp. <i>variegata</i>	30
Problemas encontrados nas plantas derivadas das culturas de <i>Corymbia</i> e novas propostas para a sua multiplicação	35
Ensaio realizado para solução de problemas na micropropagação de CCV	
Multiplicação de <i>Pinus taeda</i> por estaquia (macropropagação)	38
Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Pinus taeda</i> L. (Loblolly pine) por embriogenese somática	39
Conclusões e perspectivas futuras dos trabalhos realizados durante a Sabática	45
Agradecimentos	46
Referências Bibliográficas	46

Lista de Anexos

Anexo 1- Carta convite da EEA INTA Bella Vista

Anexo 2- Conferência na Estação experimental INTA “Biotização do pinheiro manso”

Anexo 3- Participação no 9º Simpósio de Meteorologia e Geofísica da APMG-Tavira;

Portugal Março, 2015-10-15 Apresentação realizada pela Dra. Maria Helena Novais “ALqueva hydro-meteorological EXperiment (ALEX): first results of aquatic ecological assessment”

Anexo 4- Conference: LAKE 2015: The 4th workshop on “Parameterization of Lakes in Numerical Weather Prediction and Climate Modelling” will be held in Évora. Portugal, May 07-09, 2015. Évora. Portugal, May 07-09, 2015.

Anexo 5- Apresentação 4 Congresso Ibérico de Cianotoxinas “Monitoring cyanobacteria and cyanotoxins in Alqueva Reservoir”

Anexo 6 Review: Adventitious rooting of conifers: influence of biological factors

INTRODUÇÃO

Durante a minha estadia em Argentina no ano de 2014 foram estabelecidos contactos com o Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação Produtiva em Buenos Aires com o objectivo de estabelecer convênios de Cooperação Internacional relacionados com os Ecossistemas aquático e florestal, em particular, todas elas visando o desenvolvimento sustentável. Em esse contexto foi assinado um protocolo de Cooperação entre a Universidade de Évora, a Província de Chubut e o Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP).

O programa como previamente estabelecido incluía entre outros aspectos a colaboração para o estabelecimento dos planos do novo centro biotecnológico do CIEFAP, um curso em biotecnologia florestal para futuros técnicos do laboratório a ser criado e para outros técnicos ligados ao sector produtivo de bosques e o início dos trabalhos (nos laboratórios existentes) da multiplicação vegetativa de espécies nativas de interesse (pelo seu valor na obtenção de metabolitos secundários e outros produtos).

No entanto, durante o mês de Fevereiro de 2015 houve alteração nas autoridades do CIEFAP, sendo nomeado um novo Presidente, neste caso o Ministro de Educação de Chubut, Dr. Rubén Zarate, não dependente do Ministério de Ciência e Tecnologia mas sim do Ministério de Educação. Ante este novo cenário e dada a falta de comunicação com as autoridades com as que foi estabelecido o protocolo inicial, contactei novamente as autoridades do Ministério de Ciência e Inovação Produtiva em Buenos Aires, e foi agendada uma reunião com a Dra. Susana Marcucci Poltri, Directora do Programa Nacional de Marcadores Moleculares das Especies Florestais em Argentina a fim de elaborar um programa alternativo na área da biotecnologia de espécies florestais (<http://inta.gob.ar/personas/marcucci.poltri>). Em contacto pessoal realizado no INTA de Castelar a Dra. Marcucci Poltri sugere que as minhas competências enquadram-se com os objectivos dos projectos territoriais Corri-1243203, 1243204 e PNFOR 1104062 (Melhoramento Genético de Espécies Florestais Introduzidas para Usos de Valor) que estão sendo coordenados no INTA Bella-Vista pelo Eng. Carlos David Vera Bravo. Consequentemente com a necessidade de dar continuidade a Sabática, foi definida a Estação Experimental Agropecuária INTA Bella-Vista como o meu local de trabalhos em Biotecnologia de Espécies Florestais. Esta opção, não prejudica o previamente estabelecido no Protocolo de Cooperação com a Universidade de Évora o qual terá que ser, no entanto actualizado, com as novas autoridades do CIEFAP se assim a Universidade de Évora e aquela Instituição o entenderem conveniente.

(Em Anexo 1 carta de formalização de convite efectuado pela EEA INTA Bella Vista).

É necessário citar neste relatório outros trabalhos realizados em continuidade com as actividades realizadas no Projecto ALEX (apresentações em Congressos, Workshops, etc) que decorreram em Portugal durante a minha ausencia, para os quais contriui desde Argentina.

Cópia destes documentos e abstracts das apresentações encontram-se em Anexos a este documento.

Publicações e apresentações em Congressos durante o período Sabático

ALqueva hydro-meteorological EXperiment (ALEX): first results of aquatic ecological assessment- Maria Manuela Morais, Maria Helena Novais, Susana Nunes, Joana Rosado, Alexandra Penha, Amely Zavattieri, Miguel Potes, Rui Salgado. APMG2015 – 9º Simpósio de Meteorologia e Geofísica da APMG e 16º Encontro Luso-Espanhol de Meteorologia. 16 a 18 de Março, 2015. Hotel Vila Galé Alacora. Tavira. (Anexo 3)

Monitoring cyanobacteria and cyanotoxins in Alqueva Reservoir, Portugal.

Zavattieri M.A; Morais M.M.; Nunes S.; Penha A.; Caldeira A.T; Martins M.R.; Salgado R. 4to Congresso Ibérico de Cianotoxinas. Lisboa 8-10 de Junho de 2015. (Abstract em Anexo 4)

4th workshop on “Parameterization of Lakes in Numerical Weather Prediction and Climate Modelling” Évora. Portugal, May 07-09, 2015.

<http://www.lake15.cge.uevora.pt/> (abstract em Anexo 5)

Review article: Adventitious rooting of conifers: influence of biological factors.

Maria Amely Zavattieri; Carla Ragonezi; Krystyna Klimaszewska. (Anexo 6)

OBJECTIVOS DA SABÁTICA

Os objectivos do presente trabalho de investigação definidos por acordo com o Eng. Carlos David Vera Bravo no INTA de Bella Vista, visam a multiplicação clonal *via* embriogénese somática de *Pinus taeda*; e a propagação *via* gomos axilares em *Grevillea robusta* e *Corymbia citriodora* com o objectivo de rejuvenescer os tecidos para posteriormente usar a multiplicação massal dos genótipos superiores destas espécies. O Engenheiro Carlos David Vera Bravo é coordenador do Laboratório de Biotecnologia da Estação Experimental INTA Bella Vista e desenvolve também actividade no sector florestal como pode ver-se pelo seu currículo abreviado na folha institucional do INTA.

(<http://inta.gob.ar/personas/vera.bravo>)

Os trabalhos de biotecnologia florestal se iniciam em esta Estação Experimental no ano de 1987 com a multiplicação *in vitro* de citrinos. No entanto, após uma reunião nacional do grupo REDBIO-Argentina realizada no ano 2000 em Bella-Vista, se definem como prioridades na área de investigação aplicada nas florestas argentinas o seguinte:

-o estabelecimento de protocolos de micro e macropropagação e de embriogénese somática;

- o estabelecimento de novas infraestruturas de laboratórios com pessoal qualificado na área para prestação de serviços em biotecnologia florestal e genética
- a aplicação de técnicas de micropropagação para rejuvenescimento de materias vegetais
- a monitorização de cruzamentos controlados e a utilização de marcadores moleculares para identificação de materiais e determinação da variabilidade genética de populações base
- o estudo de técnicas de crioconservação
- a aplicação de engenharia genética em determinados materiais para resistência a herbicidas e insectos

Para dar continuidade as definições da REDBIO-Argentina 2000, se iniciarm em Bella Vista trabalhos de multiplicação vegetativa de lenhosas, neste caso com *Eucalyptus grandis* (hoje conta-se com um exitoso protocolo de multiplicação e enraizamento in vitro de esta espécie). A esta seguiram outras espécies, algumas das quais encontram-se descritas neste relatório.

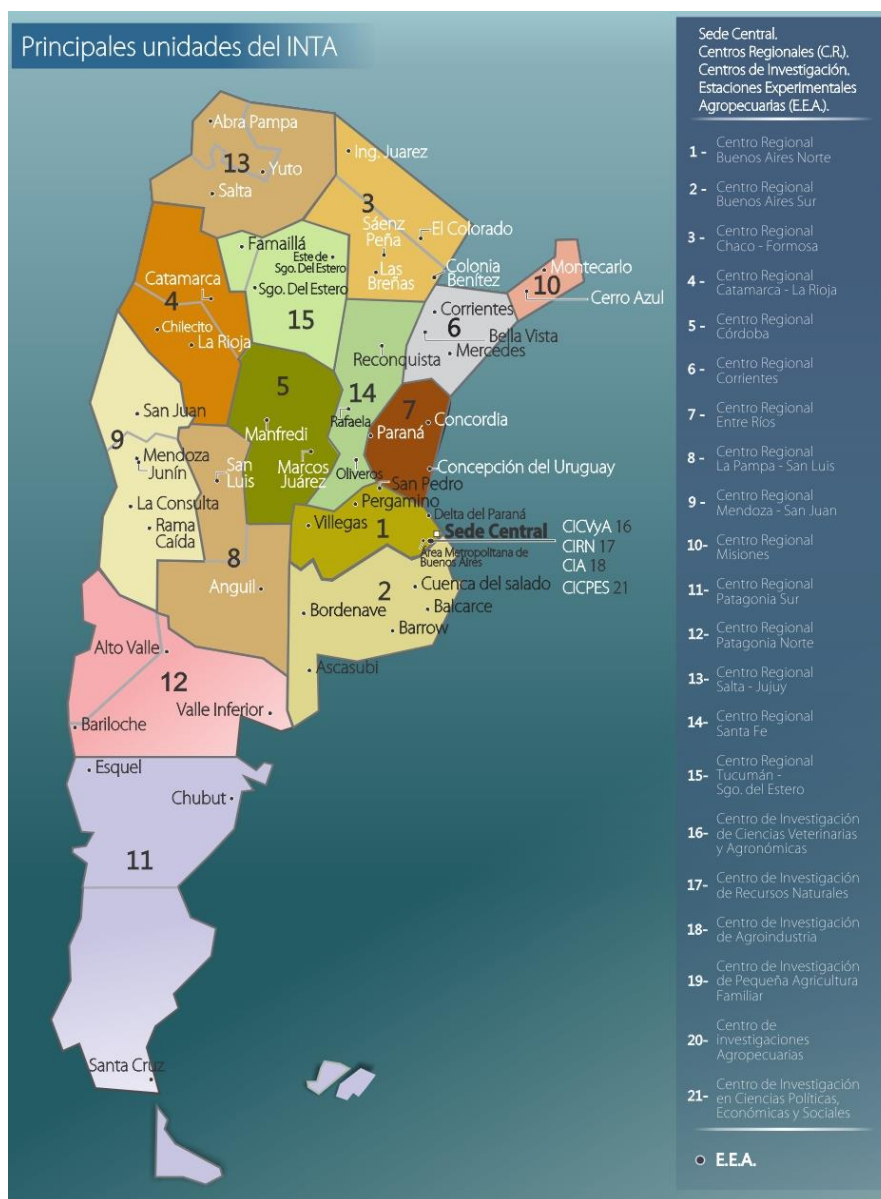
A INSTITUIÇÃO DE ACOLHIMENTO

O Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA)

O complexo agroalimentar argentino é um dos mais importantes do mundo, capaz de gerar alimentos para 400 milhões de pessoas. Neste cenário, é muito importante o papel do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária **INTA**, Agência Estatal Argentina dependente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Pescas. Desde 1956 desenvolve atividades de pesquisa e inovação tecnológica em cadeias de valor alimentar e florestal nas diversas regiões e territórios nacionais para melhorar a competitividade e o desenvolvimento rural sustentável. Seus esforços estão focados na inovação como motor do desenvolvimento de capacidades e integração para promover a cooperação interinstitucional, gerar conhecimentos e tecnologias e usá-las para o setor através de sistemas de extensão, informação e comunicação (<http://inta.gob.ar/>).

O INTA encontra-se presente nas cinco Ecoregiões da Argentina (Noroeste, Nordeste, Cuyo, Pampeana e Patagonia) por meio de uma estrutura que compreende: uma Sede Central, 15 Centros Regionais, 6 Centros de Investigação, 53 Estações Experimentais, 16 Institutos de Investigação e mais de 300 Unidades de Extensão (mapa 1).

Mapa 1. Principais unidades do INTA em Argentina onde se encontra assinalado a localização do INTA onde foram realizados os trabalhos de biotecnologia forestal que se encontram descritos no presente relatório.



Este organismo oferece mais de 120 serviços diferentes para o agro e agroindústrias, muitos deles de forma gratuita e a maior parte deles Certificados, a lista pode encontrar-se no seguinte documento (<http://inta.gob.ar/servicios>). De esta longa lista podem destacar-se alguns como: conservação de germoplasmas a medio prazo; caracterização molecular de *Apis mellifera*; análises químicos de águas, de alimentos e sangue; análises de estéres metílicos em aceites; análises de todo tipo dos alimentos para ruminantes; análises de sulfatos em solos; análises de água, solos e materiais de origem vegetal; análises das propriedades químicas dos solos; análises de forragens; análises de qualidade das sementes; análises da qualidade comercial e industrial da cevada cerzeira; isolamento e detecção de vírus bovinos; agometeorologia;

agroelectrónica; actualização em brucelose bovina; cultura de meristemas e obtenção de plantas de qualidade controlada; diagnóstico anatomo-histopatológico; entre muitos outros, e nos seus diferentes centros.

Outras duas entidades foram criadas em 1993 a INTEA S.A. e a Fundação ArgenINTA que conjuntamente com as estruturas acima descritas conformam o GRUPO INTA.

Os trabalhos contínuos do INTA desde a sua criação tem permitido ao país alcançar uma maior potencialidade e oportunidades para aceder aos mercados regionais e internacionais com produtos e serviços de alto valor acrescentado.

INTA foi criado á 4 de Dezembro de 1956 pelo Decreto Lei 21.680/5. O objectivo da sua criação foi “impulsionar, vigorizar e coordenar o desenvolvimento da investigação e extensão agropecuária e acelerar, com os benefícios destas funções fundamentais, a tecnificação das empresas agrárias e da vida rural. O INTA respresenta o mais importante Instituto Nacional na promoção do sector agropecuário, agroalimentar, agroindustrial e florestal da Argentina. A investigação e o desenvolvimento são os pilares de trabalho que tomam corpo no seu Plano Estratégico Institucional onde se descreve a visão a longo prazo para responder as demandas de todas as regiões argentinas.

http://inta.gob.ar/documentos/plan-estrategico-institucional-2005-2015/at_multi_download/file/Plan%20Estrategico%20INTA%20%282005-2015%29.pdf

Os convénios nacionais e internacionais que o INTA subscreve com os mais diversos organismos e entidades do sector público e privado, permitem crescer e incrementar a intervenção nas cadeias de valor, e melhorar o desenvolvimento rural e sustentável em todo o território da nação. A nível nacional participa de diversas redes, entre as que podem citar-se: redes de avaliação de culturas; redes de laboratórios; redes de informação técnica e redes profissionais, a longa lista pode ver-se no seguinte link (<http://inta.gob.ar/sobre-el-inta/redes-en-las-que-participa-inta>). Os longos anos de trabalho em investigação agrária de ponta tem dado origem a uma série de variedades produzidas por INTA nos mais variados cultivos como são: Aveia, Cevada; Centeio, Trigo; Milho; Eucalyptus; Linho; Lotus; Girasol; Chá; Tomate; Soja; Trevo; Erva mate; etc. As variedades com registo de propriedade vigente encontram-se na seguinte lista:

http://inta.gob.ar/documentos/patentes-y-registros-de-variedades-inta/at_multi_download/file/Variedades%20del%20INTA%20con%20otitulo%20de%20propiedad%20vigente.pdf.

Por outro lado entre 1987 e 2011 o INTA era detentor de 37 patentes entre maquinarias; cepas; processos; construções de ADN; dispositivos, etc. Lista de patentes INTA (<http://inta.gob.ar/documentos/patentes-y-registros-de-variedades->

inta/at_multi_download/file/Listado%20de%20patentes%20concedidas%20oy%20en%20tr%C3%A1mite.pdf

O INTA é um organismo na vanguarda agro-tecnológica mundial, assemelhando-se na sua função e estrutura ao EMBRAPA no Brasil e ao INRA Frances, que são por outra parte os seus parceiros na investigação. O LABINTEX por exemplo, é um Instituto Virtual INTA em Montpellier, França.

(<http://www.agropolis.org/es/proyectos/labintex-inta-agropolis-international.php>).

As actividades de extensão e desenvolvimento rural no território nacional argentino são o maior dos logros do INTA para o desenvolvimento do sector. Por meio da extensão apoia processos de interâmbio de informação e conhecimentos para o desenvolvimento das capacidades de inovação dos membros das comunidades rurais, faz o acompanhamento dos produtores para que sejam competitivos e produzam preservando o meio ambiente. Para uma transferência de tecnologia e melhor inserção nos territórios, o sistema INTA conta com 330 unidades de extensão rural localizadas em todo o território (ver mapa 1). A Coordenação Nacional de Transferência e Extensão é a responsável de orientar as estratégias e acções implementadas pelos Centros Regionais do INTA, entre elas o Programa Federal de Apoio ao Desenvolvimento Rural Sustentável (ProFeder)

(<http://inta.gob.ar/unidades/122600/sobre-122600>)

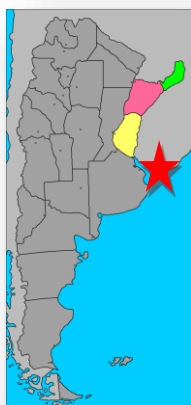
<http://inta.gob.ar/documentos/profeder-programa-federal>

A ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUÁRIA INTA BELLA VISTA

A Estação Experimental Agropecuária INTA Bella Vista está localizada na Ruta 27- Km 38,3 (3432) Bella Vista, na Província de Corrientes (mapa 2), na Mesopotâmia Argentina.

(<http://inta.gob.ar/unidades/432000>)

Mapa2. A Mesopotâmia Argentina (a cores no mapa da esquerda) e localização da EEA Inta Villa Bella em Corrientes (mapa da direita, estrela)



As actividades da Estação Experimental do INTA Bella Vista estão centralizadas em 3 áreas principais: Florestal (com ênfase na madeira y procesos de transformação mecánica); a horticultura em estufas e a citricultura (com destaque para o controlo de pragas e enfermedades cuarentenárias). Esta Estação conta com 323 hectáres de plantações, diversas estufas, oito áreas laboratoriais e uma estação agrometeorológica. Destacam-se os seguintes Laboratórios:

Laboratorio de Entomología

Este laboratorio recebe amostras de insetos e ácaros de citrinos e hortícolas (pimento e tomate em estufas). A identificação permite diferenciar fitófagos (pragas) de entomófagos e acarófagos (organismos benéficos), dado necessário para um correto maio das plantações.

Laboratorio de Fitopatología Hortícola

Este laboratorio oferece serviços de diagnóstico de enfermedades hortícolas, principalmente aquelas que afectan as culturas de pimento e tomate (as principais da região). O diagnóstico baseia-se na identificação de agentes causais (fungos, bacterias e vírus) com métodos tradicionais de fitopatologia e novas tecnologias (moleculares) que asseguram os resultados.

Laboratorio de Nematología Hortícola

Os produtores do Nordeste argentino que tenham a necessidade de analizar o solo e as plantas em cultura, podem enviar as amostras a este laboratorio para sua análise.

Laboratorio de Sanidade Vegetal - Fitopatología Citrinos

O laboratorio de Sanidade Vegetal-Fitopatologia de Citrinos conta com ensaios acreditados norma IRAM 301:2005 equivalente a Normativa ISO/IEC 17025:2005.

Laboratório de Biotecnología de Especies Forestales

Em este Laboratorio realizam-se trabalhos de multiplicação *in vitro* de espécies florestais de interesse para a Mesopotâmia argentina. O responsável é o Eng. Carlos David Vera Bravo (como acima assinalado)



Fig.1 Diferentes aspectos da Estação Experimental Agropecuária INTA Bella Vista

Características da Mesopotâmia Argentina

Para compreender a labor e espécies com as que se trabalha no EEA INTA Bella Vista é necessário descrever ainda que sinteticamente a região onde está inserida. A Mesopotâmia Argentina deve o seu nome ao facto de estar rodeada na sua totalidade por rios, é dizer no Norte, Sur, Este e Oeste. Estes rios são o Iguazu, O San António, O Pepirí Guazú; o Paraná e o Rio Uruguay. Entre as principais atrações da região encontram-se as Cataratas do Iguazú (fig. 2) na Província de Misiones, O Parque Nacional El Palmar (em Entre Rios), fig. 3; Os Esteros del Iberá (em Corrientes) fig. 4, e as ruínas jesuíticas de San Ignacio (fig. 5).



Fig. 2 Cataratas do Iguazu (garganta do Diabo)

As Cataratas do Iguazú consideradas como uma das 7 maravilhas naturais do mundo (<http://www.iguazuargentina.com/>) e os Esteros de Iberá são património da humanidade pelo seu valor histórico, pela diversidade biológica e pela beleza da paisagem (<http://www.esterosdelibera.com/>).



Fig. 3 Parque Nacional Palmar de Colón (Entre Ríos) com 14.000 ha. que possui exemplares de Palmeiras Yatay (*Butia yatay* ou *Syagrus yatay*) de mais de 800 anos



Fig. 4 Esteros del Iberá, extenso humedal com

25.000 km² na Província de Corrientes, segundo humedal mais extenso do mundo superado só pelo Pantanal Brasileiro-Boliviano-Paraguaio

A missão jesuítica fundada no início do século XVII para evangelização dos índios nativos guaraníes pelos jesuitas na de Misiones. No entanto, antigamente a missão encontrava-se no extremo norte do actual estado brasileiro do Paraná quando entre os séculos XVI e XVIII este território formava a región hispano-jesuítica conhecida como La Guayrá (fig. 5).



Fig. 5 Ruínas Jesuíticas de San Ignacio

A mesopotâmia caracteriza-se por ser uma região de extensos humedais. O seu território de 196781 km², apresenta diversidade de fisionomías, as quais tem sido agrupadas em dois corredores: o do Rio Paraná (no Oeste) e o corredor do Rio Uruguay (no Este). Esta região asenta sobre antigas rochas do macizo Brasília e um extenso manto de sedimentos de origem vulcânico no Norte e marinhos e continentais no Centro e Sul.

Nenhuma outra região da Argentina possui um número comparável de espécies vegetais e animais. Na sua flora e fauna autoctones encontram-se mais de 200 espécies conhecidas de plantas vasculares e mais de 400 aves (a terceira parte do total da Argentina) e inúmeros insetos, muitos dos quais ainda não identificados.

No Norte da Masopotâmia encontra-se a Selva Misionera (fig. 6) que ainda localizando-se ao sul do Trópico de Capricórnio, mantém muitas das características tropicais, por exemplo a sua biodiversidade. Esta selva funde-se com a Selva-Paranaense, e mais ao sul, na Província de Corrientes com os Esteros do Iberá (local de pântanos, lagões e humedais onde se encontram diversas plantas aquáticas e palustres (*Victoria regia* e *irupé*) que formam enormes ilhas flutuantes (fig. 7).

Os ríos são acompanhados de Selvas em Galeria, também destacando-se uma série de palmares como o já mencionado Parque Nacional El Palmar.



Fig. 6 Eco-região selva Paranaense ou selva Misionera na Argentina



Fig 7. *Victoria regia* ou *V. cruziana* (Irupe)

Entre as espécies de plantas **nativas** de interesse (muitas das quais conservam o nome dado pelos indígenas que habitaram estas terras, mais especificamente os guaranies) destacam-se entre muitas outras, as seguintes:

Coníferas: Acayú o *cedro paranaense* (*Cedrela odorata*); Pino paraná o *Araucaria* (*Araucaria angustifolia*)

Palmeiras: Caranday (*Trithrinax campestris*); Caranday brasileiro (*Trithrinax brasiliensis*); Mbocayá o coquito (*Acrocomia aculeata*); Palmera de la jalea (*Butia capitata*); Palmito (*Euterpe edulis*); Pindó (*Syagrus romanzoffiana*); Yataí (*Butia yatay*); Yataí enana (*Butia paraguayensis*)

Árvores e arbustos: Aguaribay (*Schinus areira*); Ambay (*Cecropia adenopus*); Anchico (*Parapiptadenia rigida*); Anchico blanco (*Albizia hassleri*); Araticú (*Annona cherimola*);

Cacheta (*Schefflera morototoni*); Camboatá (*Cupania vernalis*); Cancharana (*Cabralea oblongifoliola*); Carobá (*Bignonia caroba*); Cedro misionero (*Cedrela fissilis*); Ceibo (*Erythrina crista-galli*); Cerella (*Eugenia involucrata*); Curupay (*Anadenanthera colubrina*); Guabirá (*Campomanesia xanthocarpa*); Guabiyú (*Eugenia pungens*); Guatambú (*Balfourodendron riedelianum*); Guayabo blanco (*Eugenia opaca*); Guayabo colorado (*Eugenia cisplatensis*); Guayabo común (*Psidium guajava*); Guayabo del Brasil (*Acca sellowiana*); Guayubira (*Patagonula americana*); Iapoy (*Ficus luschnathiana*); Ibirá (*Ruprechtia triflora*); Ibirá ró (*Ruprechtia apetala*); Incienso (*Myrocarpus frondosus*); Ingá dulce (*Inga edulis*); Jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*); Lapacho amarillo (*Tabebuia serratifolia*); Lapacho blanco (*Tabebuia roseo-alba*); Lapacho negro (*Tabebuia heptaphylla*); Lapacho rosa (*Tabebuia impetiginosa*); Laurel blanco (*Cordia alliodora*); Laurel canela (*Nectandra lanceolata*); Laurel negro (*Nectandra megapotamica*); Loro blanco (*Bastardiopsis densiflora*); María preta (*Diatenopteryx sorbifolia*); Marmelero (*Ruprechtia laxiflora*); Mora blanca (*Alchornea iricurana*); Ñandubay (*Prosopis affinis*); Ombú (*Phytolacca dioica*); Palo rosa (*Aspidosperma polyneuron*); Peterebí (*Cordia trichotoma*); Pino Paraná (*Araucaria angustifolia*); Pitanga (*Eugenia uniflora*); Rabo-itá (*Lonchocarpus leucanthus*); Samohú o palo borracho (*Ceiba speciosa*); etc.

A Fauna

Na fauna da Região Mesopotâmica encontram-se exemplares de puma, capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) fig. 8, tapir (*Tapirus terrestris*) fig. 9, urso formigueiro (*Myrmecophaga tricactyla*) várias espécies de macacos, tatús, yacaré overo (*Caiman latirostris*) e caiman (*Latirostris chacoensis*), cervos dos pântanos (*Blastocerus dichotomus*), diversas serpentes venenosas, gato montés sudamericano (*Leopardus geoffroyi*), águias, papagaios, e a onça, jaguar ou yaguarète (*Panthera onca*) fig. 10.



Fig. 8 Capivara ou carpincho (maior roedor do mundo) Fig. 9 Tapir (*Tapirus terrestris*) Fig10. *Panthera onca* (Jaguar; onça; Tigre americano) IUCN: Near Threatened

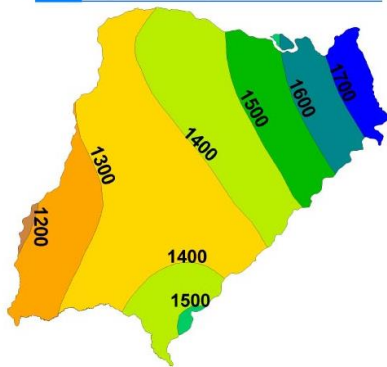
Entre as espécies de aves encontram-se bandurrias, espátulas rossadas, cegonhas, páсарos carpinteiros, garças brancas e mouras, tocanos, guacamaios, araras, tachã (*Chauna torquata*).

Os ríos são também ricos em espécies, dorado (*Salminus brasiliensis*), boga, patí (*Luciopimelodus pati*), pacú (*Piaractus mesopotamicus*), surubís (*Pseudoplatystoma spp*), tararira (*Hoplias lacerdae e Hoplias malabaricus*), etc.

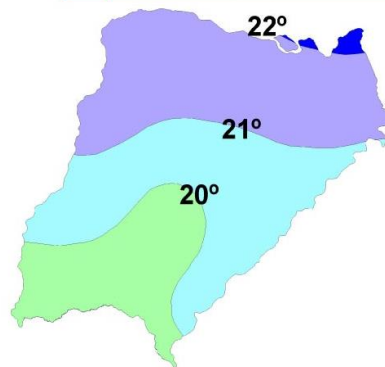
O clima

O clima da região mesopotâmica é subtropical sem estação de seca; as precipitações anuais são da ordem dos 1600 mm, sendo as geadas quase inexistentes. A humidade relativa do ambiente é extremadamente elevada pela presença dos grandes rios, do pantanal e os humedais. A provincia de Corrientes, onde se encontra o INTA Bella-Vista pode caracteriza-se pelos seguintes mapas (Fonte: S. Gómez. Base de dados Agroclimáticos. I.C y A. CJRN. INTA)

PRECIPITACIÓN MEDIA ANUAL (mm)
Serie 1996-2006
Fuente: S.Gómez. Base de datos agroclimática I.C.yA. C.I.R.N. INTA (2008)



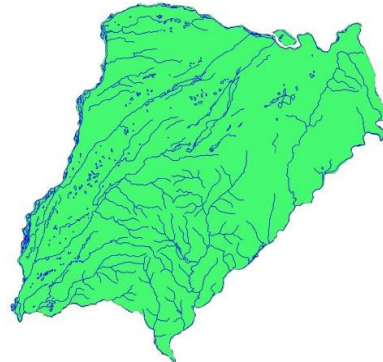
TEMPERATURA MEDIA ANUAL (°C)
Serie 1996-2006
Fuente: S.Gómez. Base de datos agroclimática I.C.yA. C.I.R.N. INTA (2008)

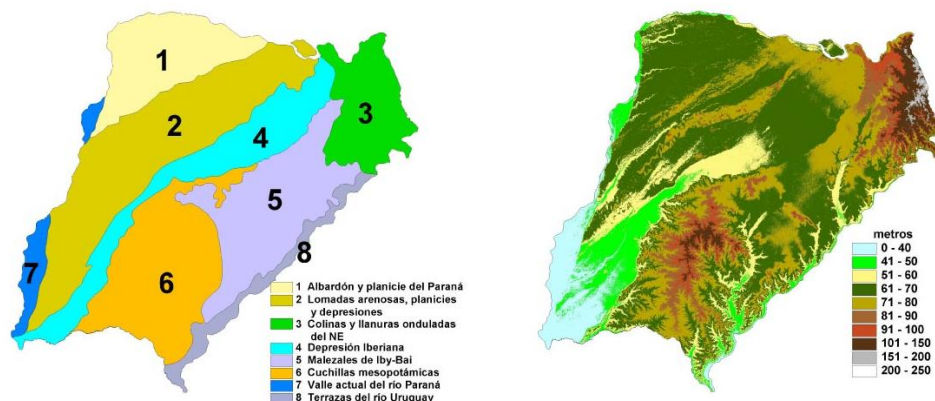


TERRITORIOS FITOGEOGRÁFICOS
Fuente: R. Carnevali "Fitogeografía de la Provincia de Corrientes" INTA, 1994



HIDROGRAFÍA
Fuente: SIG Atlas de Suelos de la República Argentina INTA - Aeroterra (1995)





ESPÉCIES ALVO DA COOPERAÇÃO

As condições de solo e clima da mesopotâmia argentina, acima descritas, fazem possível o crescimento de inúmeras espécies vegetais, entre elas destacam-se espécies lenhosas nativas de grande porte (ver lista da flora mesopotâmica, acima), como assim também de espécies introduzidas pelo seu valor comercial. O INTA conta desde o ano de 2005 com um programa de domesticação e melhoramento de espécies florestais nativas e introduzidas para usos de alto valor (PROMEF). No ano de 2010 destinam-se U\$S 1.800.000, da Componente Plantações Florestais Sustentáveis (BIRF 7520 AR). O PROMEF iniciou-se formalmente em Julho de 2010, como parte do Projecto de Desenvolvimento Florestal financiado pelo Banco Mundial, para financiar o cultivo de diversas espécies florestais nas regiões mais importantes de Argentina, de acordo com a Lei 25.080, que estabelece um regime de promoção do investimento florestal e florestal-industrial. Entre a lista de espécies introduzidas por este programa na Região da Mesopotâmia encontram-se as dos géneros: *Pinus*; *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Toona*, e algumas *Salicaceae*.

A multiplicação clonal por cultura de tecidos do presente informe se encontra assim em linha com o programa argentino de melhora genética e desenvolvimento florestal sustentável.

As espécies alvo da cooperação forma as que a seguir se descrevem

***Grevillea robusta* A. Cunn. ex R. Br.**

Sinónimos:

- *Grevillea robusta* var. *compacta* auct.
- *Grevillea robusta* var. *forsteri* L.H.Bailey
- *Grevillea umbratica* A.Cunn. ex Meisn.
- *Grevillea venusta* A.Cunn. ex Meisn.

- *Stylurus robustus* (A.Cunn.) O.Deg.⁴

O nome do Género *Grevillea* foi dado em honra de Charles Francis Greville, co-founder de la Royal Horticultural Society.

A *Grevillea robusta* (fig. 11) pertence a Família das *Proteaceae*, sendo originária da Costa Leste de Austrália. A Família *Proteaceae*, possui aproximadamente 55 generos e 1.200 espécies, representados por árvores e arbustos, distribuídos no hemisfério sul do planeta (Rodrigues, 1992). A *G. robusta* é conhecida pelos nomes vulgares de: Australian silky-oak; silky oak; southern silky-oak, e em Argentina se o conhece como roble sedoso , roble australiano, roble plateado, árbol de fuego ou pino de oro. É a mais grande do Género *Grevillea*, perenifolia de rápido crescimento, de 18 a 35 metros de altura, com folhas verde-escuras dentadas-bipinadas. As folhas de 15 a 30 cm de comprimento com a cara abaxial cor branco-cinzeno. As suas flores são douradas-laranjas, de 8-15 cm de comprimento. As sementes maduram no final do inverno até princípios da primavera, frutificando em folículos dehiscentes pardo-escuros de 2 cm de comprimento, com uma ou duas sementes com asas.

Esta espécie é usada na elaboração de instrumentos musicais incluindo guitarras. Antes da utilização massiva do alumínio, a madeira desta árvore era usada para o fabrico de janelas e de cercas devido a sua resistencia a podridão. Cresce muito bem em estufas e toleram o ensombramento, mas prefere o sol das zonas temperadas. No exterior necessitam portecção contra as geadas. Uma vez estabelecidas são mais resistentes ao frio (até -8°C), sendo também resistentes a seca. A *Grevillea robusta* é frequentemente usada para enxertia de outras grevilleas difíceis de cultivar. É uma espécie com potencialidades para ser usada na produção de bio-diesel, e como ensombramento para plantas de café.

Interesse da sua multiplicação via micropropagação

Em Argentina e no Brasil a *Grevillea* é utilizada em plantações com a finalidade de produzir madeira e algumas empresas destes países a utilizam para a produção de móveis de qualidade. As sementes por outro lado, apresentam baixa viabilidade e germinação. A colheita das sementes é extremamente difícil, pois estas são expelidas assim que amadurecem, sendo a sua maturação muito irregular. Por possuírem uma alta variação genética, muitos intentos tem sido feitos para a multiplicação vegetativa. No entanto, até agora não existe ainda um protocolo de propagação *in vitro* totalmente fiável para ser aplicado em grande escala.



Fig. 11 *Grevillea robusta*, árvores em floração e detalhe das folhas dentadas-bi-pinnadas, da cortiça e inflorescências masculinas).

***Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S.
Johnson**

O género *Corymbia* pertence a Família das *Myrtaceae*, este grupo semelhante os eucaliptus são conhecidos como: spotted-gums, onde também encontramos o *Corymbia maculata* e o *C. henryi*; (os chamados bloodwoods) anteriormente pertencentes ao Género *Eucalyptus*. *Corymbia citriodora* foi colocado anteriormente no Género *Eucalyptus* e no Sub-Género *Corymbia* por Pryor & Johnson (1971). Depois de uma revisão mais aprofundada Hill & Johnson (1995) colocaram os chamados bloodwoods no novo Género *Corymbia*, com 113 espécies descritas; 33 delas novas espécies. A nova Secção *Politaria*, foi criada dentro do Género *Corymbia* para acomodar os spotted gums.

O nome comum em Austrália é lemon-scented gum. Outros nomes científicos sinónimos são: *Corymbia variegata* (F.Muell.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson; *Eucalyptus citriodora* Hook.; *Eucalyptus maculata* var. *citriodora* (Hook.) F.M.Bailey; *Eucalyptus melissiodora* Lindl.; *Eucalyptus variegata* F. Muel

Os nomes vulgares pela qual se conhece são entre outros: em **América do Norte**: Lemon gum tree; **España**: Eucalipto olor a limón; **França**: Eucalyptus a odeur de citrón; em **Australia**: lemon-scented iron gum; spotted gum; spotted iron gum; em **Alemanha**: Zitronen-Eukalyptus; em **Italia**: Eucalipto a profumo di limone.

Existem também alguns híbridos obtidos na Índia que apresentam maior vigor que os seus parentais (Chadha et al., 1992). Hill and Johnson (1995) mencionam também híbridos naturais entre *C. citriodora* e *C. catenaria* e entre *C. citriodora* e *C. watsoniana* subsp. *capillata*.

Corymbia citriodora (fig. 12) é uma espécie que pode atingir os 50 metros de altura, originária do Leste temperado e tropical de Austrália. O seu nome deriva do latim “citriodorus” que significa odor a limão.

O seu tronco é de cor branco a cobre no verão, suave, uniforme ou ligeiramente as manchas. A sua copa possui folhas angostas como as dos outros eucaliptus e com uma fragrancia muito forte a essencia de limão. Os gomos em forma de pera brotam em grupos de 3 na axila de cada folha. Esta especie prefere solos francos e limosos, cresce em bosques esclerófitos e em laderas de montanhas. A sua floração ocorre nos meses de Janeiro; Abril; Maio; Junho; Julho; Agosto e Dezembro. O *C. citriodora* é uma árvore florestal, usada pela exelente qualidade e densidade da sua madeira. Suas flores são melíferas. O aceite essencial desta árvore esta formada por

citronelal (80%) produzido principalmente no Brasil e na China. Esta substância usa-se como repelente de insectos e em perfumaria.

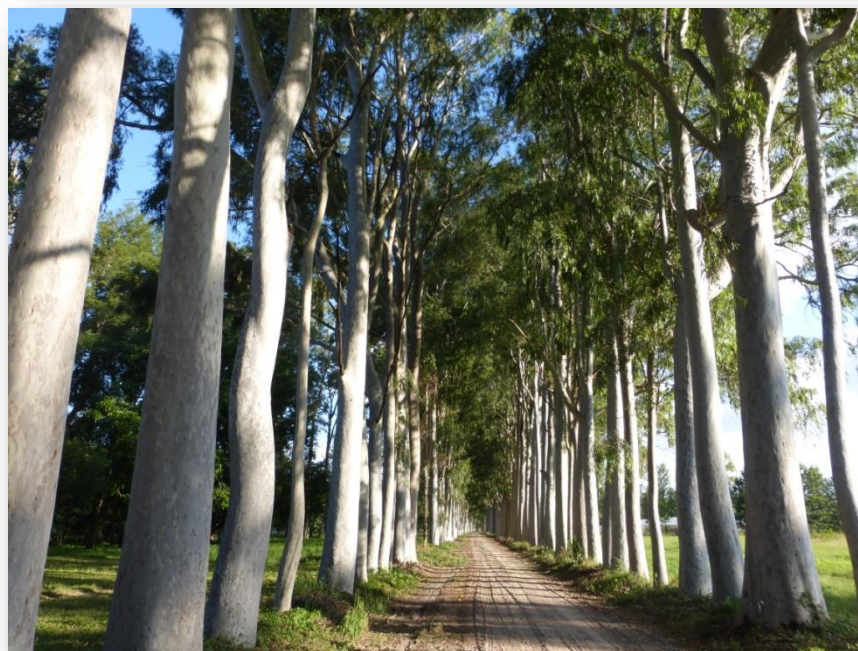


Fig. 12 Exemplares de *Corymbia citriodora* na Estação Experimental INTA Bella Vista (fotos: A. Zavattieri)

Eucalyptus torelliana, *Eucalyptus citriodora* e *E. maculata* foram classificados taxonómicamente por Hill and Johnson (1995) como *Corymbia torelliana*, *Corymbia*

citriodora subsp. *citriodora*, *Corymbia citriodora* subsp. *variegata*, *Corymbia henryi* e *Corymbia maculata*. Estas espécies começaram a valorar-se economicamente nas zonas húmidas e subhúmidas do SE de Queensland e no NE de Nova Gales do Sul (Austrália) para obtenção de madeira de qualidade últimos 10 anos. Em Brasil e Sudáfrica as primeiras introduções de orígenes de *Corymbia* spp. (entonces denominadas de *E. citriodora* e *E. maculata*) realizaram-se na década dos anos 70.

Em Argentina o INTA de Concordia (Entre Rios) fez os primeiros ensaios em 1980 plantando árvores de 5 origens diferentes de *E. maculata*.

Em Australia debido a revalorização da espécie, a domesticação de *Corymbia* spp. reiniciouse fortemente a partir de 1997. Debido á demanda do sector madeireiro em Argentina de especies de alto valor, foi instalado no ano 2000 um ensaio de *Corymbia* spp. em três locais da região. As plantas foram adquiridas no CSIRO (Austrália). Na figura 13 podem ver-se os locais de origem das espécies usadas em Argentina nos ensaios de procedência.

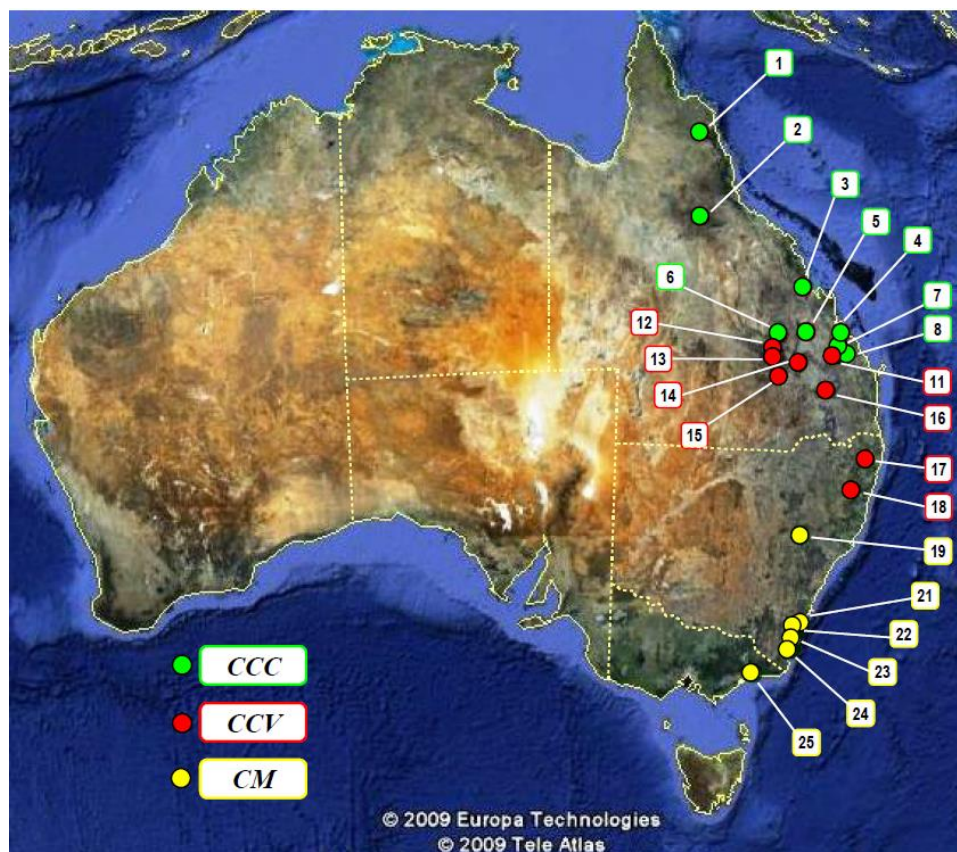


Fig. 13 Locais de origem do material usado na argentina nos ensaios de procedencia e qualidade de madeira, índice de rajadura; proporção de cortiça, etc. CCC: *Corymbia citriodora* subsp. *citriodora*, CCV *Corymbia citriodora* subsp. *variegata*, e CM *Corymbia maculata*.

Nos ensaios realizados foram avaliadas características como desidade básica da madeira; índice de rachadura, proporção de cortiça, etc.

Para todas as características avaliadas comprovou-se uma importante variação natural entre espécies e dentro das diferentes origens, e também entre indivíduos dentro de uma mesma origem, o que deu lugar a estratégias para seleção de material genético superior. Hoje o INTA Bella-Vista desenvolve importantes trabalhos de multiplicação por meio de enxertias, manutenção de colecções de plantas derivadas de sementes e micropropagação de plantas seleccionadas para obtenção de clones de qualidade superior.

Pinus taeda L.

O *Pinus taeda* (fig. 14) é uma conífera que pertence a Família das *Pinaceas*, conhecido vulgarmente nos Estados Unidos e Canada como Loblolly pine, sendo um dos pinheiros nativos do SE dos Estados Unidos desde Texas até Flórida e do Delaware no Norte até New Jersey no Sul.



Fig 14. *Pinus taeda* (conos masculinos; plantação; cortiça, cones femininos; plantação)

A indústria da madeira nos Estados Unidos classifica esta espécie como Southern Yellow Pine, sendo a segunda mais comum entre as árvores dos Estados Unidos depois do red maple (*Acer rubrum*) e a mais importante do ponto de vista comercial no SE dos Estados Unidos.

O genoma desta espécie foi o primeiro sequenciado de entre outros 100 do género *Pinus*. Em Março de 2014 soube-se que o genoma desta espécie é o maior conhecido, possuindo 20.15 bilhões de pares de bases (sete vezes o do genoma humano). O número de genes é estimado em 50.172 dos quais 15.653 estão confirmados. Muitos dos genes encontram-se duplicados; alguns possuem os maiores intrões observados entre 24 espécies vegetais totalmente sequenciadas

O *Pinus taeda* pode alcançar uma altura de 30 a 35 metros, com um diâmetro aproximado de (DAP) de 1,5 m. Excepcionalmente alcança os 50 m de altura. As agulhas de 12-22cm de comprimentos encontram-se agrupadas de a três, são de menor tamanho que as do Slash pine (*Pinus elliottii*), e maiores que as do Spruce pine (*Pinus glabra*). As agulhas perduram dois anos antes de caer, o que lhe confere um carácter de sempreverde. Os cones são verde, tornando-se castanhos-claro-acinzentado quando maduros. Os cones são de 7-13 cm de comprimento.

Esta espécie caracteriza-se ainda pelo seu rápido crescimento e adapta-se bem a solos de argila ácida.

Em Argentina existem 1.200.000 hectares forestadas com bosques de cultivo de diversas espécies, muitas das mesmas introduzidas pelo alto valor comercial como é o caso das espécies do presente relatório. O *Pinus taeda* introduzido nos anos 70 na Argentina, representa 30% do total da área de bosques plantados no país sendo a espécie mais plantada na Província de Misiones (Mesopotâmia) e encontrando-se importantes áreas da espécie na Província de Corrientes (Mesopotâmia) e na Província de Córdoba na região Centro do país.

A utilização da madeira das coníferas em Argentina reparte-se nas seguintes áreas: serraria: 45%; celulose e papel 30%; tabuleiros MDF (Medium Density Fiberboard) laminas ou chapas de madeira 15%; energia 10%.

Pela importância económica do *Pinus taeda*, diversos estudos de procedência, pomares de sementes, enxertia e multiplicação vegetativa realizam-se em Misiones e Corrientes. No INTA Bella-Vista a multiplicação vegetativa desta espécie via embriogenese somática esta sendo investigada, assim como a multiplicação vegetativa de rebentos obtidos por brotes a partir de estaquia.

Trabalhos realizados na propagação *in vitro* na Estação Experimental Bella-Vista

Micropropagação de *Grevillea robusta*

Os trabalhos previamente realizados na propagação *in vitro* desta espécie começaram em 2012 com o objectivo de rejuvenescer o material existente na coleção de *Grevilleas* existente na própria Estação e da qual foram feitas estacas para obtenção de plantas mães (Fig.15)



Fig 15. Coleção de plantas mães de *Grevillea robusta* na Estação INTA (foto A. Zavattieri)

Nas primeiras introduções para o estabelecimento de plantas mães realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias em Corrientes, como na Estação Experimental Bella Vista foram testados diferentes protocolos de desinfecção, não sendo efectivos, especialmente no material trazido directamente do campo devido a presença de fungos nos tecidos corticais. Os materiais tinham sido lavados com detergente e cepilhados para destruir a enorme quantidade de pelos que cobre os ramos de *Grevillea* e que dificultam a entrada em contacto dos desinfectantes com a superfície dos caules (ver fig.16).

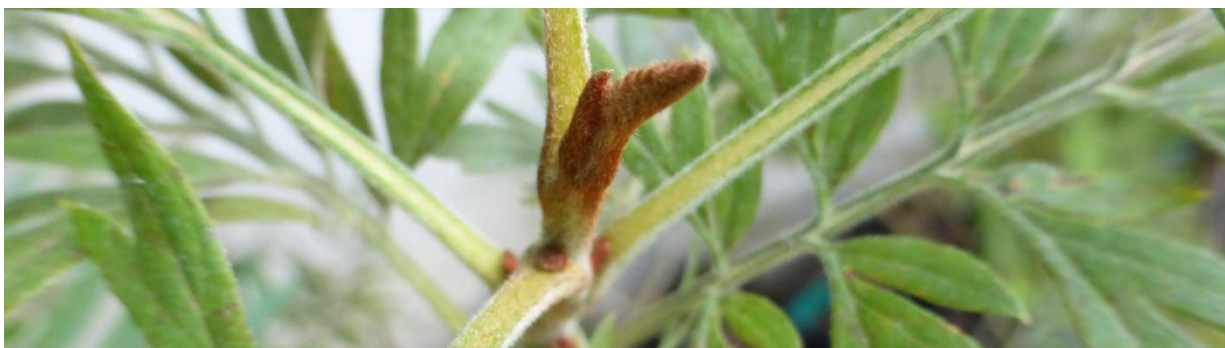


Fig. 16 Gomo apical e detalhe da pilosidade esbranquiçada de folhas, caules de gomos (foto: A. Zavattieri)

Alguns materiais que se conseguiram estabelecer de forma aséptica mostraram com o decorrer da cultura *in vitro* a presença de bactérias de origem endógeno (contaminação endofítica).

Esta situação foi verificada tanto nas culturas líquidas realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Faculdade de Agronomia como nos meios semi-sólidos usados no Laboratório da Estação INTA Bella-Vista.

Em uma segunda fase foram testadas duas novas desinfecções, uma com Peróxido Sulfato Ácido de Potássio e outra com Hipoclorito de Sódio). Os resultados destes tratamentos encontram-se na tabela 1.

No Laboratório INTA prévia desinfecção no fluxo laminar procedeu-se a um lavado em solução de lexivia 5% e umas gotas de detergente, com esta solução procedeu-se a realizar um cepilhado de forma a eliminar os pelos epidérmicos, seguidamente foram lavados três vezes em água destilada estéril. A alta oxidação observada em estes explantes nos dias seguintes a sua introdução em cultura provavelmente esteve relacionado com as feridas provocadas pelo cepilhado.

Tabela 1. Tratamentos aplicados para a desinfecção de explantos de *Grevillea robusta*

Tratamento de desinfecção	Laboratório	% Infecção	% de Oxidação	% de Estabelecimento
T₁ NaOCl 20%, 30min	FCA-UNNE	56%	3	41
T₂ NaOCl 40%, 30 min	FCA-UNNE	53%	7	40
T₃ NaOCl x2 30min	FCA-UNNE	17%	10	73
T₄ KHSO ₅ 30min	INTA	53%	40	7
T₅ NaOCl 5% 30min	INTA	44%	46	10

Os rebentos produzidos no meio de indução em MS foram repicados a meios líquidos onde todos os rebentos contaminaram como indicado anteriormente. Os rebentos que sobreviveram no laboratório do INTA estão sendo multiplicados em meio de Murashige e Skoog (1962) suplementado com 1ml de Ácido Indol Butírico (IBA) e 0,08 mg^l⁻¹ de Benzylaminopurina (BAP) segundo o protocolo de Rajasekaran, 1994.

Os explantes em cultura apresentaram com o tempo algumas deformações como exesso de calos na base dos explantes, folhas deformes, zonas escuras nas folhas ou pelo contrário zonas decoloradas, como se observa na figura 17

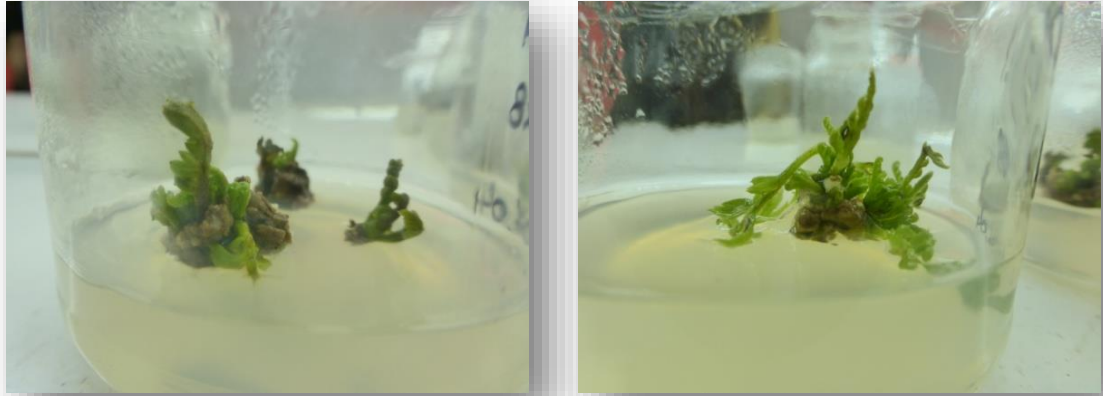


Fig. 17 Diferentes problemas encontrados na cultura de *Grevillea* como calos na base do explanto (esquerda) e folhas deformes com abundante calo na base (direita).

O protocolo existente no laboratório para rejuvenescimento de caules epicórmicos é o seguinte

Indução

Meio de Murashige e Skoog (1962) $\frac{1}{2}$ macroelementos; micronutrientes de Murashige e Skoog (1962) sem diluição; 1 mg l^{-1} Vitamina B1; $2.22 \text{ } \mu\text{mol}$ BAP; 30 g l^{-1} de sacarose e 10 g l^{-1} agar Sigma. O pH ajustado a 5.8. O meio é colocado em tubos de 7 ml e esterilizado a uma atmosfera de pressão durante 20 minutos.

Meio de multiplicação

Meio de Murashige e Skoog (1962), $4.44 \text{ } \mu\text{mol}$ BAP; $2.685 \text{ } \mu\text{mol}$ NAA (Naphtalene Acetic Acid); 30 g de sacarose; $7,5 \text{ g}$ de agar Sigma. pH ajustado a 5.8. São colocados em frascos SIGMA de 100 ml.

Ainda não existe material em enraizamento.

Os principais problemas na cultura de *Grevillea* são sem dúvida o escasso número de plantas que se consegue limpar (descontaminar) para colocar em cultura e os problemas de oxidação derivados do facto de ser material lenhoso e da forte desinfecção que se tem que realizar, mais as feridas provocadas pelo cepilhado; pelo que o nº de plantas que sobrevivem a fase de

indução são muito escassas. Por outro lado as plantas em meio de multiplicação apresentavam os problemas já descritos acima: calos na base, folhas deformes e/ou amareladas, etc.

Durante a minha estadia sugeri tratamentos alternativos e que forma testados com o intuito de corrigir os problemas da cultura de *in vitro* de *Grevillea*. Alguns dos resultados se apresentam neste relatório. Outros estão sendo analisados para a sua publicação.

Tratamentos realizados durante a minha estadia

Ensaio de desinfecção (18 de Maio de 2015): Ramos das plantas da colecção de *Grevilleas* da EEA INTA Bella Vista, previamente tratados no local com uma solução de Carbendazim de concentração 1/000; foram trazidos ao laboratório para retirar os gomos que seriam colocados em cultura. O desenho experimental das plantas mães no campo e das que foram retirados os ramos para o ensaio de desinfecção e indução é o seguinte

45B26	45B26	
45B26	45B26	
45B26	45B26	
45B26	45B26	
45B26	47B7	114B21
47B7	47B7	114B21
47B7	47B7	114B21
47B7	1B14	114B21
100B45	1B14	110B34
73B5	1B14	110B34
1B14	1B14	110B34
105B38	105B38	110B34
	105B38	105B38

As plantas 45B26 são denominadas planta 7; as 47B7 planta 8; a 100B45 planta 22; a 73B5 planta 14; a 1B14 planta 1; a 114B21 planta 28 e a 110B34 planta 26 quando são colocadas em cultura para facilitar a identificação nos frascos. Na figura 18, podem ver-se os ramos de algumas das plantas mães assim que chegam ao laboratório para serem retirados os explantes

(pequenos ramos com gomos axilares) que são

sujeitos aos tratamentos de desinfecção T1; T2 e T3 (como se descrevem a seguir)



Fig. 18 Vasos contendo os ramos das plantas mães dos quais vão obter-se os gomos axilares que são sujeitos posteriormente aos tratamentos de desinfecção.

Tratamento 1

As plantas foram lavadas em água corrente toda a noite e depois se fez o seguinte tratamento: desinfecção com álcool 75% durante três segundos, lavado com água estéril 3 vezes; 20 minutos em hipoclorito de sódio a 20% durante 20 minutos, lavagem com água estéril. Este material foi seguidamente colocado em meio de cultura MS total macro, micro e com as vitaminas de MS, 1,5 μmol de BAP, 30 g l^{-1} de sacarose, 1 mg l^{-1} de vitamina B1 e 10 gl^{-1} de Bacto Agar. No caso do tratamento 1 foi adicionado ao meio de cultura Polivinilpirrolidona (PVP) a 100 mg l^{-1} que é um agente antioxidante em este caso incorporado no meio.

Tratamento 2

As plantas foram lavadas em água corrente durante 3 horas e posteriormente se realizou o seguinte tratamento de desinfecção: álcool a 75% durante três segundos, lavar com água estéril pelo menos 3 vezes; 30 minutos em Carbendazim 1/000; lavagem em água destilada estéril 3 vezes; hipoclorito de sódio a 20% durante 20 minutos, e nova lavagem com água destilada

estéril (três vezes). Seguidamente forma colocados em cultura como no tratamento 1 mas sem adição de PVP.

Tratamento 3

Só nas plantas 28 (114B21). Idem ao tratamento 1, mas antes da colocação em cultura dos rebentos foi efectuada uma passagem por uma solução antioxidante de ácido ascórbico 100 mg l^{-1} + ácido cítrico 1500 mg l^{-1} . Este ultimo tratamento antioxidante é para ver o efeito comparativo de um agente antioxidante que não formar parte do meio de cultura como é o caso do tratamento 1 com o PVP. O meio base é idêntico ao do tratamento 1.

Assim o ensaio total ficou delineado como se mostra na tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental para o ensaio de desinfecção de gomos axilares de *Grevillea robusta*

PLANTA	Trat. 1 (T1)	Trat. 2 (T2)	Trat. 3 (T3)
Planta 1	10 rebentos	10 rebentos	
Planta 7	10 rebentos	10 rebentos	
Planta 8	10 rebentos	10 rebentos	
Planta 22	10 rebentos	10 rebentos	
Planta 14	10 rebentos	10 rebentos	
Planta 28	10 rebentos	10 rebentos	17 rebentos
Planta 26	10 rebentos	10 rebentos	

Todas as culturas ficaram uma semana na escuridão para control da oxidação (fig. 19)



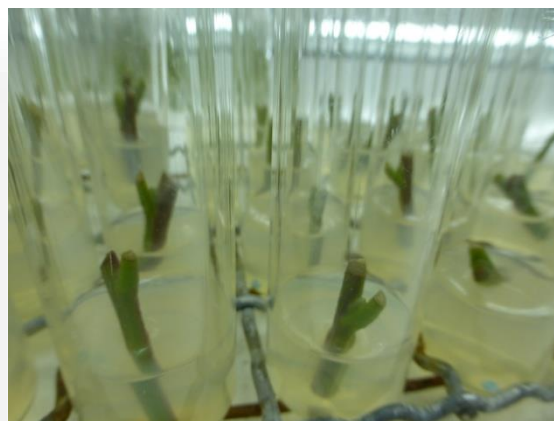


Fig 19. Recoleção ramos no campo de plantas mães de Grevillea. Estacas de Grevillea robusta com um gomo axilar, em meio de iniciação colocados no dia 19 de Maio de 2015. Estes permaneceram uma semana na escuridão para reduzir a oxidação.

Passadas duas semanas forma contabilizados os efeitos dos tratamentos e os resultados podem ver-se na tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos de desinfecção realizados a ramos curtos com gomos para serem introduzidos nas culturas para a fase de indução e resultados obtidos as duas semanas em cultura.

Planta	Tratamento	Limpos	Contaminados	Agente
1	T1	2	18	F
1	T2	4	16	F e B
7	T1	0	20	F
7	T2	3	17	F e B
8	T1	7	13	F
8	T2	4	16	F e B
22	T1	1	19	F
22	T2	1	19	F
24	T1	3	17	F
24	T2	2	18	F e B
26	T1	1	19	F
26	T2	4	16	F e B
28	T1	0	20	F
28	T2	0	20	F e B
28	T3	0	17	F

Como pode observar-se na tabela 3 existiram grandes contaminações, em todos os casos com fungos e em alguns também com bactérias. As estacas das plantas mães 7 e 28 contaminaram na sua totalidade. As estacas com gomos axilares da planta 8 tiveram menor quantidade de

contaminações com 7 sem contaminar para o tratamento T1, o que representa o 35% de gomos limpos; a mesma planta no tratamento T2 teve menor sucesso com só 20% das estacas sem contaminações. Não existe um padrão definido para tratamento x planta, no entanto aparentemente o tratamento T2 teve no total 18 plantas livres de contaminações e para o tratamento T1 obtiveram-se 14 plantas livres de contaminantes.

As observações continuam cada semana, pois existem contaminantes endógenos que aparecem frequentemente após semanas do início das culturas. O escasso número de plantas obtidas em esta fase requer uma nova estratégia de desinfecção, provavelmente a limpeza dos pelos que cobre a superfície dos caules, com um agente de cepilhado que não danifique os tecidos, mas que ao mesmo tempo remova os pelos de forma a facilitar o contacto entre os agentes desinfectantes e a superfície dos ramos. Além disso podem ajustar-se melhor os tempos de cada tratamento e ainda verificar se uma maior concentração do fungicida usado (Carbendazim) poderá diminuir a presença dos fungos. Estes ensaios continuaram a ser realizados logo da minha partida e são objeto de análise para publicação.

Uma outra proposta, que seria posteriormente testada seria a cultura de meristemas. Esta última técnica possui a vantagem de usar uma parte extremadamente pequena de material e pelo geral limpa de contaminantes (mais especificamente se usa para obtenção de plantas livres de vírus) mas também por ser um material muito protegido dos agentes externos poderá ser a solução dos problemas de contaminação ambiental no início de cultura de *Grevillea*.

Fase de Multiplicação

Foram feitas alterações nos meios de multiplicação das plantas já em cultura e que apresentavam problemas de exsso de calos, folhas deformes, e zonas escuras ou cloróticas como se observa na fig 17. A hipótese de sobredosagem de hormonas nesta fase (alta concentração de BAP) poderia estar na origem das anormalidades observadas, dado a *Grevillea* suportar mal concentrações de BAP $\geq 1,5 \mu\text{mol l}^{-1}$. Sendo assim e para salvar algumas das plantas que se encontravam em cultura foram transferidas para o um meio com idêntica formulação mas no qual foram reduzidos os níveis de BAP e adicionado carvão activado. Este último poderá colaborar na absorção de compostos de acumulação no meio de cultura que estejam a ser tóxicos para as microplantas. Os resultados estão sendo analisados e preparados para publicação, no entanto os efeitos benéficos destas alterações podem ser vistos na figura 20.

Conseguiram-se em todos os casos plantas mais saudáveis, mais verdes e menos deformes, sem calos na base dos explantos.

Os novos rebentos produzidos são isolados e novamente passam para a fase de multiplicação. Até ao meu regresso ainda não tinham sido testados meios de enraizamento.

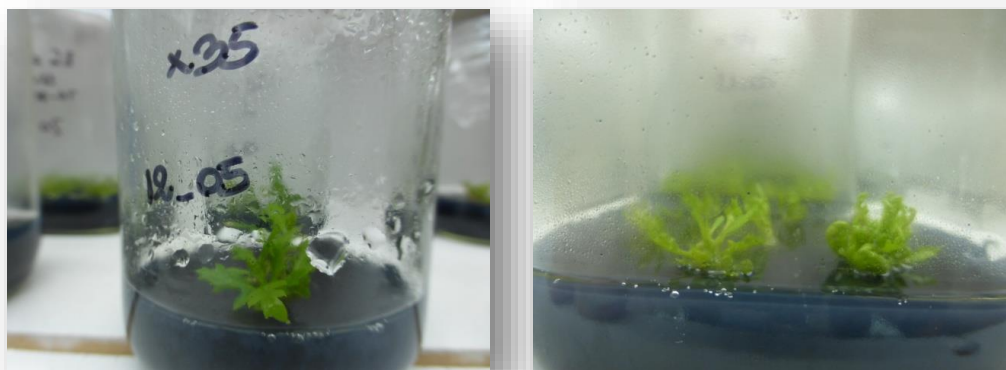


Fig. 20 Vista geral de plantas de *Grevillea* mostrando bom crescimento no meio testado com carvão activado e reduzido BAP. As folhas se apresentam normais e não se observam calos na base dos explantos

Micropropagação de *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (F. Muell.) A. R. Bean & M. W. McDonald

Os trabalhos com *C. citriodora* subsp. *variegata* (F. Muell.) A. R. Bean & M. W. McDonald (CCV) iniciaram-se no INTA Bella Vista em 2012 devido a importância económica desta espécie para a Província de Corrientes e para toda a Mesopotâmia. O objectivo foi contar com plantas clonais de qualidade superior. Segundo López e Vera Bravo, 2013 o CCV é um dos taxa de *Corymbia* que melhor comportamento possui em relação ao volume e retitude de fuste na Mesopotâmia Argentina, destacando-se por possuir uma densidade entre 597 e 704 Kg/m³, valores que permitem a esta espécie acceder a estartos mais altos na cadeia de valor florestal, pelo que a sua propagação vegetativa foi iniciada com o objectivo entre outros de melhorar a capacidade de enraizamento de algumas procedências.



Plantação derivada de sementes de plnatas de *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (CCV) na EEA INTA Bella Vista

Tendo em conta a pouca informação sobre a cultura in vitro desta espécie, intentaram-se na EE INTA-Bella Vista alguns meios de cultura enriquecidos.

Os objectivos do trabalho realizados foram o de determinar o efeito da adição dos compostos Nitrato de Prata (AgNO_3) e Tiosulfato de Sódio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (geralmente usado como pentahidratado) aos meios de multiplicação e enraizamento e determinar a influência do tipo de luz na capacidade de enraizamento dos explantos de *Corymbia*. O ião prata (Ag^+) é um inibidor que interfere na acção do Etileno (Beyer, 1979) que provoca um envelhecimento dos tecidos em cultura, pelo que é usado no controlo deste gas para melhora da regeneração in vitro; não obstante muitas vezes reaciona com os iões Cl^- formando o precipitado Cloreto de Prata (AgCl). Para impedir esta ligação adicionam-se ao meio o ião tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) na forma de Tiosulfato de Sódio (como acima mencionado) que favorece a absorção do ião Ag^+ (Fortin and Campbell, 2001).

A suplementação com Ag^+ em forma de Nitrato de Prata (NO_3Ag) e Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) nos meios de cultura favorecem a regeneração in vitro de génotipos que envelhecem rapidamente durante o processo de estabelecimento e multiplicação.

Por outro lado na fase de enraizamento as plantas foram colocadas em presença luz vermelha LEDs (Light-Emitting Diodes) em ensaio comparativo com lâmpadas Cool-White.

De acordo com estudos recentes as lampadas LEDs (Light-Emitting Diode) permitem um crescimento maior das plantas em diferentes tipos de culturas (estufas; câmaras de crescimento, fitotrons, etc) a menor custo, já que estas luzes emitem só no comprimento de onda que é usado pelas plantas, não necessitam de suportes adicionais e produzem só a quantidade de calor requerido para o crescimento, não sendo necessaria uma redução da temperatura das câmaras de crescimento de plantas.



Painel de LEDs usado em crescimento de plantas pela NASA

Materiais e Métodos

Foram usados 4 árvores selectos de *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (Lópes e Vera Bravo, 2013). Os explantes (nó e entrenó de 1,5 cm de comprimento) se extraíram de raminhos (1 m de altura) de enxertos que cresceram bem em estufa fig. 21.

Os explantes antes da sua cultura são desinfectados sumergindo-os numa solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 3 ‰ e 3 gotas de detergente, mantendo-se em agitação durante 5 minutos e sendo posteriormente enxuagados com água corrente.

A desinfectação nas câmaras de fluxo laminar é idêntica a anterior com a única diferença ue os explantes são no final do tratamento lavados com água destilada estéril, seguidamente cada explante é colocado no meio de estabelecimento ou iniciação (ver em baixo).



Fig. 21 Plantas mães de *Corymbia citriodora* subsp. variegata (CCV) doadoras de estacas e provenientes de cultura *in vitro*.

Os rebentos gerados durante a fase inicial de estabelecimento da cultura são sub-cultivados nos meios de multiplicação, este processo de multilicação de brotes foi realizado durante 6 meses. Os explantes usados para o enraizamento possuem aproximadamente 3 cm de altura com pelo menos 4 folhas verdadeiras e o ápice caulinar. O período de enraizamento é de 24 dias. Para considerar um rebento enraizado deveria contar pelo menos com uma raiz gerada a partir do caule do rebento.

Meios usados nas diferentes fases

1-Estabelecimento (iniciação)

Meio de MS (Murashige e Skoog; 1962) completo com vitaminas de MS, 1 mg l^{-1} de Benzylaminopurina (BAP), 30 g l^{-1} de sacarose, e 2 g l^{-1} de phytigel

2-Multiplicação

Para a multiplicação foram usados dois meios diferentes

- a) MS completo + 1 mg l^{-1} de BAP, 30 g l^{-1} de sacarose, 7 g l^{-1} de agar ou 2 g l^{-1} de phytigel
- b) MS modificado ($1/2$ da fonte de N do MS + nutrientes minerais, vitaminas e aminoácidos do MS completo) + 340 mg l^{-1} de Nitrato de Prata (NO_3Ag) + 49,6

mgl⁻¹ de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃·5H₂O) + 1 mgl⁻¹ de BAP e 30 gl⁻¹ de sacarose + 7 gl⁻¹ de ágar ou 2,5 gl⁻¹ de phytigel.

3-Enraizamento

Para o enraizamento usou-se o seguinte meio de cultura:

MS completo + 340 mgl⁻¹ de NO₃Ag + 49,6 mgl⁻¹ de Na₂S₂O₃·5H₂O + 0,3 mgl⁻¹ de ácido indolbutírico (IBA) + 30 gl⁻¹ de sacarose + 2,5 gl⁻¹ de phytigel.

No momento de preparar os meios de cultura e antes de adicionar o agente gelificante ajustou-se o pH a 5.8 com (OH)K ou HCl 0.5N. Uma vez adicionado o agente gelificante e dissolver-se por meio de calor (no microwaves), o meio foi distribuído em tubos de ensaio de 20 ml para o caso do estabelecimento ou em frascos de vidro de 40 ml para multiplicação e enraizamento. Uma vez distribuídos os meios foram autoclavados a 1 atm de pressão durante 20 minutos.

Todos os explantes induzidos para estabelecimento e multiplicação de rebentos mantiveram-se na câmara de cultura iluminados com lâmparas fluorescentes Cool White e uma irradiância de 90 µmol m⁻² s⁻¹ durante 16 horas, a uma temperatura de 24°C ±2°C e 22°C ±2°C durante o período de escuridão.

Os tratamentos de luz usados para o enraizamento foram luz branca fluorescente por meio de lâmpada Cool White com uma irradiância de 90 µmol m⁻² s⁻¹ e luz vermelha provida por lâmpadas LEDs a 60 µmol m⁻² s⁻¹ durante 16 horas por dia.

Os dados obtidos sobre a influência da luz no enraizamento foi analisada por meio de análise de variância com o procedimento glm e as médias comparadas pelo teste de Tukey 0,005% de probabilidade (SAS V8, 2002). Prévio ao análise os dados foram transformados aplicando raiz quadrada a cada valor somado 1, porque existiam observações com valores de zero.

Resultados e Conclusões

Durante as fases de estabelecimento o meio de MS provocou problemas de amarelamento generalizado nas folhas dos primeiros rebentos, observados as duas semanas de iniciadas as culturas, pelo que foi necessário fazer uma repicagem rápida para os meios de multiplicação. Novamente foi possível observar que o meio 2 com MS completo voltou a ocasionar o amarelamento das lâminas foliares, dos vástagos e dos ápices (signos de envelhecimento dos tecidos). Estes signos de envelhecimento foram mais severos que aqueles reportados para *C. maculata* (Steinitz et al., 2010) pelo que o meio 2 foi eliminado do ensaio. No meio 3 com MS modificado, o desenvolvimento dos rebentos foi normal e obteve-se uma alta taxa de multiplicação, duplicando-se com cada nova sub-cultura, não entanto, estes rebentos quando

cultivados no meio de cultura com phytagel como agente gelificante apresentaram sintomas de vitrificação. Em contrapartida em ágar apresentaram sintomas de amarelamento das folhas, ainda que leve, pelo que decidiu-se intercalar os meios cada 15 dias em cultura. Deste modo, se infere que o meio que continha Ag^+ e $S_2O_3^{-2}$ donde evidentemente o ião prata interfere na síntese do etileno se inibe o envelhecimento, e em precencia de $S_2O_3^{-2}$ evita-se a precipitação de $ClAg$, pelo contrário favorece-se a absorção de Ag^+ (Fortin and Campbell, 2001). Os resultados da análise de variância para o enraizamento revelou diferenças significativas ($P \leq 0,001$) entre os materiais testados nos dois tratamento de luz (Cool White e LEDs); as plantas 14 e 19 diferem significativamente (teste de Tukey 0,005%) como mostra a figura 22. Da observação da qualidade e densidade de raízes produzidas entre os tratamentos de luz, não são evidentes diferenças em quanto a presença de raízes secundárias. Observou-se que no meio de enraizamento com luz branca podem ocorrer caída das folhas no momento de extrair os rebentos enraizados.

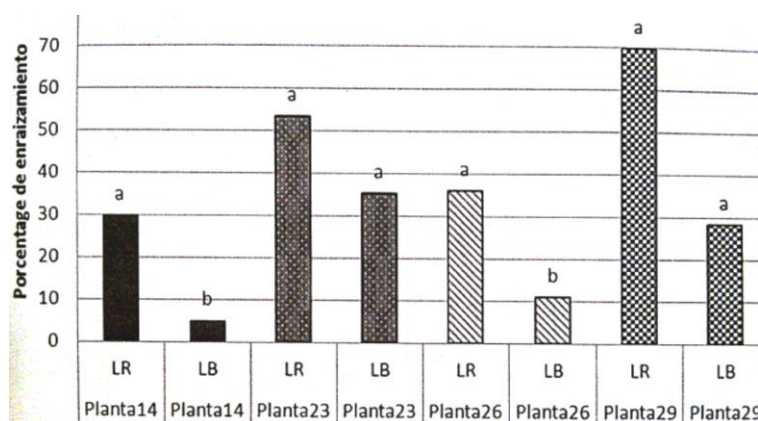


Fig 22. Percentagem de enraizamento *in vitro* dos genótipos 14, 23, 26 e 29 para os tratamentos luz branca Cool White (LB) e luz vermelha LEDs (LR). Letras diferentes evidenciam diferenças significativas com o teste de Tukey com $\alpha=0.005\%$ (Fonte: Eng. Carlos David Vera Bravo)

Parte dos materiais enraizados foram passados para local definitivo de forma exitosa e formam hoje parte da coleção de plantas para macropropagação.

A percentagem de enraizamento em geral foi superior na luz das lâmpadas LEDs, variando entre 31 e 70%. A maior percentagem de enraizamento ocorre na planta 29 com 70%, e a planta 31 com só 31%. Na luz branca estes materiais enraizaram 28 e 5% respectivamente.

É evidente que a qualidade de luz influencia as diferentes fases da cultura *in vitro* como indicam Merkle et al., 2005. É também provável ue a partir de material rejuvenescido *in vitro* os rebentos tenham uma maior capacidade de enraizamento para produção clonal por meio de cuttings, se bem que em geral os híbridos de *Corymbia* apresentam baixas taxas de enraizamento como o descrevem Hung e Trueman, 2011.

Os resultados obtidos põem em evidência requerimentos específicos em quanto aos componentes do meio de cultura e as condições físicas na diferentes fases da micropropagação de *Corymbia citriodora* subsp. *variegata*. Por outro lado a luz vermelha das lampadas LEDs incrementou a percentagem de enraizamento dos genótipos testados.

NOTA: Estes resultados forma transcriptos do trabalho de apresentado pelo Eng. Carlos David Vera Bravo na VI reunião do Grupo de Genética e Melhoramento Vegetal GEMFO na EEA INTA Delta del Parana, Argentina em Abril de 2014).

É de destacar que se bem, foram obtidos resultados significativos para a micropropagação desta espécie na EEA INTA Bella Vista o meu trabalho com *Corymbia* teve como objectivo contribuir para a solução de problemas relacionados com a fase de multiplicação. Foram tomados como base os trabalhos acima apresentados, pelo que muitos detalhes da cultura não são repetidos nos novos ensaios que fizemos em cooperação.

Problemas encontrados nas plantas derivadas das culturas de *Corymbia* e novas propostas para a sua multiplicação

De uma primeira avaliação que fiz as culturas in vitro de CCV a única fase que ainda apresentava certos problemas foram o da fase de multiplicação por um excesso de plantas nos frascos usados e conseguinte acúmulo de substância derivadas de morte de parte do material (tal vez excesso de etileno ou de outros compostos de oxidação, que por acúmulo terminam por prejudicar todas as plantas existentes em um frasco). A figura 23 mostra um exemplo do estado das plantas de CCV na fase de multiplicação.

É também de destacar que muitos dos problemas encontrados nas culturas derivam do facto de existir um só técnico de laboratório que realiza todas as funções relativas a micropropagação das espécies citadas neste relatório, e de outras como *Eucalyptus grandis* que também formam parte do trabalho do mesmo técnico. Entre estes trabalhos encontram-se a preparação de meios de cultura e a sua esterilização, a desinfeção de tudo o material proveniente do campo, a esterilização do material de vidro e material usado nos fluxos laminares, a manutenção dos stocks de químicos e a sua renovação, a posta em cultura e repicagens das plantas nas fases de iniciação, multiplicação, enraizamento, etc. É natural que muitas culturas sofram assim de envelhecimento por falta de uma rotina de repicagens.

A falta de pessoal é de facto, um dos principais problemas que enfrentam na actualidade muitos laboratórios de investigação em biotecnologia vegetal, tanto na Argentina como em Portugal. Existem também muitos períodos com estagiários de mestrado e doutoramento, mas terminado o tempo das suas bolsas, os técnicos permanentemente contratados voltam a acumular todos os trabalhos laboratoriais.

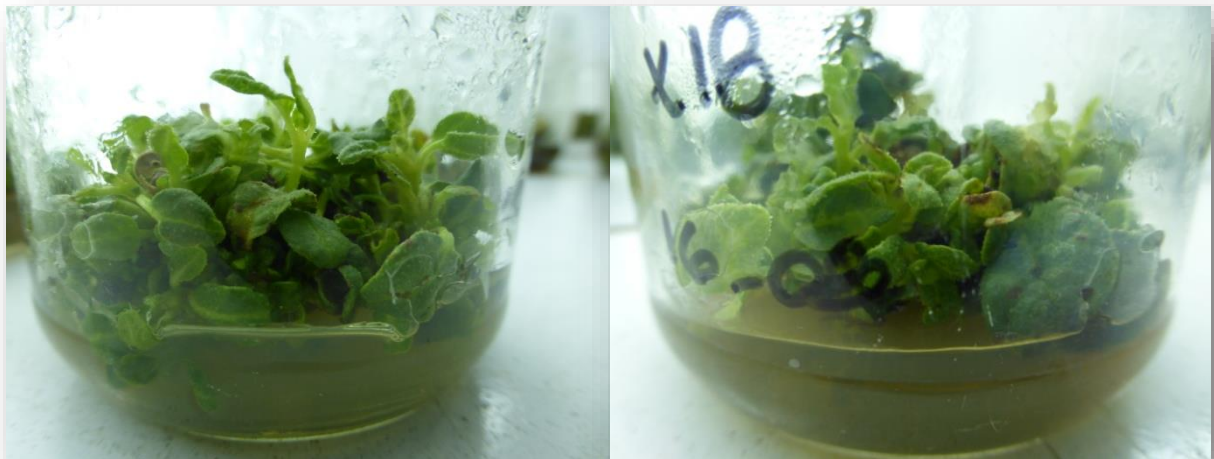


Fig.23 Frascos de cultura com plantas de *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* durante a fase de multiplicação dos explantes. Pode observar-se o excesso de material por falta de repicagem, coloração acastanhada em algumas folhas. A cor dos meios de cultura indica um acúmulo de substância provenientes da oxidação.

Ensaio realizado para solução de problemas na micropropagação de CCV

Para resolver os problemas durante a fase de multiplicação (acima descritos, fig. 21) foram testados a 20 de Maio de 2015 os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 (T1):

Meio de MS (Murashige e Skoog, 1962) + vitaminas de MS + 340 mg^l⁻¹ de Nitrato de Prata (Ag NO₃) + 49,6 mg^l de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃·5H₂O) + 0,9 µm de BAP (quantidade reduzida em relação ao meio usado regularmente) + 30 g de sacarose + 2 g de Phytigel Sigma ® em lugar dos 7,5 g de agar microbiológico. *AgNO₃ para reduzir oxidação por etileno*

Tratamento 2 (T2)

Idêntico meio de multiplicação do T1 mas sem adição de AgNO₃

Tratamento 3 (T3)

Idêntico meio de multiplicação do T2 e adição neste meio de 0,3% de carvão activado

Estes meios de cultura foram colocados em frascos de vidro de 250 ml (fig. 24^a e 24b) em reemplazo dos regularmente usados de 100 ml

O ensaio ficou deliançado da seguinte forma:

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Planta nº 1	10 frascos	10 frascos	10 frascos
Planta nº 3	10 frascos	10 frascos	10 frascos

Intentamos que o número de rebentos colocados por frascos fosse o mais uniforme possível. Colocaram-se 4 rebentos por frasco (fig. 24)

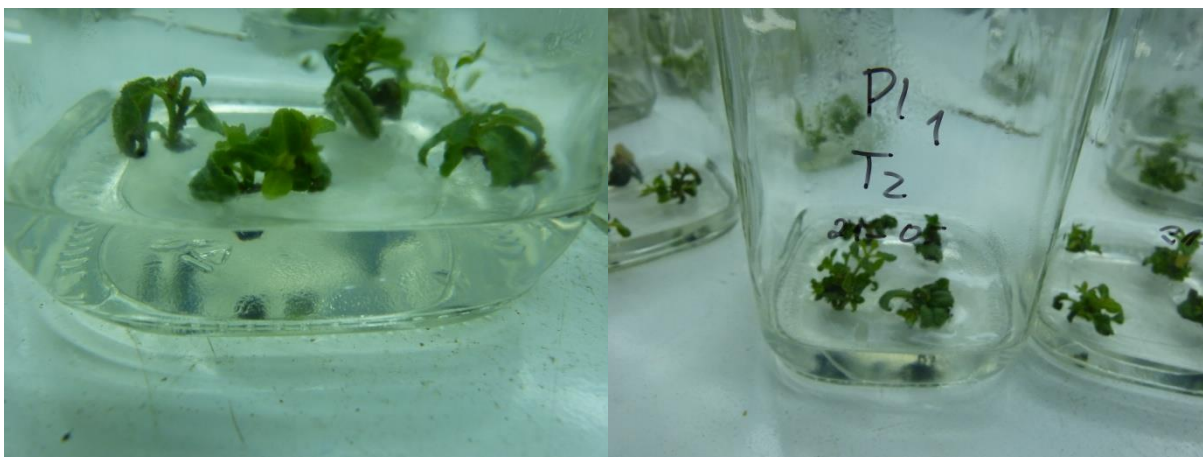


Fig. 24 Frasco de 250 ml com meio de multiplicação proposto (T2) para comparação com o anteriormente usado tratamento T1 ; podem observar-se os 4 rebentos recentemente repicados (esquerda). Planta 1 em tratamento T2 em fase de multiplicação (direita).

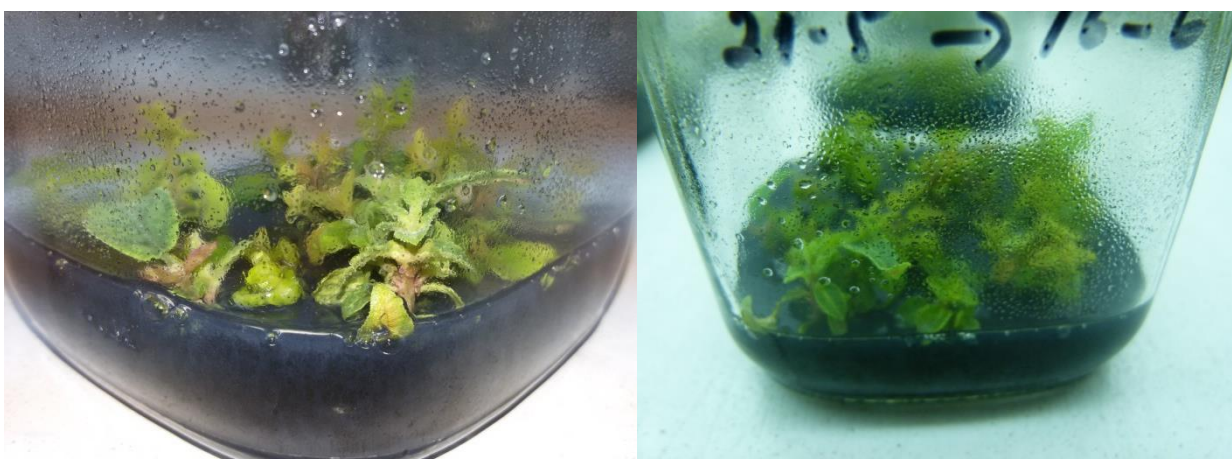


Fig. 24b Frasco de 250 ml com meio de multiplicação T3 com 0,3% de carvão activado (esquerda) com rebentos repicados a partir das culturas velhas e onde ainda é possível observar alguns dos efectos dos agentes oxidantes (esquerda). Na direita observa-se a boa multiplicação dos rebentos no novo meio de cultura, ainda que exista uma condensação excessiva nos frascos derivada das condições da própria sala de crescimento das culturas.

Os resultados das taxas de multiplicação nos três meios testados não tem sido até agora analisados estatisticamente, no entanto, conseguiram-se resolver os problemas de queda de folhas, amarelamento ou acastanhamento de explantes, concentração de substâncias oxidantes. Não encontramos grandes diferenças entre o meio T1 e T2 na resolução dos problemas de oxidação, sendo o meio T3 o que melhor resultados apresenta até ao momento. No entanto, os valores significativos ou não da comparação entre meios para os factores

testados e que podem ser analisados estatisticamente (nº de rebentos produzidos, nº de folhas perdidas, tamanho dos rebentos) será resultante da análise estatística dos mesmos.

Multiplicação de *Pinus taeda* por estaquia (macropropagação)

A estação experimental INTA Bella Vista possui uma longa experiência na estaquia para obtenção de rebentos de *Pinus taeda* que posteriormente são enraizados em estufas. Encontram-se em estaquia 5 famílias seleccionadas (obtidas de sementes seleccionadas) para a sua multiplicação clonal. Sendo a percentagem de enraizamento alcançada de mais de 70% As imagens da fig. 25 mostram as diferentes fases no processo de macropropagação.



Fig 25. Campo de plantas mães das famílias seleccionadas (acima esquerda), detalhe dos novos rebentos na época de brotação de plantas mães (centro); detalhe de um broto para ser enraizado (acima direita); substrato composto de casca de arroz, um



sub-produto local (em baixo esquerda); plantação dos rebentos (em baixo centro); colocação em estufa com tratamento hormonal para enraizamento (em baixo direita); Eng. Carlos Bravo na estufa de enraizamento de *Pinus taeda*

É necessário salientar que poucas são as coníferas onde é possível obter um número tão elevado de plantas enraizadas por macropropagação. Na Universidade de Évora foi testada esta técnica com estacas de pinheiro manso (*Pinus pinea* L.), sem se alcançar resultados que justificassem a continuidade dos trabalhos.

Multiplicação *in vitro* de *Pinus taeda* L. (Loblolly pine) por Embriogenese Somática (ES)

Segundo Pullman e Bucalo (2014) a mudança da condição vegetativa para a embriogénica requer que o tecido entre em um programa de desenvolvimento celular radicalmente diferente, tanto tratando-se de embriões derivados da fecundação como dos embriões derivados da

indução de embriogénese somática. Do ponto de vista da aplicação da embriogénese somática (SE) é esperado que esta técnica tenha um papel importante incrementando a produtividade, o crescimento sustentável e a uniformidade das futuras florestas. Muitos milhões de plantas de pinheiros são plantados anualmente pela sua madeira, lenha, produtos químicos e como árvores ornamentais. Nos Estados Unidos são plantados anualmente 1-1.5 bilhões de árvores (Schultz 1999).

A produtividade das florestas pode ser incrementada plantando uma grande quantidade de árvores “elite”, de alto valor e com características desejáveis; por isso, são feitos actualmente esforços no sentido de propagar clonalmente árvores plus ou árvores selectos por meio da técnica de embriogénese somática. A Embriogénese somática pode capturar os benefícios do melhoramento genético ou dos programas de engenharia genética multiplicando árvores com qualidade de madeira melhorada, maiores taxas de crescimento e maior uniformidade de fibra. A embriogénese somática pode ser aplicada na produção de fármacos, para o estudo do desenvolvimento embrionário e para salvar espécies em perigo de extinção.

Desde o primeiro artigo publicado da obtenção, com êxito de ES em *Picea abies* e *Larix decidua* por Chalupa, 1985; Hackman et al., 1985 e Nagmani & Bonga 1985; diferentes espécies de coníferas tem mostrado habilidade para produzir tecidos embriogénicos. Pelo menos em 27 espécies do género *Pinus* se tem publicado a obtenção de embriões somáticos (Pullman & Bucalo 2011). No entanto, há que enfatizar que a embriogénese somática só tem funcionado bem em umas poucas espécies. Ainda nos melhores casos, as taxas de iniciação são baixas, as sementes de várias espécies são recalcitrantes á ES e ainda que se obtenham embriões somáticos, a sobrevivência deles é baixa, pelo que se incrementa grandemente o custo de produção de plantas por esta técnica de multiplicação clonal. O *Pinus taeda* encontra-se dentro da lista de pinheiros difíceis de multiplicar por embriogénese somática, sendo escassos os investigadores que obtiveram embriões somáticos e publicaram trabalhos relativos a esta espécie (Litvay et al., 1985; MacKay et al., 2006; Pullman & Gupta, 1991; Pullman & Johnson, 2002; Pullman et al., 2003; Pullman et al., 2003^a; Pullman et al., 2003^b; Pullman et al., 2005^b; Pullman et al., 2006; Pullman et al.; Pullman et al., 2009; Pullman & Bucallo, 2011; Pullman & Bucallo, 2014; Silveira et al., 2004). Como pode ver-se pela lista acima apresentada, Pullman é sem dúvida que mais tem trabalhado na embriogénese somática de *Pinus taeda*, pelo que no laboratório da Estação Experimental Bella-Vista se tem seguido o protocolo de este investigador.

No entanto, as taxas de maturação, germinação dos embriões continuam sendo muito baixas como assim também a conversão em plântulas. Para além destes problemas acrescenta-se o facto de muitos calos durante a fase de multiplicação adquirem cor acastanhada devido a fenómenos de oxidação e morte, não existindo até o momento uma explicação do porquê

alguns calos continuam a proliferação e outros a detem e oxidam. Estas questões aqui assinaladas são as que em conjunto são motivo da actual cooperação.

Material e Métodos

1.1 Material vegetal

A cultura in vitro de *Pinus taeda* começou na Extação Experimental INTA Bella Vista em 2009 e tem continuado até hoje (Vera Bravo et al., 2011). O material vegetal usado para indução da embriogênese somática de *Pinus taeda* foram sementes imaturas que forma colhidas no pinhal da Estação INTA Montecarlo na Província Mesopotámica de Misiones durante as duas ultimas semanas de Dezembro de 2014 e primeira semana de Janeiro de 2015 (fig 26)



Fig 26. Pinhas imaturas de pinus taeda

Outro material cultivado com o objectivo de obter embriões somáticos foi um híbrido de *Pinus Elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* obtidos na Estação INTA Montecarlo em Misiones, durante as duas primeiras semanas de Dezembro de 2014 (esta última trata-se de uma nova variedade resultante de cruzamentos controlados entre *Pinus elliotii* com *Pinus caribaea* var. *Hondurensis* pelo INTA de Misiones (ver fig. 27). Este híbrido destaca-se por um rápido crescimento, com tronco recto e cilíndrico o que lhe permite um maior rendimento em madeira. A sua copa permite maior passo da luz gerando assim condições para o desenvolvimento de pastos e outros cultivos no seu sotobosque. Video da obtenção do híbrido: <http://inta.gob.ar/videos/pinos-hibridos-parte-4/view>.

Os meio de cultura usados nas diferentes fases da embriogênese somática são os de Pullman e Bucalo, 2011 (Tabela 4)

Tabela 4. Meios de cultura para embriogênese somática de *Pinus taeda* (Pullman e Bucalo, 2011)

Composto Químico	Meios de cultura						
	2212	2305	1250	1133	1562	397	2007
Maltosa	15,000	15,000	0	0	20,000	0	0
Sacarose	0	0	30,000	30,00	0	20,00	30,00
PEG 8000	0	0	0	0	130,00	0	0
D-xylose	100	100	0	0	0	0	0
Mio-inositol	20,000	20,000	1,000	1,000	100	100	1,000
Casamino ac(s)	500	500	500	500	500	0	500
L-Glutamina	450	450	450	450	450	0	450
Tiamina. HCL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Piridoxina .HCL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
MES	250	250	250	0	0	0	0
Biotina	0.05	0.05	0.05	0	0	0	0
Ac. fólico	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0
Vit. B12	0.1	0.1	0	0	0	0	0
Vit. E	0.1	0.1	0	0	0	0	0
Ac. α-cetoglut.	100	100	0	0	0	0	0
NAA	2.0	0.3	0	0	0	0	0
2,4D	0	0	1.1	1.1	0	0	1.1
BAP	0.63	0.63	0.45	0.45	0	0	0.45
Cinetina	0.61	0.61	0.43	0.43	0	0	0.43
ABA	0	9.0	1.3	1.3	5.2	0	1.3
Sorbitol	0	0	0	0	0	0	0,4M
Carvão activ.	50	50	0	0	0	2,500	0
Brasinolide	0.1µM	0.1µM	0	0	0	0	0
Gelrite	2,000	0	2,500	0	2,500	0	0
TC agar	0	0	0	0	0	8,000	0
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7



Fig.27 Híbrido de pinheiro denominado *Híbrido F1 INTA-Pindó* obtido no INTA Montecarlo em Misiones (Argentina) mediante cruzamentos controlados entre *Pinus elliottii* com *Pinus caribaea* var. *Hondurensis*, caracterizado pela sua excelente qualidade de madeira para a fabricação de móveis

<http://www.unsam.edu.ar/tss/de-buena-madera/>

Resultados

As imagens apresentadas nas figuras 28 e 29 obtidas nos arquivos do Laboratório de Biotecnologia da EEA Bella Vista resumen o processo de obtenção de embriões somáticos de *Pinus taeda*. Estes trabalhos iniciaram-se em 2012.

Os resultados alcançados na embriogênese somática do *Pinus taeda* que pareceram alentadores numa primeira fase (ano 2012), foram no entanto decepcionantes nos anos seguintes porque falta de maturação e germinação dos embriões obtidos, e pela posterior morte das plantas obtidas por esta via.

O número de famílias clonadas por embriogênese somática foi de 10, e a percentagem de massas embriogénicas foi maior que 1,7%.

Actualmente existe uma colecção de calos provenientes das linhas embriogénicas que mantem calos friáveis (Fig 30) nos quais se diferenciam embriões somáticos se as culturas são repicadas regularmente para meio de iniciação.

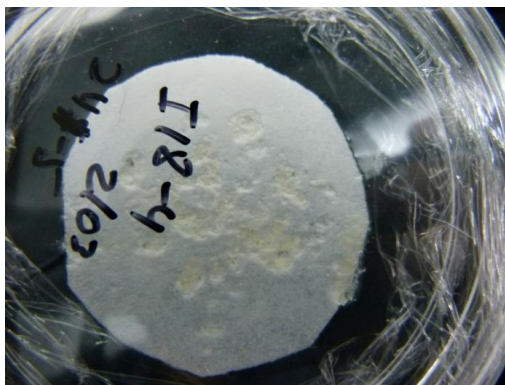
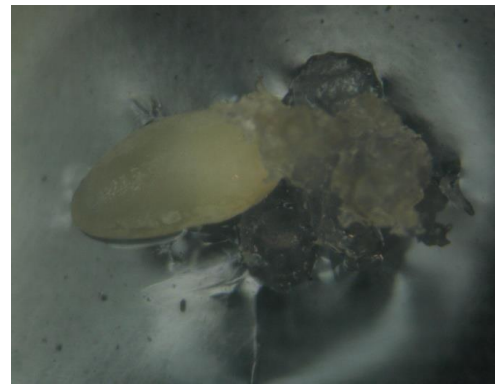
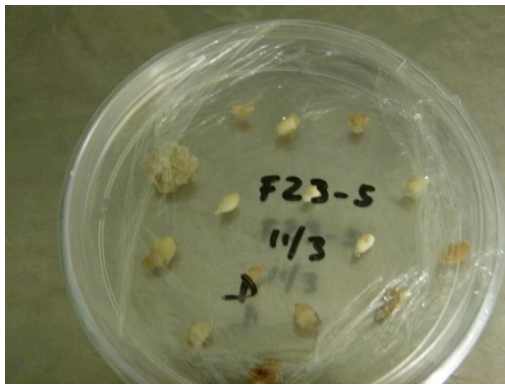
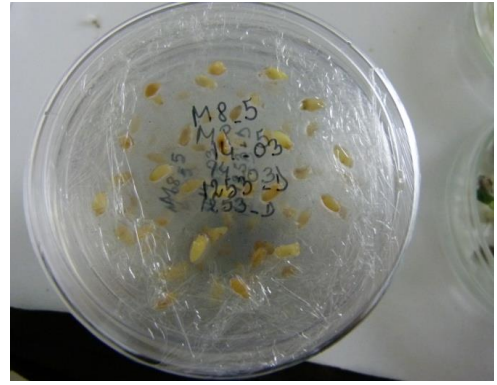


Fig. 28 Processo de obtenção de embriões somáticos de *Pinus taeda* a partir de sementes imaturas (acima esquerda); colocação das sementes em meio de cultura de iniciação (em cima a direita); formação de massa pre-embriogénicas a partir das sementes (centro esquerda); vista em detalhe do aparecimento das massas transparente de calos friáveis possivelmente embriogénicos (centro direita); fase de maturação dos embriões em meio e sobre papel de filtro (em baixo esquerda); embrião somático já formado a partir das massa de calos friáveis (em baixo direita). Fotos Eng. Carlos Vera Bravo

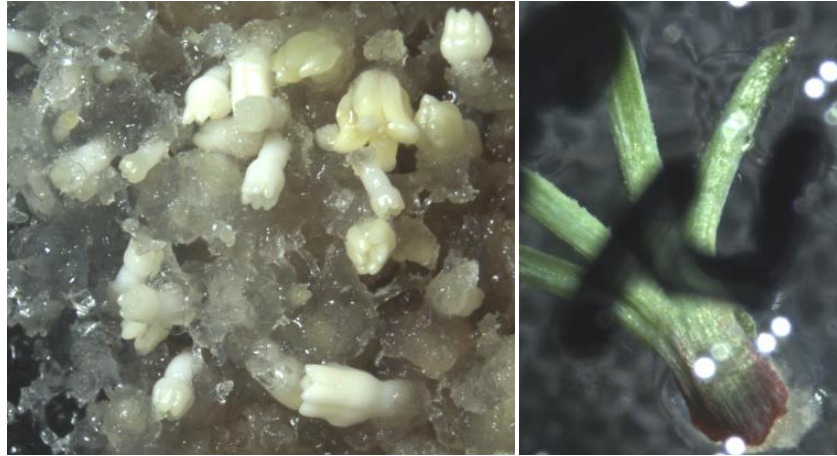


Fig. 29 Aparecimento dos primeiros embriões no meio de germinação (em cima a esquerda); plantula de *Pinus taeda* obtida pelo processo de embriogênese somática

Durante a minha estadia observamos o desenvolvimento dos calos de diferentes linhas; separamos os calos friáveis de aqueles que apresentavam sinais de oxidação.

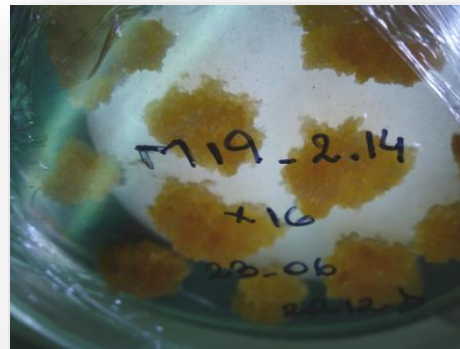
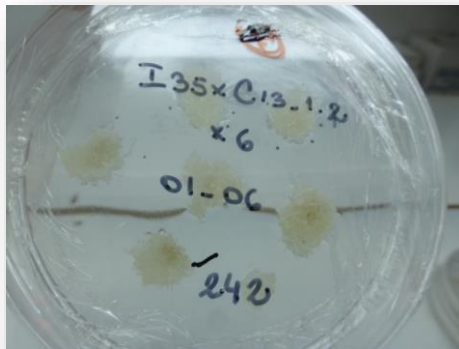


Fig. 30 Calos transparentes e com aspecto gelatinoso (friáveis) que produzem embriões somáticos (Híbrido I35XC13) e calos amarelados na direita (planta M19, não híbrida) com, sinais de envelhecimento e oxidação

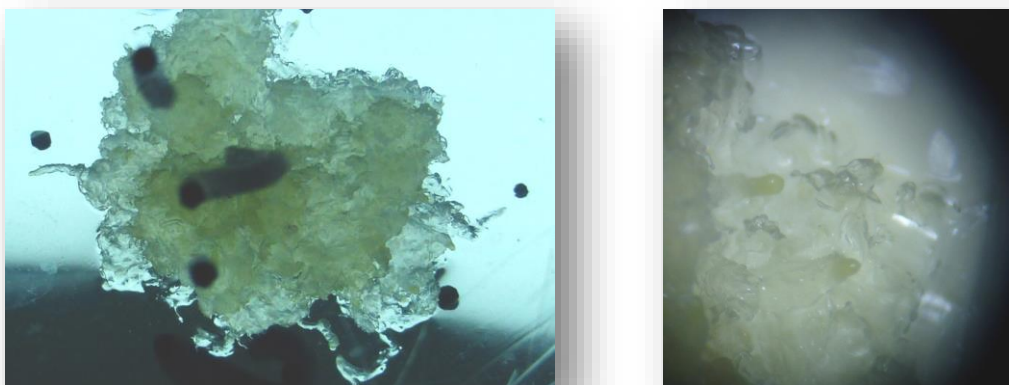


Fig.31 No calo pertencente ao de *Pinus taeda* I35XC13 podem observar-se embriões somáticos em desenvolvimento. Na direita observam-se dois embriões que surgem da massa do calo diferenciam-se do resto do tecido pela cabeça cor verde pálido (fotos A. Zavattieri).

Na figura 31 apresentam-se detalhes de embriões somáticos obtidos em cultura. De este material fazem-se de momento testes de maturação e germinação.

Espera-se a obtenção de plantas completas para publicação de resultados.

Conclusões e perspectivas futuras dos trabalhos realizados durante a Sabática

A cultura *in vitro* de espécies lenhosas recalcitrantes ou não requerem uma série contínua de ensaios que na maioria dos casos traduzem-se em anos de trabalho, muitas das vezes sem que sejam alcançados resultados relevantes a curto prazo. As espécies com as quais se trabalha no Laboratório de Biotecnologia do INTA Bella Vista são exemplos da dificuldade da obtenção de protocolos completos e fiáveis num curto espaço de tempo. Prova disto é o número de anos levados desde o início destas culturas e o estado de avanço sobre protocolos definitivos que possam passar as empresas da região. Os trabalhos de acompanhamento dos ensaios de propagação *in vitro* existentes e os novos trabalhos iniciados durante a minha estadia com o

objectivo de colaborar na melhora dos protocolos e solucionar problemas existentes continuam a desenvolver-se na EEA INTA Bella Vista e serão objeto de publicação conjunta. Por outro lado preparar-se-há uma proposta para o estabelecimento de um convênio de Cooperação entre a Universidade de Évora e o INTA Bella Vista com o objectivo de manter estas linhas de investigação iniciadas, para além de contemplar outras de mútuo interesse como estudo de bacias (água doce); entomologia, sanidade vegetal e estudos ambientais.

No entanto, podem salientar-se os resultados alcançados na micropropagação de *Grevillea robusta* e o efeito positivo da passagem pelo carvão activado que resolveu alguns dos problemas da espécie. No entanto, a cultura de meristemas foi um fracasso para a maioria do material introduzido, conseguiu-se no entanto algumas plantas não contaminadas que foram adicionadas a colecção existente nas fases de multiplicação.

No caso de *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* foi importante a mudança no tamanho dos frascos de cultura, factor muitas vezes menosprezado ou não tido em conta como aspecto relevante para a boa saúde e desenvolvimento das culturas *in vitro* em geral. Por outro lado a adição de carvão resolve em parte muitos dos problemas de oxidação destas culturas.

Agradecimentos

Cabe ainda salientar que este período de Sabática foi pago na totalidade pela Universidade de Évora, não tendo recebido qualquer ajuda para os gastos de deslocação ou manutenção por parte da Instituição de acolhimento. Porém saliento o facto de durante uma parte do tempo me foi disponibilizado uma habitação na própria EEA Bella Vista.

Agradeço a disponibilidade e acolhimento do Director da EEA Inta Bella Vista; do colega Carlos David Vera Bravo que me recebeu no Laboratório de Biotecnologia Florestal e disponibilizou todos os meios para realizar este trabalho conjunto, a Técnica Superior Nuris Duran por disponibilizar muita informação constante neste relatório dos trabalhos realiados até a minha chegada e pela sua desinteressada amizade, e a todos os colegas da Estação Experimental pela simpatía, apoio, e colaboração.

Referências Bibliográficas

- Chadha KM, Patnaik SS, Gurumurthi K (1992) Country report - India. In: Tree Breeding and Propagation Part 11. Regional Review and Country Reports. Field Document No. 2, FAO/UNDP Project RAS/88/025. Bangkok, Thailand: FAO, 49-68.
- ChalupaV (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* /L./ Karst. Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca, 14: 65–90.

- Hakman I, Fowke LC, Von Arnold S, Eriksson T (1985) The development of somatic embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science*, 38: 53–59
- Hill KD, Johnson LAS (1995) Systematic studies in the eucalypts. 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). *Telopea* 6: 185-504.
- Hung C, Trueman S (2011) Topographic effects differ between node and organogenic cultures of the eucalypt *Corymbia torelliana* × *C. citriodora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104(1):69-77. DOI: 10.1007/s11240-010-9805-6
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports* 4: 325-328.
- López AD, Vera Bravo CD (2013) Performance of provenances of *Corymbia* spp. in the Mesopotamia region, Argentina (Ainda não publicado; empréstimo para consulta do Eng. Carlos Vera Bravo)
- MacKay JJ, Beckwar M, Park YS, Corderro JP, Pullman GS (2006) Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genetic Genomics* 2(1):1-92:1-9 DOI: 10.1007/s11295-005-0020-2
- Merkle SA, Montello PM, Xia X, Upchurch BL, Smith DR (2005) Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. In: *Tree Physiology*, 26, p.187- 194.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497
- Nagmani R, Bonga JM (1985) Embryogenesis in subculture callus of *Larix decidua*. *Canadian Journal of Forest Research* 15(6):1088-1091
- Pryor D, Johnson A S (1971) A classification of the Eucalypts. Australian National University. Canberra; 102p
- Pullman GS, Gupta PK (1991). Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using absorbent materials in the development stage media. USA patent, No. 5 034 326.
- Pullman GS, Johnson S (2002) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Annals of Forest Science* 59: 663-668.
- Pullman G., Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N (2003) Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. In: *Plant Cell Reports*, 21:747-758.
- Pullman GS, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N (2003a) Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports* 21, 747-58.

- Pullman GS, Namjoshi K, Zhang Y (2003b) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Reports* 22, 85-95.
- Pullman GS, Gupta PK, Timmis R, Carpenter C, Kreitinger M, Welty E (2005) Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. *Plant Cell Reports* 24, 271-9.
- Pullman GS, Chopra R, Chase KM (2006) Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: Improvements in embryogenic tissue initiation by supplementation of medium with organic acids, Vitamins B-12 and E. *Plant Science* 170, 648-58.
- Pullman GS, Johnson S, Bucalo K (2009) Douglas fir embryogenic tissue initiation. In: *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 96:75-84.
- Pullman GS, Chase KM, Skryabina A, Bucalo K (2009). Conifer embryogenic tissue initiation: improvements by supplementation of medium with D-xylose and D-chiro-inositol. *Tree Physiology* 29, 147-56.
- Pullman GS, Bucallo K (2011) Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants. *Methods Mol Biol.* 2011;710:267-91. doi: 10.1007/978-1-61737-988-8_19.
- Pullman GS, Bucallo K (2014) Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forest* 45(3)p 353
- Rodriguez F E C (1992) *Proteaceae do Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), um estudo taxonômico.* Porto Alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992, 54 f. Dissertação de mestrado em Botânica.
- Schultz RP (1999) Loblolly, the pine for the twenty-first century. *New Forest* 17(1):71-88
- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP, 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76:53-60.
- Vera Bravo C, Belader E, Gauchat ME (2011) Avances en la propagación in vitro por embiogenesis somática de familias de *Pinus taeda*. *Actas XXV Jornadas Forestales de Entre Rios, Concordia*
- Vera Bravo CD (2014) Micropropagation of adult trees of *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (F.Muell.) A.R.Bean & M.W.McDonald: effect of Ag⁺, S₂O₃⁻² and type of light on rooting. VI Reunión GEMFO, Parana, Argentina

ANEXO 1



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación

Bella Vista, 18 de Febrero de 2015

Dra. María Amely Zavattieri
S/D _____

Ref: Invitación

De mi mayor consideración:

Por la presente me dirijo a Usted a efectos de invitarla a realizar su Sabática en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en la sede de la Estación Experimental del INTA Bella Vista (Provincia de Corrientes) por considerar su trabajo de Investigación de gran interés para contribuir con el desarrollo Forestal de la Provincia, ya que la misma es una de las provincias con mayor superficie forestal plantada de la Argentina. Su trabajo potenciará la transferencia de conocimientos en el área biotecnológica y el desarrollo de líneas de trabajo en esta área que permitirá mayor desarrollo de la cadena forestal de la provincia. La misma se encuadra bajo el marco de cooperación interinstitucional firmado por la Universidad de Évora y el CIEFAP celebrada el 26 de Agosto.

Sin otro particular la saludo atentamente.

Ing. Agr. (Ms.Sc.) Carlos Vera Bravo
Responsable Laboratorio de Biotecnología Forestal
EEA INTA Bella Vista

Centro Regional Corrientes
EEA INTA Bella Vista
C.C. 5 - W 3432 ZBA - Bella Vista, Corrientes - Argentina
Tel/Fax: +54 - 3777 - 450029/451923
www.inta.gob.ar/bellavista

ANEXO 2

Conferência realizada na EE INTA BELLA VISTA no dia 18-06-2015

<http://inta.gob.ar/bellavista>

Biotiação do Pinheiro manso (*Pinus pinea* L.)

No dia 18 de Junho foi apresentada para todo o pessoal investigador e tecnico da Estação Experimental INTA-Bella Vista a conferência em espanhol: “Biotización del pino piñonero (*Pinus pinea* L.)”. Previamente foi feita uma introdução sobre Portugal e seguidamente sobre a Universidade de Évora, o ICAAM e o Laboratório onde foram realizados os trabalhos de biotização (fig. 24). A conferência teve como objectivo mostrar/difundir o trabalho realizado na Universidade de Évora na área da biotecnologia de espécies lenhosas e particularmente a solução do problema de enraizamento *in vitro*. O conteúdo da conferência encontra-se no Anexo 1.



Fig 24. Conferência na Estação Experimental INTA Bella-Vista (18-06-2015)

A seguir insere-se o texto completo da Conferência



FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Biotización del pino piñonero (*Pinus pinea* L.)

Carla Ragonezi¹; Ana Teresa Caldeira¹; Maria do Rosário Martins¹; Krystyna Klimaszewska²;
Celeste Santos-Silva¹; Augusto Peixe¹; Paulo de Oliveira¹; Luis Silva Dias¹; Elsa Ganhão¹; Otilia
Miralto¹; Rogério Louro¹; Dora Martíns Teixeira¹; Mário Rui Castro³; Amely Zavattieri¹

1-Universidade de Évora; Portugal

2-Natural Resources; Canadian Forest Service; Laurentian Forestry Centre, Quebec, Canadá

3-Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

La micorrización *in vitro* de plantas leñosas micropropagadas puede ser usada para restaurar el crecimiento del sistema radicular y mejorar la fase de aclimatación, aumentando la funcionalidad de las raíces y por consiguiente el estado nutricional e hídrico de las plantas aclimatadas. Para

obtener estos beneficios una extensiva caracterización e identificación de las ectomicorrizas (ECM) asociadas a las especies albos es crucial. No todos los hongos promueven el enraizamiento *in vitro* o confieren efectos benéficos a sus plantas huésped, por lo que es necesario testar cada combinación hongo-planta. Para comprender como funciona una combinación efectiva entre un determinado clone y su simbionte hongo es también necesario conocer los compuestos bioquímicos de señalización que median la simbiosis durante la fase de co-cultivo y como estas sustancias señal, alteran el comportamiento de los simbiontes asociados.

En la presentación realizada en la Estación Experimental INTA Bella Vista con el título “Biotización del pino piñonero (*Pinus pinea* L.)” la Dra. Zavattieri habló de los trabajos de investigación en este tema, realizados durante una década por el equipo de investigadores de la Universidad de Évora bajo su coordinación y de la Dra. Krystyna Klimaszewska del Laurentian Forestry Centre, Natural Resources, Canadá, como Consejera Científica. La propagación *in vitro*



de este pino mediterráneo (fig. 1) forma parte de un amplio programa de mejora genética y multiplicación vegetativa del pino piñonero en Portugal, debido a la importancia económica que la especie posee por sus múltiples usos (madera, taninos, resina, biodiesel, etc), y fundamentalmente, por el valor comercial de sus semillas comestibles: los piñones.

Fig. 1 Ejemplar de pino piñonero o pino doméstico (*Pinus pinea* L.)

El equipo de investigadores desarrolló un protocolo completo de micropropagación *via* organogénesis a partir de cotiledones de semillas maduras (fig. 2a; b; c; d) y su micorrización *in vitro* con hongos ectomicorrízicos (ECM) colectados en los mismos stands de pino del que se obtuvieron las semillas (fig.3a, b). Fueron mostradas las técnicas de cultivo puro de los hongos en medios previamente seleccionados (fig.3c) y como se realizó su identificación molecular.



Fig. 2 Diferentes fases de la micropropagación de pino piñonero *via* organogénesis a partir de cotiledones; semilla madura abierta para extracción de cotiledones; inducción de brotes en los cotiledones de una sola semilla; fase de multiplicación de los brotes obtenidos; enraizamiento *in vitro*.



Fig. 3 Stand de pino piñonero Alcácer do Sal, Portugal (a); recolección de fructificaciones de los hongos (b); teste de medios de cultivo (BAF, Hagen; MMN) para evaluar crecimiento de un determinado hongo ectomicorrízico (c).

Las técnicas de co-cultivo en medios de bi-camada (medios sólido-sólido) desarrollados para el cultivo de hongos ectomicorrízicos y clones de pino piñonero permitieron el estudio del efecto de los hongos sobre el crecimiento de las raíces de pino (fig. 4a, b, c).



Fig. 4 Plántula de pino en fase de enraizamiento sin micorrizar (a); planta enraizada y micorrizada donde se puede observar el hongo en desenvolvimiento en la superficie de un medio doble, donde la parte inferior es medio de WPM para la plántula de pino y los 2 milímetros superiores es medio seleccionado para el crecimiento de un determinado hongo ectomicorrízico (b); mediciones realizadas en el sistema radicular (trazos negros y rojos) para evaluar el efecto del hongo colocado en la parte superior del sistema de cultivo de bi-camada y que se puede ver como manchas verde oscuras en la parte superior (c).

En la fase de aclimatación de las plantas micorrizadas, se removieron algunas del substrato para comparar su sistema radicular con las plantas control, no micorrizadas (fig. 5) y para confirmar la presencia y tipo de ectomicorrizas se realizaron estudios morfológicos e histológicos (fig. 6).

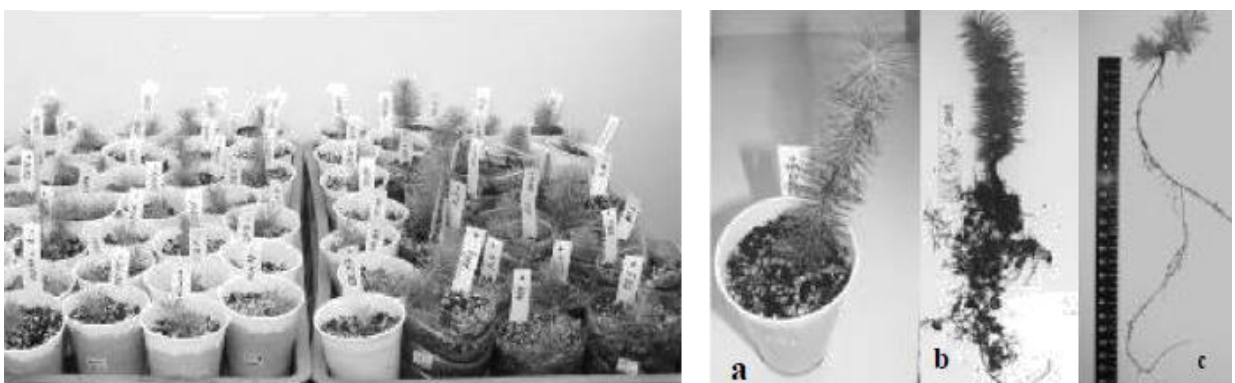


Fig. 5 Plantas enraizadas en la fase de aclimatación en fitoclima; planta inoculada con 4 meses de aclimatación en substrato compuesto (turba, perlita, vermiculita); se observa un buen desenvolvimiento de la parte aérea (a) y del sistema radicular (b); planta control no inoculada con menor crecimiento de la parte aérea y un sistema radicular largo pero poco desarrollado(c)

Otro sistema de dupla-fase (semi-sólido-líquido) desarrollado por el equipo de investigación y posteriormente patentado (fig. 7) permitió la extracción de la fase líquida (en contacto con las raíces) para estudio de los señales bioquímicos que se establecen entre los simbios (plántulas de pino e hongos testados; fig. 8a, b, c).

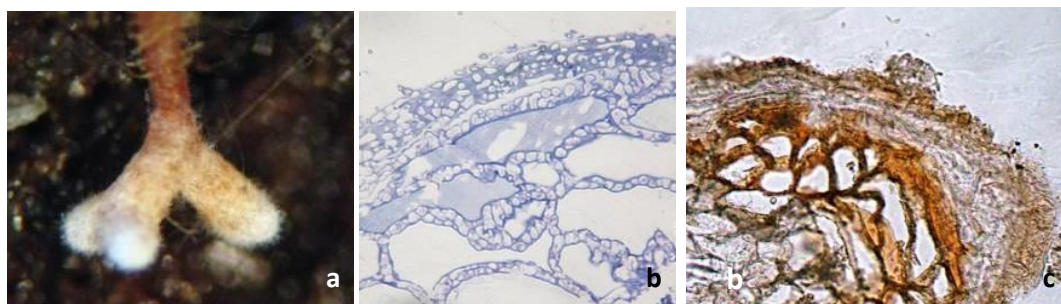


Fig. 6 Morfología externa de una micorriza desarrollada a partir de inoculación *in vitro*, de una plántula en fase de aclimatación (a); corte de la micorriza con ultra micrótopo (1 μ m de espesor) y coloración con azul de toluidina; puede verse el manto de hifas rodeando la raíz y las hifas que se desarrollan en los espacios intercelulares o apoplasto (b); corte con micrótopo de congelación (4-8 μ m de espesor), donde se observa un manto abundante de hifas sobre la estructura de la micorriza (c).

Los estudios bioquímicos con cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector UV (HPLC-UV) y con un espectrómetro de masa acoplado a un HPLC con auto analizador y detector de diodos (LC-DAD-MS) permitieron identificar un éster del ácido *o*-cumárico (fig. 9) como responsable de los señales químicos que se establecen previo al contacto físico entre las plántulas de pino y el hongo *Pisolithus arhizus*. El apareamiento de esta substancia nos permitió comprender el papel de los compuestos fenólicos en la simbiosis planta-hongos ectomicorrízicos. Estos resultados confirmaron la hipótesis de otros investigadores que concluyen que ciertos compuestos fenólicos no solo ofrecen protección a las plantas huéspedes contra aleloquímicos liberados por otras plantas vecinas, como también que los hongos que establecen estas simbiosis son capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono. Este sería el mecanismo que utilizan los hongos ectomicorrízicos para controlar las interacciones con las plantas superiores, cambiando la química de la rizosfera. Por otro lado, según Münzenberger et al. (2003) se confirma la detoxificación del ácido ferrúlico por los hongos *Laccaria amethystina* y *Lactarius deterrimus* pero con diferentes padrones de detoxificación, lo que muestra la habilidad diferencial de diferentes simbios en detoxificar y degradar los compuestos fenólicos que las diferentes especies de plantas segregan para su defensa.

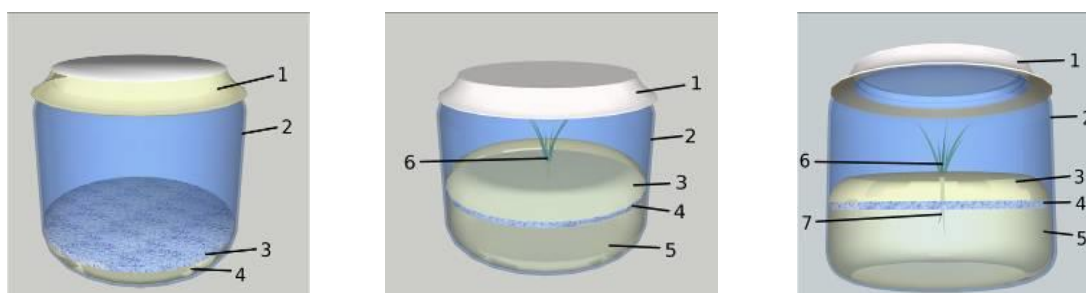


Fig. 7 Esquema del sistema patentado (Patente nº 105239) 1 tapa; 2 frasco; 3 perlita; 4 medio de WPML modificado para crecimiento del hongo; 5 medio de WPM líquido para desarrollo de raíces; 6 planta; 7 raíz.

http://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/5951/1/01_105239.pdf

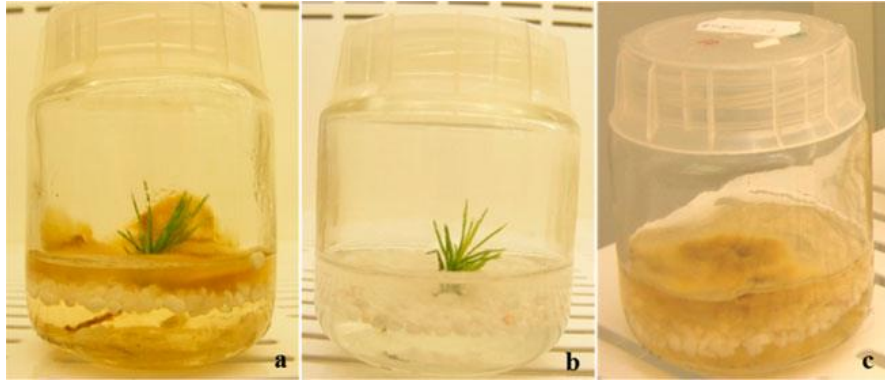


Fig. 8 co-cultivo de plántulas de *Pinus pinea* con micelio de *Pisolithus arhizus* in medio de doble fase (a); controles negativos: plántulas de pino sin hongo (b) y micelio del hongo sin plántula.

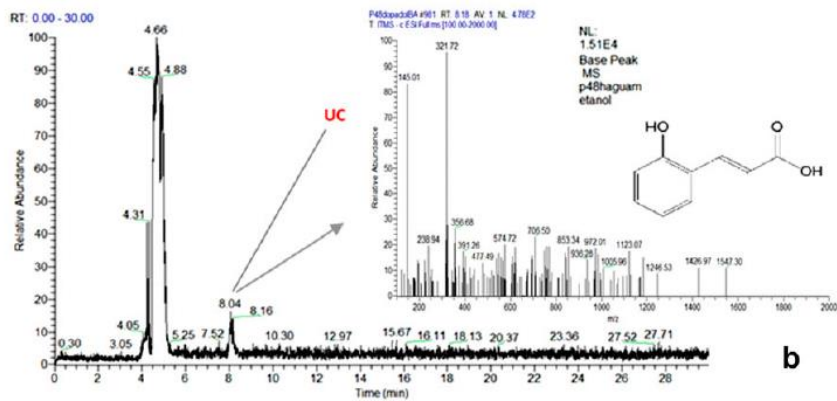


Fig. 9 Identificación del compuesto por LC-DAD-MS en muestras de dos días de co-cultivo *P. pinea*/*P. arhizus* e fórmula química del ácido *o*-cumárico

Los aspectos más relevantes del trabajo realizado en co-cultivo *in vitro* con especies de hongos benéficos (principalmente para las coníferas) se pueden resumir como:

- ❑ Este protocolo de micorrización *in vitro* puede ser aplicado a otras especies vegetales o inoculantes microbianos (bacterias promotoras del crecimiento; otras micorrizas) desde que la asociación promueva efectos positivos en ambos simbioses (plantas-hongos)
- ❑ Los hongos con efectos positivos restauran el crecimiento de las raíces que no crecen en ágar, mejorando casi todos los parámetros de enraizamiento *in vitro*
- ❑ Se mejora la sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatación, debido al desarrollo del un sistema radicular bien estructurado, y gracias a la proliferación de las hifas del hongo asociado, se aumenta el área de sustrato aprovechado y por consiguiente los nutrientes y el agua disponible para las pequeñas plantas
- ❑ La micorrización *in vitro* puede ser usada para la introducción de hongos comercialmente valiosos, lo que implica una más valía cuando se realizan las plantaciones definitivas de coníferas

Referencias bibliográficas

- Castro, M. R; Ragonezi, C.; Klimaszewska, K.; Lima, M.; Oliveira, P.; Zavattieri, M.A. 2010. "Mycorrhiza-like structures in rooted microshoots of *Pinus pinea* L. Latest developments of a new insight". *Acta horticulturae*, 865(1): 179 - 185.
- Münzenberger B.; Hammer E., Wray V., Schauer, F., Schmidt, J.; Strack, D. 2003. Detoxification of ferulic acid by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 13:117_121
- Ragonezi, C.; Caldeira, A.T.; Martins, M.R.; Salvador, C.; Santos-Silva, C.; Ganhão, E.; Klimaszewska, K.; Zavattieri, M.A. 2013. "Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from Mediterranean pine stands in Portugal". *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2):657-64.
- 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*, 9 (1):297-305.
- Ragonezi, C.; Caldeira, A.T; Martins M.R.; Santos-Silva, C.; Ganhão, E.; Miralto, O.; Pereira, I.; Louro, R.; Klimaszewska, K.; Zavattieri, M.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.
- Ragonezi, C.; Caldeira, A.T.; Martins, M.R.; Klimaszewska, K.; Santos-Silva, C.; Peixe, A.; Silva Dias, L.; Ganhão, E.; Miralto, O.; Louro, R.; Zavattieri, A. 2011. Biotization of the Mediterranean stone pine (*Pinus pinea* L.). *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (1): 46–46.
- Ragonezi, C.; Klimaszewska, K.; Castro, M.R; Lima, M.; Oliveira, P.; Zavattieri, M. A. 2010. "Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors". *Trees*, 24(6): 975-992.
- Ragonezi, C.; Castro, M.; R; Klimaszewska, K.; Lima, M.; Zavattieri, M.A. 2010. "Influence of light quality and intensity on adventitious root formation in microshoots of *Pinus pinea* L. ". *Acta Horticulturae*, 865(1): 287-291.
- Zavattieri, M.A; Lima, M.; Sobral, V.; Oliveira, P.; Costa, A.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.

ANEXO 3

APMG2015 – 9º Simpósio de Meteorologia e Geofísica da APMG-Tavira; Portugal
Março, 2015-10-15 Apresentação realizada pela Dra. Maria Helena Novais

ALQUEVA HYDRO-METEOROLOGICAL EXPERIMENT (ALEX): FIRST RESULTS OF AQUATIC ECOLOGICAL ASSESSMENT

Maria Manuela Morais, Maria Helena Novais, Susana Nunes, Joana Rosado, Alexandra Penha, Amely Zavattieri, Miguel Potes, Rui Salgado

Instituto Ciências da Terra (ICT), Pólo da Universidade de Évora, Rua Romão Ramalho nº. 59, 7000-671 Évora, Portugal

SUMMARY

The Alqueva hydro-meteorological Experiment (ALEX) field campaign took place monthly during summer 2014 and consisted in in situ measurements and sampling of water and biological elements, collected from three fixed platforms placed in the lacustrine zone.

This integrated overview, including meteorological, environmental and biological results contributes to improve the knowledge of the reservoir dynamics and therefore to propose adequate management measures to preserve the observed biological integrity.

Introduction

Water resources in the Mediterranean Region are limited, fragile and threatened, and there is an urgent need for their sustainable management, which can only be achieved by understanding and predicting the complex interactions between climate, hydrology, ecosystem processes, water quality and biodiversity.

Lakes and reservoirs, due to their vulnerability, have been considered as sentinels of environmental changes, such as anthropogenic effects and global warming (Hsieh et al., 2011). The determination of lake's trophic condition is an important step in the assessment of a reservoir because of the powerful predictive statements that can be made describing abiotic and biotic relationships once the trophic state is known (Karadžić et al., 2010). Furthermore, the eutrophication process driven by numerous causes leads to water quality deterioration (e.g. excessive hypolimnetic oxygen consumption, decrease in water transparency, cyanobacteria increase in number and biomass).

Therefore, to propose adequate management strategies, a good knowledge of the whole system is mandatory. Several biological water quality indicators of reservoirs are widely recognized, as the Chironomid Pupal Exuvial Technique (CPET), littoral benthic diatoms and phytoplankton, especially cyanobacteria.

The cyanobacteria comprise a large component of marine and fresh water planktons with global distribution, being the Earth's oldest oxygenic photoautotrophs. Some groups of cyanobacteria are good indicators of water quality in planktonic ecosystems (Solimini et al., 2006). Under certain environmental conditions they can reproduce explosively, resulting in the events called *algal bloom*. The blooms could be associated to the production of cyanotoxins that pose a health risk to human and livestock water consumer. Blooms seem to be associated to nutrient-rich waterbodies that contain excess phosphates or nitrogen (eutrophication).

The main goal of this component of the Alqueva hydro-meteorological Experiment (ALEX) field campaign is the analysis of the physico-chemical and biological vertical dynamics in the Alqueva reservoir, based in: 1) water temperature, pH, dissolved oxygen, oxidation-reduction potential and electrical conductivity profiles measured in situ; 2) water chemistry analysis carried out at the surface and bottom of the reservoir; 3) biological elements including phytoplankton and cyanobacteria blooms.

Material and Methods

The ALEX field campaign in Alqueva reservoir took place during summer 2014, from June to September.

Along this period, in situ measurements, water samples and biological elements were monthly collected from three fixed platforms placed in the lacustrine zone.

Meteorological data (solar radiation, air temperature and precipitation) were obtained from the stations located in the proximity of the reservoir. Vertical profiles of temperature, dissolved oxygen (% O₂ saturation), pH, oxidation-reduction potential (mV) and electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$) were taken, using a in situ TROLL 9500 PROFILER XP multi parametric probe. Simultaneously, water samples were collected at three depths (surface, methalinear and bottom) using a Van Dorn bottle (3L capacity) for physical-chemical analyses and kept cool and in the dark until laboratory processing. In laboratory, total nitrogen ($\mu\text{g N L}^{-1}$) and total phosphorus ($\mu\text{g P L}^{-1}$) were determined, following standard methods for water chemical analyses (APHA, 1995). For phytoplankton analysis, in each platform, an integrated sample representative of the euphotic zone was obtained by collecting equal volumes of water, from the surface until the limit of the euphotic zone (determined by the use of a Secchi disc). Phytoplankton samples were kept cool and in the dark until laboratory processing. In laboratory, the samples were preserved, identified and quantified according to recent literature and appropriate protocols (e.g. INAG, 2009).

Results and Discussion

The brief meteorological characterization showed the occurrence of precipitation in the week before the sampling in June and September (Fig. 1).

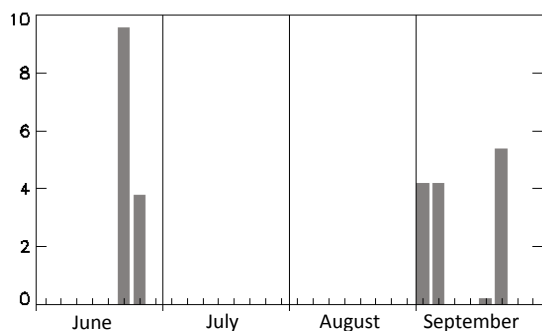


Fig. 1 – Precipitation (mm) during the eight days before the sampling campaigns.

The air temperature (Fig. 2) and solar radiation (Fig. 3) were higher in July and August, as expected. Vertical profiles of physico-chemical parameters are similar in the three platforms and show the stratification of the reservoir, with the thermocline at 7.5m in Alqueva-Montante and 10m in Alcarrache and Mourão (Figs 4, 5 and 6). This is a relatively thick thermocline in contrast to highly eutrophic lakes

where this layer has only a thickness of 1 to 2 meters (Wetzel, 1993). The temperature of epilimnetic mixed waters reached 27 - 28°C in the 2014 summer hottest periods. In contrast, the hypolimnetic waters maintained its temperature around 13 to 17 °C. It means that between the two layers there was a difference of about 10 °C, constant over the monitoring period, despite the slightly warming of the hipolimnion noted along time.

Water pH values are higher in the epilimnion (8-9), due to photosynthesis, than in the hypolimnion (7-8 pH units), revealed also in the oxygen oversaturation of surface waters.

The surface oxygen concentration is constantly regulated by the air–water fluxes, which tend to bring the surface concentration towards the saturation value (Capet et al., 2013). However, in July the surface waters in the three sites were oversaturated in oxygen due to enhanced photosynthesis. Stratification should allow the settlement of bottom anoxic conditions by preventing the bottom oxygen-depleted waters from mixing with the surface ventilated waters (Boulton & Brock, 1999). However, the hypolimnion doesn't present anoxia in June, most probably due to the precipitation events in the days prior to the sampling. In the following months, anoxia (0-10% SAT) only occurs deeper in the water column (Figs 4, 5 and 6). Hence, the consumption of oxygen by the respiration processes is not sufficiently high to deplete oxygen in the whole hypolimnion, as it occurs in highly eutrophic reservoirs (Wetzel, 1993).

The analysis of oxidation-reduction potential – ORP (Figs 4, 5 and 6) shows positive values along time from June to August, while it is negative in September. This oxidized environment trough the stratified season contrasts with other Mediterranean eutrophic reservoirs, where ORP potential is highly negative due to respiration processes (i.e. degradation of organic matter). The negative values detected in September are probably due to the precipitation events that occurred in the days before the sampling. Highest Total Nitrogen values in the bottom samples at Alcarrache, caused by the contribution of ammonia and organic nitrogen, due to the fact that the vegetation was not removed from this site when the reservoir was built.

The TN:TP ratio is higher than 16 in the majority of the collected samples, meaning that phosphorous is more often the potential limiting nutrient in the Alqueva Reservoir, as it is normal in mesotrophic systems. Nevertheless, we should point out that low values of Total Phosphorus and Total Nitrogen were detected in all platforms and during the whole campaign, higher in bottom samples, thus reflecting the low contribution of external loads to the system (Figs 7 and 8). Furthermore, the low concentrations of total nitrogen could also limit the primary production in the reservoir, giving advantage to N₂

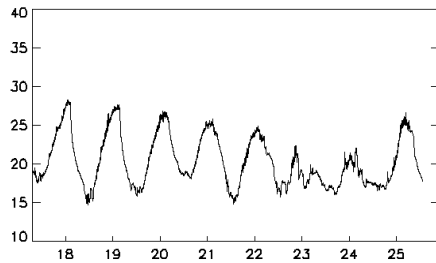
fixing producers, revealed by the dominance of cyanobacteria in all sampling sites and throughout the whole sampling period, being *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* and *Aphanocapsa* the most frequent and abundant genera.

In the 14 integrated phytoplankton samples analyzed, a total of 62 taxa were identified. From which, 29 are chlorophytes, 15 are cyanobacteria, 11 are diatoms, 3 are cryptophytes, 2 are euglenophytes and 2 are pyrophytes. Even though chlorophytes are the taxa richest group, cyanobacteria dominated in abundance all sampling sites and during the sampling period.

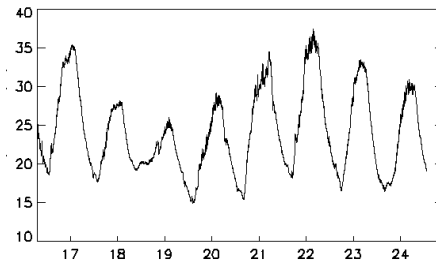
Interestingly, the observation of the phytoplankton samples collected at discrete depths revealed the

presence of cyanobacteria in the bottom samples collected in Alcarrache and Alqueva-Mourão platforms (20m) and in Alqueva-Montante (50m). Given the abundance of cyanobacteria, molecular techniques confirmed the presence of *Microcystis* species and microcystins-producing genes (hepatotoxins). The Multidimensional Scaling Ordination (MDS) (Fig. 9) shows a clear separation of phytoplankton assemblages in relation with the sampling campaigns, thus reflecting the meteorological conditions. There is a succession of phytoplankton species, mainly cyanobacteria, representing a temporal dynamics, typical of reservoirs that are not under the influence of severe anthropogenic pressure.

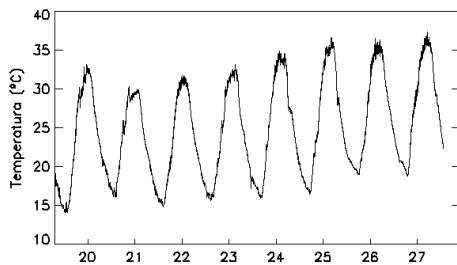
a



b



c



d

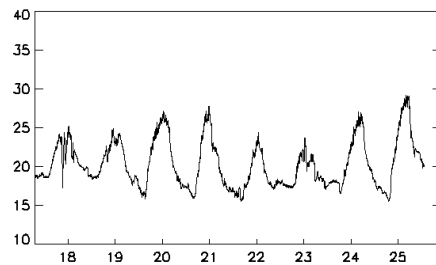
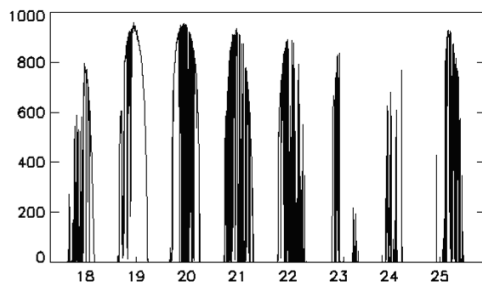
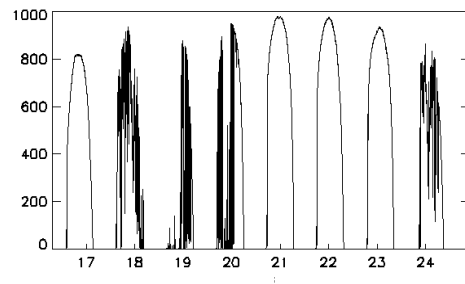


Fig. 2 – Air temperature (°C) in the eight days before the sampling campaigns in: a) June, b) July, August, d) September.

a



b



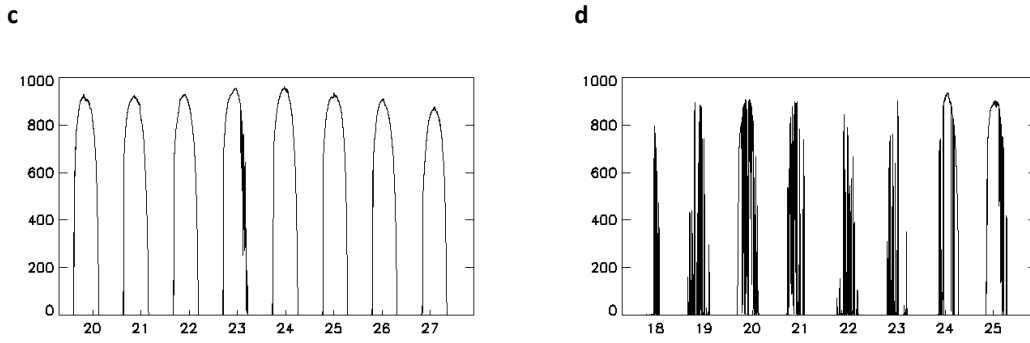


Fig. 3 – Solar Radiation ($W m^{-2}$) in the eight days before the sampling campaigns in: a) June, b) July, c) August, d) September.

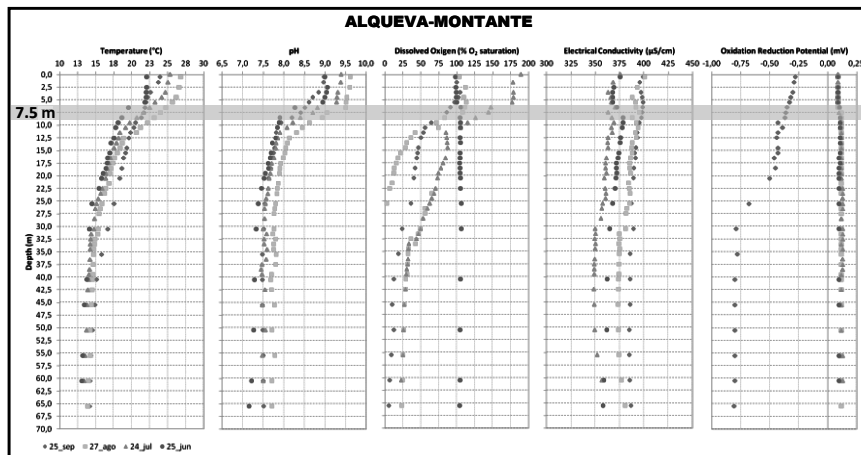


Fig. 4 – Vertical profiles of water temperature, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity and oxidation-reduction potential at Alqueva-Montante platform.

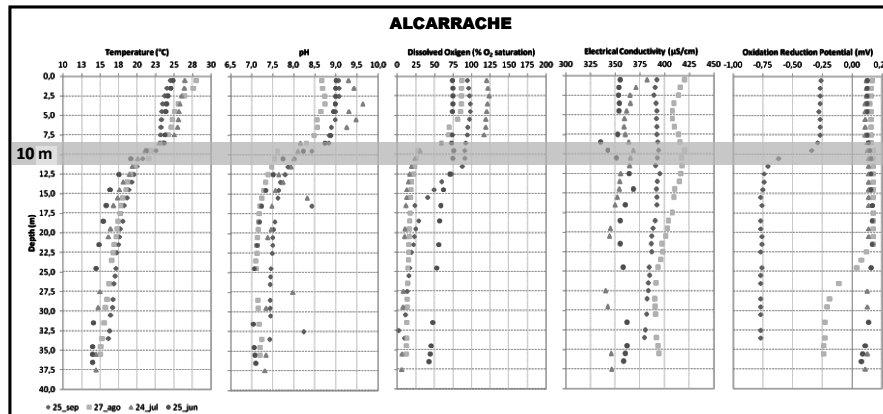


Fig. 5 – Vertical profiles of water temperature, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity and oxidation-reduction potential at Alcarrache platform.

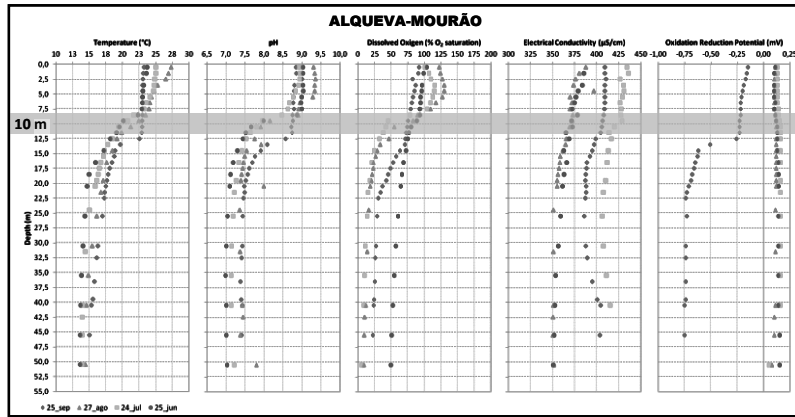
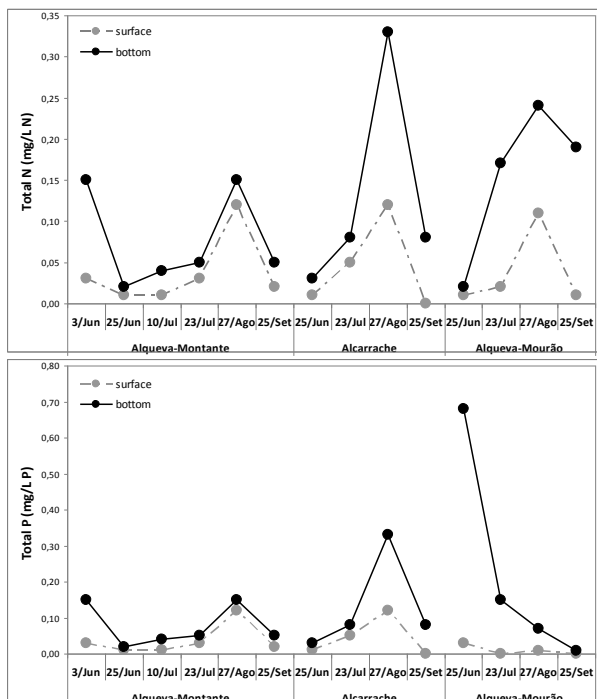


Fig. 6 – Vertical profiles of water temperature, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity and oxidation-reduction potential at Alqueva-Mourão platform.



Figs 7, 8 – Temporal evolution of Total Nitrogen and Total Phosphorus in the three platforms.

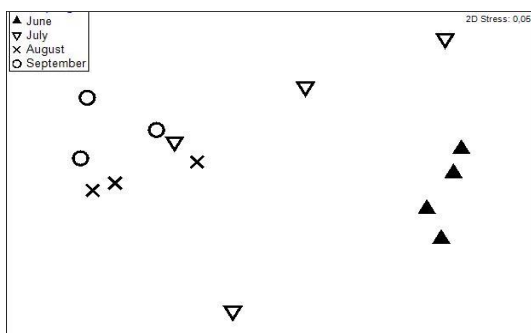


Fig. 9 – Multidimensional scaling (MDS) ordination plot for phytoplankton assemblages.

References

-APHA 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Ed. 19. American Public Health

All the meteorological, environmental and biological results contribute to improve the knowledge of the reservoir dynamics and to propose adequate management measures to preserve the observed biological integrity. These results reveal the need to include water quality aspects and develop rehabilitations strategies in the operation of Mediterranean reservoir systems and water infrastructures.

Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.

-Boulton A. & Brock M., 1999. *Australian Freshwater Ecology – Processes and Management*. Glen Osmond: Geneagles Publishing, 300 pp.

-Capet, A., Beckers, J., Gregoire, M. 2013. Drivers, mechanisms and long-term variability of seasonal hypoxia on the Black Sea northwestern shelf – is there any recovery

- after eutrophication? *Biogeosciences* 10: 3943–3962. doi:10.5194/bg-10-3943-2013
- Havens, K., Thomas James, R., East, T., Smith, V., 2002. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution* 122: 379–390.
- Hsieh C., Sakai Y., Ban S., Ishikawa K., Ishikawa T., Ichise S., Yamamura N., Kumagai M., 2011. Eutrophication and warming effects on long-term variation of zooplankton in Lake Biwa. *Biogeosciences* 8: 1383–1399. doi:10.5194/bg-8-1383-2011
- INAG 2009. *Manual para a avaliação da qualidade biológica da água em lagos e albufeiras segundo a Directiva-Quadro da Água - Protocolo de amostragem e análise para o Fitoplâncton*. Ministerio do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I. P., Lisboa, 42 pp.
- Karadžić V., Subakov-Simić G., Krizmanić J., Natić D. 2010. Phytoplankton and eutrophication development in the water supply reservoirs Garaši and Bukulja (Serbia). *Desalination* 255: 91–96. doi:10.1016/j.desal.2010.01.009
- Solimini A.G., Cardoso A.C., Heiskanen A.S. 2006. *Indicators and methods for the ecological status assessment under the Water Framework Directive. Linkages between chemical and biological quality of surface waters*. Institute for Environment and Sustainability, Joint Research Center, European Communities: 262 pp.
- Wetzel R.G., 1993. *Limnologia*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

ANEXO 4

Conference: LAKE 2015:

The 4th workshop on “Parameterization of Lakes in Numerical Weather Prediction and Climate Modelling” will be held in Évora, Portugal, May 07-09, 2015. Évora, Portugal, May 07-09, 2015.



Ecological assessment of Mediterranean reservoirs: Alqueva reservoir as a case study (Alentejo, Southern Portugal)

Morais Manuela, Maria Helena Novais, Susana Nunes, Joana Rosado, Alexandra Penha, Amely Zavattieri, Miguel Potes, Rui Salgado

Instituto Ciências da Terra (ICT), University of Évora, Rua Romão Ramalho n.º 59, 7000-671 Évora

Lakes and reservoirs, due to their vulnerability, have been considered as sentinels of environmental changes, such as anthropogenic effects and global warming. Water exploitation from reservoirs requires specific chemical and biological quality of the water, but often brings up the questions of eventual problems regarding trophic level increase that could influence the water quality.

To understand the functioning of large and deep reservoirs during the summer period in the Mediterranean Region, Alqueva reservoir was studied from June until September 2014. To do so, vertical profiles of temperature, dissolved oxygen, pH, oxidation-reduction potential and electrical conductivity were monthly taken; simultaneously, water samples were collected for physical-chemical analyses and an integrated sample, representative of the euphotic zone, was collected for phytoplankton identification and quantification.

Thermal stratification was observed during the summer period, with thermocline between 7.5-10 m. Low values of Total Phosphorus and Total Nitrogen were detected during the whole campaign, higher in bottom samples, thus reflecting the low contribution of external loads to the system and confirming the mesotrophic status of the reservoir. Phytoplankton assemblages were dominated by cyanobacteria throughout the experiment, whilst chlorophyta were the taxa richest group; a succession of phytoplankton species was observed, mainly cyanobacteria, thus representing a temporal dynamics, typical of reservoirs not under severe anthropogenic pressure.

The ecological status of Alqueva reservoir differs from the majority of the reservoirs in the South of Portugal, therefore, a comparison with a small eutrophic reservoir located in the same watershed is also carried out.

Given the trophic status of the reservoir, management strategies should be implemented in order to prevent the impairment of the ecological status and consequently the water quality.

ANEXO 5

Apresentado pela Prof. Manuela Morais no 4 Congresso Ibérico de Cianobactérias

<http://www.4cic2015.pro-insa.pt/wp-content/uploads/2015/05/Livro-de-resumos-4%C2%BACIC2015.pdf>

S1P5

Monitoring cyanobacteria and cyanotoxins in Alqueva Reservoir, Portugal

Zavattieri M.A.^{*1}, Morais M.M.¹, Nunes S.¹, Penha A.¹, Caldeira A.T.^{2,3}, Martins M.R.^{3,4}, Salgado R.⁵

(1) Water Laboratory, Évora University, Rua da Barba Rala, nº 1, Parque Industrial e Tecnológico de Évora, 7005-345 Évora, Portugal

(2) Chemistry Department, School of Sciences and Technology, Évora University, Rua Romão Ramalho 59, 7000-671, Évora, Portugal

(3) HERCULES Laboratory, Palácio do Vímioso, Largo Marquês de Marialva, 8, 7000-809, Évora, Portugal

(4) Institute of Mediterranean Agricultural and Environmental Sciences (ICAAM), University of Évora, Apartado 94, 7006-554 Évora, Portugal

(5) Department of Physics and Geophysics, University of Évora, Col. Luís Verney, R. Romão Ramalho, 59, Évora 7000-671, Portugal

* zavattieri@uevora.pt

Alqueva is nowadays the most important water reservoir in Portugal. Additionally, it is becoming an important agronomic and touristic region. These facts bring the questions of the water quality use. During the Alqueva hydro-meteorological experiment (ALEX) campaign, the team of the Water Laboratory from the University of Évora investigated the biological quality indicators of the Alqueva water. Among biological communities investigated, such as Chironomid pupal exuvia, benthic diatoms and phytoplankton, a special attention was given to the presence of cyanobacteria since cyanobacterial blooms are associated with the production of cyanotoxins that pose a health risk to human and livestock water consumers.

Polymerase chain reaction (PCR) was used to corroborate microscopic identification and to verify the presence of toxic genes associated with cyanobacteria.

Field campaign in Alqueva reservoir took place from June to September 2014. An additional campaign was performed in October due to a bloom situation. Water samples were monthly collected from three fixed platforms placed in the lacustrine zone and selected sites in the margins.

Results show that in the integrated phytoplankton samples analyzed, a total of 62 taxa were identified, 15 corresponded to cyanobacteria. Even when Chlorophytes was the richest group, cyanobacteria dominated in abundance in all sampling sites and throughout the whole sampling period, being *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* and *Aphanocapsa* the most frequent and abundant genera. The observation of the phytoplankton samples collected at discrete depths revealed the presence of cyanobacteria in the bottom samples collected in Alcarache and Alqueva-Mourão platforms (20 m) and in Alqueva-Montante (50 m). Given the abundance of cyanobacteria, molecular techniques confirmed also the presence of *Microcystis* species and microcystin-producing genes (hepatotoxins). It was not possible to confirm the presence of *cylindrospermopsin*. More primers are being tested to complete the list of microscopic identification of species and cyanotoxins.

Keywords: PCR; Molecular techniques; *Microcystis*; cyanotoxins, Alqueva

ANEXO 6

Artigo preparado durante a Sabática e que será submetido para publicação na revista TREES como complementar ao primeiro review publicado em 2010 com o título: Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors

<http://link.springer.com/article/10.1007/s00468-010-0488-8#/page-1>

Review article

Adventitious rooting of conifers: influence of biological factors

Maria Amely Zavattieri^{1*}; Carla Ragonezi²; Krystyna Klimaszewska³

1 ICT - Instituto das Ciências da Terra, Universidade de Évora, Évora, Portugal

2 Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Rodovia MGT 367, Km 583.5000, Alto da Jacuba, Diamantina, MG, 39100-000, Brazil.

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

*Corresponding author e-mail: zavattieri@uevora.pt

Abstract

Vegetative propagation of superior conifers can be achieved through rooted cuttings or rooted microshoots, the latter predominantly through *in vitro* tissue culture. Both techniques allow the rapid multiplication of favorable genetic combinations and the capture of large proportion of the genetic diversity in a single generation cycle. However, difficulties in achieving the rooting such as roots initially formed stop growing; the root system is scarce) limit the application of vegetative propagation in conifers. Many factors are implicated in the adventitious rooting of conifers including physical and chemical factors such as plant growth regulators, carbohydrates, light quality, temperature and rooting substrates or media, reviewed earlier by Ragonezi et al. (2010). In this review we cover the biological factors, such as the use of *Agrobacterium rhizogenes*, Plant Growth Promoting Rhizobacteria and other endophytes, and mycorrhizal fungi, which were found implicated in adventitious rooting. These microorganisms could contribute not only to the adventitious rooting development but also help in protecting conifer plants against pathogenic microorganisms, facilitate acclimation and transplanting, and contribute to the more sustainable, chemical-free forests.

Keywords: Biotization, Mycorrhization, Plant-Growth-Promoting Bacteria, Gymnosperms.

Abbreviations

ARF	Adventitious root formation
BC	Before Christ
BnR	Binucleate Rhizoctonia
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECM	Ectomycorrhizal fungi or Ectomycorrhizas
ERM	or EMF <i>Ericoid mycorrhizal fungi</i> ; <i>Ericoid mycorrhizas</i>
GA3	<i>Gibberellic acid</i> or <i>Gibberellin A3</i>
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i>
IBA	<i>Indole-3-butyric acid</i>
M	Molar
μM	Micromolar
mM	Millimolar
MS	Murashige and Skoog (1962) culture medium
NAA	1-naphthaleneacetic acid

PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
RSB	Root Stimulating Bacteria
SE	Somatic embryogenesis
Ti	Tumour inducing <i>plasmid</i>
TIBA	2,3,5-Triiodobenzoic acid
VAM	Vesicular-arbuscular mycorrhizas

Introduction

Grafting, rooted cuttings or rooted microshoots, the latter obtained *via* tissue culture, can be used for vegetative propagation of conifers. The success or failure of each technique depends on the species. John, 2002 in a key note entitled “The Technology of Clonal Forestry of Conifers”, commented that among all the vegetative propagation techniques, grafting is the oldest one since it has been used by the Chinese around 1000 BC and referred to by Aristotle around 384-322 BC. Bouvarel (1960) reported a large-scale grafting of Corsican pine (*Pinus nigra* Arnold var. *corsicana*) on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) rootstock in 1820. Grafting is still used in many species, particularly for the establishment of genetically improved seed orchards, e.g. in Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don), Hoop pine (*Araucaria cunninghamii* Ait.), Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*), Caribbean pine (*Pinus caribaea* Mor.) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) (Porada 1993 cited by Blada and Panea, 2011) and *Pinus pinea* L. in Portugal and Spain (Mutke et al. 2003; Cortizo 2004; Carneiro et al. 2007).

Clonal propagation by rooted cuttings has been highly successful for many deciduous trees from herbaceous, softwood, semi-hardwood, and hardwood stem cuttings and many books are available on this matter (Bryant, 1995; Hartmann et al., 2013, etc). Less works refer rooting conifers from cuttings (Jesinger & Hopp, 1967; Girouard, 1973; Wagner et al., 1989). On the other hand, *in vitro* culture techniques (rooted microshoots obtained *via* organogenesis and somatic embryogenesis) are the most recent of all vegetative propagation techniques (Smith 2013). Particularly, somatic embryogenesis offers the potential for large-scale clonal propagation, genetic engineering and reforestation of superior genetic plants (Arnold et al.; 1997; Bonga et al., 1995; Cyr et al.; 2001; Klimaszewska 1995, Klimaszewska et al., 1997, 2001; 2007; Lelu-Walter et al., 2006; Park, 2002)

Conifer cuttings and microshoots from *in vitro* cultures are frequently very difficult to root, which involves adventitious root formation (ARF) from the base of a shoot. Conifers are particularly recalcitrant to develop new roots by cuttings, but they are not unique as described in Pijut et al. (2011). The authors referred that many economically and ecologically important hardwood tree species have a low genetic or physiological capacity for adventitious root formation and are considered recalcitrant to routine, commercial-scale vegetative propagation via rooted cuttings and why this phenomenon exists for many tree species (such as ash, beech, oak, and walnut) and not for others is not fully understood. Recalcitrance of conifers during *in vitro* culture is also well known. Bonga et al. (2010) defined recalcitrance as “a plant species or a developmental phase during *in vitro* culture to fail to result in somatic embryos or organogenesis, in other words, recalcitrance occurs if extensive manipulation of culture media by traditional means: high–low salt, organic and inorganic nitrogen levels and plant growth regulators (PGRs) levels, among others or by application of more recently discovered growth regulators (oligosaccharides, jasmonates and brassinosteroids) fail to produce the desired response”. Thus, this definition can be applied to many conifers that are difficult to roots. In our previous review (Ragonezi et al. 2010) we summarized available information related to physical and chemical factors applied in rooting of cuttings and in rooting of *in vitro* propagated microshoots. However, with a few exceptions, the chemical treatments and/or physical conditions have not been encouraging because even if root induction was achieved the roots frequently stopped growing (observation during *in vitro* culture of *Pinus pinea* by our team, Oliveira et al., 2003)

An alternative treatment for stimulation of adventitious rooting is biotization that has been applied for rooting of both cuttings and *in vitro* propagated microshoots Nowak (1998) defined biotization as a metabolic response of shoots to microbial inoculant(s), leading to developmental and physiological changes and enhancing biotic and abiotic stress resistance of the derived propagules. It is not surprising that researchers have recently focused on the enormous beneficial potential of the soil microorganisms. It has been calculated that any given soil sample contains more than 30,000 taxonomic varieties of microbes (Combs 2013), evidently some being the “good ones” others the “evils”. Beneficial microorganisms provide plants with nutrients and defense against physical and/or biological threats, e.g. in suppressing pathogens and improving the adaptation of plants to difficult environments. In exchange, roots secrete fixed carbon into the soil and feed their bacterial and fungal symbionts. The application of biotization can be divided according to the microorganism involved (bacterization, mycorrhization), or to the biological problem for which the biotization is used as an alternative to other chemical/physical/molecular methods. This review focuses mainly on the application of biotization to solve one particular problem: the recalcitrance of conifer microshoots to form or develop an appropriate adventitious root system to ensure their acclimatization and transplanting to final location.

Symbiotic bacteria

Agrobacterium rhizogenes

A. rhizogenes is a gram negative bacterium present in soils that promotes the emergence of abundant adventitious rooting after infection (Tepfer 1981; Petit et al. 1987; Chandra 2012), earlier described as causing hairy root disease (Moore et al. 1979).

Agrobacterium rhizogenes transfers a series of oncogenes from the tumor-inducing (Ti) plasmids into the plant cell genome (Britton et al. 2008). The bibliography related to *A. rhizogenes* is so extensive that here, we cited a few selected articles and reviews (Chilton 1982; Tepfer 1983; White 1983; White et al. 1985; Cardarelli et al. 1985; Boulanger et al. 1986; Rhichaud et al. 1987; Cardarelli et al. 1987; Schmulling et al. 1988; Häggman and Aronen 2000; Meyer et al. 2000; Veena and Taylor 2007; Citovsky et al. 2007; Britton et al. 2008; Otten et al. 2008; Bulgakov et al. 2008; Mohajjel-Shoja et al. 2011; Georgiev et al. 2012; Özyiğit, 2012; Choudhury et al. 2014).

One of the first researches involving a conifer and *A. rhizogenese* was carried out by McAfee (1994) who achieved improved adventitious rooting in *Pinus monticola* Dougl. microshoots obtained from mature embryos *in vitro*. Co-cultivation of shoots with A4 or pRi transconjugant R1000 strains were used and compared with controls, and treatments with 1-naphthalene acetic acid (NAA) and indole-3-acetic acid (IAA). Both the number and quality of roots induced with co-cultivated shoots was observed. The same positive results were obtained with co-cultivated *Pinus banksiana* Lamb and *Larix laricina* (DuRoi) K. Koch de-rooted seedlings (McAfee 1994).

In another study, *Picea abies*, *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* 2- to 3-week-old seedlings were inoculated with supervirulent strains R1600 and A281 (pTVK291) by Magnussen et al. (1994). R1600 promoted low rooting percentage (2-3%) independently of the species infected but the adventitious roots were normal in the treated seedlings.

A. rhizogenes LBA9402 strain of was more effective compared with A4RSII for the induction of adventitious rooting on hypocotyls of *Pinus contorta* (Yibrah 1996). In that study, the roots originated from tissues of endodermis. The authors concluded that the roots followed the same pattern of rhizogenesis as auxin-induced roots in hypocotyl cuttings previously described by Lindroth et al. (1987).

The advantages of *A. rhizogenes* inoculation/co-cultivation over auxin root induction in Scots pine cuttings (of fascicular bud origin) was also demonstrated by Aronen et al. (1996). Cuttings of two different seasons (spring and late summer) were incubated for 20 h in 0.5 mM indole-3-butyric acid (IBA) solution and afterwards dipped in bacterial suspension of A4, A4 (GUSint) or R1600 followed by immediate planting. The summer cuttings that were inoculated produced more roots compared with IBA treatment alone (24.5 versus 16.2%, respectively). More than 80% fascicular shoots rooted in the best inoculated genotypes; the best response after IBA treatment was only 30-40%.

In *Pinus nigra*, 60-97% of explants formed roots following infection with *A. rhizogenes* wild strains 8196, 15834, or with the pRiA4abc transconjugant strain of *A. tumefaciens* (C58 chromosomal background) (Mihaljević et al. 1996). In this case the plant response to infection was dependent on the bacterial strain used, the age of the explant and the period of co-cultivation.

The first report of transgenic *Sequoia* tissue using *A. rhizogenes*-mediated gene transfer was published also by Mihaljević et al. (1999). Coast redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl clone CA₃) was inoculated with *A. rhizogenes* wild strain 8196 or with the pRi A4 transconjugant strain (C58 chromosomal background) at the basal-cut end. Roots were formed in 58-69% of explants, but no hairy-root phenotype was found in these transformed plants. Rooting frequency and the number of adventitious roots on inoculated shoot-tips were slightly moderated by the bacterial strain, duration of inoculation and explant support system.

Zaspel and Edwal (2001) inoculated cuttings of various conifers trees (*Larix*, *Taxus*, *Thuja* and *Picea*) with beneficial bacteria (*Bacillus*, *Pseudomonas* and *Agrobacterium*) to promote adventitious root development. Improved rooting of two of the three tested clones of *L. decidua* cuttings was observed after inoculation with *A. rhizogenes* DSM 30148 strain. The rooting percentage was greatly influenced by the genotype, with LH17 clone being the most responsive and rooting at over 60%. Even a higher success was reported for *Thuja* sp. cuttings, which rooted at 100% after the sole application of the same *A. rhizogenes* strain. The survival of the treated plants transferred to the greenhouse varied between 10-40%.

Pinus maximartinezii Rzedowsky and *P. pinceana* Gordon & Glend, two endemic species of pine plants from Mexico, were successfully regenerated *in vitro* by organogenesis starting from mature embryos and rooted by auxin pulses or by *A. rhizogenes* inoculation. The rooting percentage was low (13% and 7%) of the auxin-treated shoots of *P. maximartinezii* and *P. pinceana*, respectively, in comparison with 60% (*P. maximartinezii*) and 67% (*P. pinceana*) rooting obtained by inoculation with *A. rhizogenes* (Villalobos-Amador et al. 2002)

Li and Leung (2003) reported the effects of two strains of *A. rhizogenes* (A4T and LB9402) on root formation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don). The inoculations were made in various explants types (hypocotyl explants, intact seedlings, de-rooted seedling cuttings and adventitious shoots) with or without application of IBA. Considerable differences were found in the rooting response derived from the original explant used and between the strains of *A. rhizogenese*. Best rooting response of all treatments (approximately 75%) was obtained using hypocotyl segments inoculated with LBA9402 strain before transferring them to semi-solid ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 20 g/l sucrose and 9 mg/l IBA. LBA9402 also increased rooting percentage and root number in adventitious shoots explants. LBA9402 was also used by Tzfira et al. (2006b) in *Pinus halepensis* embryos, seedlings and shoots. Transformation induced callus and root formation at the wound sites in 64% of the seedlings, 71% in seedling cuttings and adventitious roots and root primordia were regenerated in 74 and 40% of 2 and 5 month-old-shoots, respectively.

In vitro shoots of *Araucaria excelsa* Lamb. var. *Glauca* (*Araucaria heterophylla*) were induced to root with the addition of different PGRs (IBA, NAA) and ancillary compounds to increase the rooting under *in vitro* condition (Sarmast et al. 2012). Neither ancillary compounds such as salicylic acid, putrescine nor hydrogen peroxide affected the rooting of this recalcitrant species. The authors hypothesized that high tannin and resin levels in the tissues of this conifer could be the reason of rooting failure. Nevertheless MS medium containing 7.5 μM of both IBA and NAA for 15 days followed by PGR-free half-strength MS medium, resulted in 33% increase of rooting of shoots each with one or two roots. Alternatively *A. rhizogenes* strain K599 inoculation improved rooting percentage up to 40% when in combination with 7.5 μM (both IBA and NAA). No rooting was obtained when plants were inoculated with *A. rhizogenes* without PGRs.

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and other endophytes

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are free-living (asymbiotic) soil bacteria with the ability to colonize plant roots and stimulate their growth (Chandway 1997; Zahir et al. 2003; Lucy et al. 2004; for a review see Saharan and Nehra 2011). These organisms have contributed to plant survival and evolution; they can infect multiple genera, yet exhibiting genotype specificity within species (Johnston-Monje and Raizada 2011). Common genera of PGPR are: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Azospirillum* (Benizri et al. 2001; Gray and Smith 2005).

PGPR can affect plant growth by biologically active substances (Spaepen et al. 2009). It is known that some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) produce/alter the concentration of plant hormones such as IAA, gibberellic acid (GA3), cytokinins and ethylene (Husen 2003, Nihorimbere et al., 2011). Indole-3-acetic acid (IAA) is the best-characterized auxin produced by many plant-associated bacteria, including PGPR (Spaepen et al., 2007a). Exogenous IAA controls a wide variety of processes in plant development and plant growth: low concentrations of IAA can stimulate primary root elongation, whereas high IAA levels stimulate the formation of lateral roots, decrease primary root length and increase root hair formation (for more information see the review of Vacheron et al., 2013). It is known that IAA is synthesized by rhizobacteria from tryptophan (Kamilova et al., 2006) but other IAA biosynthetic pathways have been describe depending on the metabolic intermediates of the PGPR involved (Spaepen et al., 2007a).

Studies on PGPR in gymnosperms are scarce compared with those reported for agricultural crops, and very little information is available on the application of these bacteria to induce/increase the root system. Here, we included some research that focused on root growth enhancement, but clearly much more work is still necessary in conifers/PGPR interaction.

In the European patent EP0804081B1, the property of the University of Tennessee Research Corporation, the inventors claimed the development of a method that promotes adventitious rooting of plants by co-culturing with non-pathogenic bacteria. The novel bacterium species was closely related to the subdivision of the *Proteobacteria* and more specifically to *Caulobacter subvibrioides*. The discovered bacterium was designated as Root Stimulating Bacteria (RSB). This species of bacterium was able to initiate adventitious rooting of white pine (*Pinus strobus*) and slash pine (*Pinus elliottii*) hypocotylary explants after exposure to RSB under *in vitro* conditions. In slash pine the root development occurred after 6 weeks of incubation post-treatment with RSB. The bacteria promoted *ex-vitro* rooting of loblolly pine (*Pinus taeda*) cuttings. The beneficial effect appeared not to be specific as several species of conifers and non-coniferous plants have responded positively to the root induction bacterial treatment. Many forest trees could be rooted with RSB and in the patent the authors cited at least 40 conifer species.

Burns and Schwarz (1996) working with hypocotyl cuttings of *Pinus elliottii*, co-cultured with RSB, obtained rooted plants from 15 to greater than 90% over the range of non-treated controls.

Chanway and Holl (1993) inoculated hybrid spruce seedlings (*Picea glauca* x *engelmannii*) with *Hydrogenophaga pseudoflava* (isolated from Mackenzie spruce seedlings and Salmon Arm spruce seedlings) and with *Pseudomonas putida*. After one year from inoculation field performance of the trees was evaluated. Inoculations increased seedling biomass or branch number up to 49%, being also very effective as a root growth promoter of the Salmon Arm spruce ecotype. *Pseudomonas putida*, which originated from Salmon Arm spruce seedlings, increased seedling biomass or branch number in two trials, but had an inhibitory effect in three other tests. In 1994, the same authors inoculated seeds and seedlings of two different Douglas-fir ecotypes in a controlled environment. They used N74 strain of *Arthrobacter oxydans* and the K23 strain of *Pseudomonas aureofaciens* (isolated from naturally regenerating Douglas-fir seedlings collected from two different sites: Williams Lake and Chilliwack, respectively). *A. oxydans* strain N74 stimulated seedling branching and enhanced root and shoot dry weight of the Williams Lake ecotype but had no significant stimulatory effect on growth of the Chilliwack ecotype. On the other hand, *P. aureofaciens* (K23) significantly stimulated shoot branching and root dry weight of Chilliwack Douglas-fir but had no stimulatory effect on growth of that from Williams Lake (Chanway and Holl 1994).

Bent et al. (2001) studied the presence of other rhizobacteria in *Pinus contorta* and the related alterations in root hormone level and growth. Rhizospheric density and root hormone concentrations were determined after treatment with a single growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* strains L6 and Pw-2 or in a combination of bacteria: *P. polymyxa* strain L6 + *Pseudomonas fluorescens* strain M20 or strain Pw-2 + *Pseudomonas fluorescens* M20 strain. There was no difference in the growth of pines inoculated with strain L6 and those inoculated with strain L6 + *Pseudomonas fluorescens* strain M20. Results showed that seedlings inoculated with *P. polymyxa* strain Pw-2 had more

lateral roots and a greater root mass after 12 weeks from inoculation than plants inoculated with *P. polymyxa* strain Pw-2 + *Pseudomonas fluorescens* strain M20. Also, the authors discovered that growth promotion mediated by *P. polymyxa* L6 and Pw-2 was not correlated with the average population density of each strain in the rhizosphere. However, the bacterial species-specific effects were observed in the root hormone levels: IAA concentration was elevated in roots inoculated with *P. polymyxa* L6 or Pw-2, while dihydrozeatin riboside concentration was elevated in roots inoculated with *P. fluorescens* M20.

Vonderwell et al. (2001) aimed at elucidation of the mechanism by which some bacterial strains increase root growth response in forest seedlings grown in nurseries. Seeds of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) were inoculated at the sowing with an equal amount of either *Bacillus subtilis* strains LS211 and INR7, or sterile distilled water used as a control. Seedling biomass, root length, root surface area, average root diameter, and root volume were measured at 6 and 12 weeks after sowing. Growth promotion was variable and dependent on the media and time elapsed since sowing. In a second experiment, root respiration rate and the total root IAA content were quantified at 6 and 12 weeks in seedlings grown in Promix® substrate. In this experiment, it was found that strain INR7 decreased the whole root system respiration by 22% and increased root biomass and root length compared with control at the 6th week. Bacterial strain LS211 had no effect on root respiration. Furthermore, bacterial strain INR7 increased the total root IAA concentration 1.7 times over controls at the 6th week, whereas LS211 had no effect. Although the cause and effect could not be established, these studies suggested that root growth promotion was influenced by the growth medium and that IAA concentration and root respiration rates were two physiological mechanisms correlated with rhizobacterial activity and growth promotion.

Mycorrhization

In nature, innumerable plant species form symbiotic association with higher fungi that live inside and around their roots. These beneficial associations or mycorrhizal symbiosis are basically defined by the host/partner combination and the morphology of the symbiotic structures. Depending on the way in which fungi interact with a host plant root, particularly with respect to the nature of the interface (intracellular or extracellular) that forms between host plant and fungus, the mycorrhizas are subdivided into three categories: vesicular arbuscular mycorrhizas (VAM), ectomycorrhizas (ECM) and ericoid mycorrhizas (ERM) (for more detail see Brundrett 2004)

Arbuscular mycorrhizas occur in herbaceous genera (approximately 80% of all plant species), while ectomycorrhizas are most common in tree species (including the families *Betulaceae*, *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Leguminaceae* and *Myrtaceae*). Ericoid mycorrhizas are confined to the genera within the *Ericales*, including *Ericaceae* and *Vacciniodeae* in the Northern Hemisphere and *Epacridaceae* in the Southern Hemisphere. Different mycorrhizal types differ not only in their host preference; in the structures they form during association with the host root, but, also in the ways by which they enhance host plant growth (Finlay 2008). Nowadays, ectomycorrhizae that appeared about 200 million years ago (Carney 2000) represent less than 5% of all mycorrhizal associations with vascular plants, but are omnipresent in the *Pinaceae* family, and are the dominant type in habitats where climate is strongly seasonal and soil nutrient availability is poor (Malloch et al. 1980).

Ectomycorrhizal symbiosis is structurally characterized by the presence of a dense mass of fungal hyphae forming tissue and a pseudo-parenchymatous tissue sheathing the root, called mantle. The external mantle is connected inside the root to the Hartig net (apoplastic hyphae) and with a network of extra radical hyphae proliferating into the soil (Graham and Miller 2005). Extramatrical hyphae, the mantle and the intraradicular hyphae network are active metabolic entities that provide essential nutrients (nitrogen, phosphate) to the host plant and a stable carbohydrate-rich niche in the roots for the fungal partner, thus making the relationship a mutualistic symbiosis (Allen 1991; Read 1999; Martin et al. 2001; Taylor and Alexander 2005). Several studies have shown the benefits of using ECM fungi *Amanita*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* and *Suillus* in conifer micropropagation (Gay et al. 1990; Wallander, 2000; Niemi et al. 2000; Taylor et al. 2004; Niemi et al. 2005; Adriaensen et al. 2006; Ragonezi et al. 2012; Heinonsalo et al. 2015). ECM inoculations can enhance root formation and or subsequent root branching of cuttings *in vivo* and in seedlings (Normand et al. 1996; Karabaghli et al. 1998; Niemi et al. 2000; Niemi et al. 2004). Additionally, fungal inoculations can increase the plant ability to overcome the stress related with nursery and growth after transplantation (Fini et al. 2011). Successful colonization of roots and further changes “to construct” an ectomycorrhizal root is mediated by biochemical signals (Seddas et al. 2009). These rhizospheric signals include auxins, flavonoids, alkaloids, cytokinins (Martin et al. 2001) and also plant phenolic compounds such as *p*-coumaric acid, *o*-coumaric acid (Ragonezi et al. 2013), coumarin, naringenin and other flavonoids (Lynn and Chang 1990; Felten et al. 2009; Mandal et al. 2010; Amallesh et al. 2011; Hassan and Mathesius 2012; Plett and Martin 2012).

Below we explore the use of ECM to induce/overcome rooting problems of conifer cuttings and *in vitro* regenerated microshoots.

David et al. (1983) induced rooting of *Pinus pinaster* cloned shoots *in vitro* with auxin treatment (NAA 10⁻⁶M, 18 days) and demonstrated that rooting ability persisted over 5 successive induction cycles (9-month period). Auxin induced an intense root meristem initiation, but prevented root elongation. When they co-cultivated rooted shoots with *Pisolithus tinctorius* or *Hebeloma cylindrosporium*, roots resumed growth and short lateral root formation was stimulated. The

fungi improved the quality of the root system, which was a pre-requisite for the successful transplantation of plants from the test-tubes to a field .

The effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* and of its culture filtrate on *in vitro* rooting of *Pinus halepensis* de-rooted shoot hypocotyls was studied by Gay (1990) in an attempt to determine if ectomycorrhizal fungi could enhance adventitious root formation in Gymnosperms. In the presence of 0.1 mM tryptophan (IAA precursor) *H. hiemale* strongly enhanced rooting of the hypocotyls in the absence of PGRs. The rooting of the inoculated hypocotyls was 96.6%, whereas it was only 7.6% in the absence of the fungus. *H. hiemale* did not produce IAA in the culture filtrate when tryptophan was not added to the medium and did not stimulate rooting of the hypocotyls. In contrast, a culture filtrate obtained in the presence of tryptophan contained IAA and the ethyl acetate extract from this filtrate stimulated 100% rooting. Based on these results, the author concluded that IAA production was the cause of the rhizogenic activity of *H. hiemale* which was able to metabolize the supplied tryptophan into IAA.

With the objective to increase root growth of conifers seedlings at out planting, Scagel (1994) compared the effect of biologically-produced IAA (or ethylene) from ECM symbiosis with the exogenous application of PGRs to the roots. The goal was to increase the endogenous IAA content to the level above the threshold required to generate new root. The experiments showed wide range of *in vitro* IAA and ethylene production capacity in the tested ECM. The hypothesis that ECM fungi would differentially affect the endogenous IAA content of roots in the symbiotic state intrinsic to their different capacity to produce either IAA or ethylene *in vitro* was not consistently validated.

Normand et al. (1996) inoculated microcuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* clones derived from *in vitro* culture with wild-type or IAA-overproducing mutant strains of the ECM fungus *Hebeloma cylindrosporium*. The results demonstrated that two clones of *P. pinaster* and one clone of *P. sylvestris* did not root in the absence of the auxin, but they produced roots in the presence of each of the fungal strain tested. Both the wild-type and the IAA overproducing mutant were effective in the promotion of rooting. When inoculated plantlets were transferred *ex vitro* they were surrounded by the hyphae network, which later formed well defined mycorrhizal structures.

Ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* strain S238 N was used to inoculate Norway spruce (*Picea abies*) seedlings under the axenic conditions (Karabaghli-Degron et al. 1998). The question asked was whether IAA produced by *L. bicolor* S238 N strain could be responsible for the rhizogenic stimulation in *Picea abies*. The presence of the fungus slowed the tap-root elongation during the first 15 days of co-culture but afterwards stimulated it by 136%. In addition, S238 N strain enhanced *in vitro* lateral root formation by 4.3 fold. When the fungus was separated from the roots by a cellophane membrane, the compounds released by the fungus were also effective. One of the compounds was identified as IAA in a pure culture of the fungus. When 2,3,5-triodobenzoic acid (TIBA), an auxin inhibitor, was added to the culture medium the lateral root formation of inoculated seedlings was significantly inhibited. While TIBA had no significant effect on IAA release by *L. bicolor* S238 N it counteracted the stimulation of lateral rhizogenesis by an exogenous supply of IAA. These results suggested that TIBA inhibited the transport of fungal IAA in the root.

In another study, the ability of the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius* and *Paxillus involutus* that produce IAA and affect the formation and growth of roots in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) *in vitro* hypocotyl cuttings was elucidated by Niemi et al. (2002). Inoculations with either fungus were more effective in enhancing root formation than IBA treatment applied to the base of hypocotyls. Both fungi produced IAA in the absence of exogenous tryptophan, but the mycelium and culture filtrate of *P. tinctorius* contained higher concentrations of free and conjugated IAA than the mycelium and culture filtrate of *P. involutus*. Inoculation with either fungus or short-term application of culture filtrate of either fungus to the base of hypocotyl cuttings enhanced root formation. Fungal IAA production was not directly correlated with root formation, because inoculation with *P. involutus* the weaker producer of IAA promoted a better rooting response than inoculation with *P. tinctorius*, suggesting that, in addition to IAA, other fungal components play an essential role in root formation. One of these factors may be diamine putrescine, which *P. involutus* strain was able to produce and release at high concentrations. Rooting of *Pinus pinea* L. microshoots derived from mature seed cotyledons, was achieved after induction with a combination of auxin and hypertonic shock, but the root growth *in vitro* was not sustained. Some fungi isolated from ectomycorrhizas found in the *P. pinaster* stand were therefore co-cultured with the plantlets (Oliveira et al. 2003). About half of the fungal isolates tested helped the plants to resume root growth. These results demonstrated the need for further investigation of the effect of other fungi and fungal associations to stimulate the rooting in conifers.

Ragonezi et al. (2012) determined that *in vitro* co-culture of *Pinus pinea* plantlets with *Pisolithus arhizus* helped to overcome the cessation of adventitious root growth and resulted in a root system that was better adapted to post transplantation stress. None of the inoculated plantlets died in spite of using exclusively sterile vermiculite in the early phase of acclimatization during which a vast mycorrhizal symbiosis was established. Moreover, fewer roots were lost during transplantation which was facilitated by the morphological modifications of the inoculated roots such as the presence of the hyphae around the roots and the internal Hartig net, which increased root thickness and contributed to a more robust root system.

Bacteria/mycorrhiza interaction

The bacterial flora associated with mycorrhizae and non-mycorrhizal roots was examined in seedlings of *Picea engelmanni*, *P. pungens*, *Pinus aristata*, *P. flexilis*, and *Pseudotsuga menziesii* by Oswald and Ferchau (1968). Later,

Frey-Klett et al. (2007) explored the natural associations that occurred between mycorrhizal fungi and microbial communities, which regulated the mycorrhizal symbiosis. The authors distinguished between the helper bacteria, which assist mycorrhiza formation, and those that interact positively with the functioning of the symbiosis. Many studies also suggested that bacterial-fungal interactions play important roles during mycorrhiza formation and affect the plant health (Schrey et al. 2012).

Rifampicin-resistant derivatives of plant growth promoting *Bacillus polymyxa* strains L6, Pw-2, and S20 were evaluated in the interaction of bacteria \pm mycorrhizal co-inoculation on pine and spruce seedling growth (Shishido et al. 1996). The objective was to determine whether the mechanism by which bacteria stimulated seedling growth was depended on the presence of ectomycorrhizas. Bacterial inoculation did not influence the mycorrhizal status of seedlings, but all three *Bacillus* strains stimulated growth of both conifer species. Root biomass, in particular, was significantly enhanced by up to 18% compared with uninoculated controls. Mycorrhizal fungi improved the growth of spruce seedlings, but plant growth promotion by *B. polymyxa* was similar for mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of both species. The results suggested that *B. polymyxa* strains L6-16R, Pw-2R, and S20-R enhanced conifer seedling growth through a mechanism unrelated to mycorrhizal fungi.

Karabaghi et al. (1998) used the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238 N and the bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6 separately and in combination to induce *in vitro* rooting of de-rooted shoot hypocotyls of *Picea abies*. *L. bicolor* increased the percentage of hypocotyls forming roots if tryptophan was added to the co-culture. The fungal inoculation enhanced also adventitious root elongation and branching as well as the aerial growth of the cuttings. *P. fluorescens* also enhanced the number of roots per rooted hypocotyls. Similar results were obtained by adding exogenous IAA to the rooting medium. *P. fluorescens* BBc6 had no effect on root elongation and branching. The production of IAA by pure cultures of *L. bicolor* S238 N and *P. fluorescens* BBc6 was stimulated in the presence of tryptophan, thus, the authors concluded that effect of the fungus in stimulating adventitious root formation and subsequent elongation and branching can be attributed, at least partially, to the synthesis of IAA by the fungus. The finding that *P. fluorescens* BBc6 had no effect on root elongation and branching, although it produced IAA, suggested that IAA was not the only parameter involved in the stimulation of these processes or, the bacterium produced other compounds that counteracted the stimulatory effects of IAA on root elongation and branching.

Adventitious rooting of *Pinus sylvestris* L. hypocotyl cuttings was promoted by either the binucleate *Rhizoctonia* (BnR) and to a lesser extent by ectomycorrhizal fungi *Suillus bovinus* or *Laccaria bicolor* as reported by Kaparakis and Sen (2006). Four BnR isolates induced differentiation of root meristems and significantly induced adventitious rooting in young de-rooted seedlings. Rooting rates were significantly higher in BnR treatments than in pretreatments with IBA (200 μ M) or with co-cultivation with ECM fungi. Mechanisms involved in root meristem differentiation, e.g. auxin production, wound response and oligosaccharide signals were also discussed with respect to the host-fungal signaling mechanisms. In a study with *P. sylvestris* L seedlings, the BnR inoculations stimulated longer roots and reduced root width however, the root infection was <6% (Gronberg et al. 2006). At a harvest, 240 days post inoculation, no significant plant and root growth differences were identified, although short root numbers were significantly increased. BnR infection detected in roots was characterized by the presence of intercellular fungal hyphae and subtending intracellular monilioid fungal cells located in outer cortical cells of long roots.

Conclusions

This review is the first attempt to compile most of the information about the use of microbial organisms to induce, resume or increase the root system of conifer cuttings and microshoots. The examples included in this review could help researchers, foresters, and nursery-growers in the selection of specific microorganisms or the combination of microorganisms with other physical and/or chemical factors to overcome the recalcitrance of conifers to produce adventitious roots.

References

- Adriaensen K, Vangronsveld J, Colpaert JV (2006) Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 16:553–558
- Allen MF (1991) *The Ecology of Mycorrhizae*. Cambridge University Press, New York, USA
- Amalesh S, Gouranga D, Sanjoy KD (2011) Roles of flavonoids in plants. *Int J Pharm Sci Tech*. 6:12-35
- Arnold S, Egertsdotter U, Mo H (1997) Somatic embryogenesis in conifers - with special emphasis on *Picea abies*. *Acta Hort. (ISHS)* 447:51-58. http://www.actahort.org/books/447/447_3.htm
- Aronen TS, Haggman HM, Salonen M (1996) Rooting of Scots pine fascicular shoots by *Agrobacterium rhizogenes*. *Forest Genetics*, 3(1):13-22
- Arshad M, Frankenberger WT (1991) Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133: 1–8
- Benizri E, Baudin E, Guckert A (2001) Root colonization by plant growth promoting Rhizobacteria. *Biocont Sci Technol* 5(11):557-574
- Benizri E, Courtade A, Picard C, Guckert A (1998) Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biol. Biochem* 30:1481-1484

- Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can J Microbiol* 47(9):793-800
- Blada I, Panea T (2011) Improvement of grafting procedures for the ornamental species: I. *Picea pungens* Engelm. var. *glauca* Regel. *Ann. For. Res.* 54(2):185-196
- Bonga JM, Klimaszewska K, von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Org* 100:241-254
- Boulanger F, Berkaloff A, Richaud F (1986) Identification of hairy root loci in the T-regions of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmids. *Plant Mol. Biol.* 6:271-279.
- Bonga JM, Klimaszewska K, Lelu MA, von Aderkas P (1995) Somatic embryogenesis in Larix. In S.M. Jain, P.K. Gupta, and R.J. Newton, Editors. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Vol. 3, pp 315-339
- Bouvalet P (1960) Les vieux pino laricio greffes de la foret de Fontainebleau. *Silvae Genet* 9(2):43-44.
- Britton, MT, Escobar MA, Dandekar AM (2008) The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. In *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*; Springer New York. Chapter 14: pp 523-563. doi: 10.1007/978-0-387-72290-0_14
- Bryant G (1995) *Propagation Handbook*. Stackpole Books, Mechanicsburg, Pennsylvania
- Brundrett M (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations *Biol Rev* 79:473-495. Cambridge Philosophical Society 473. doi: 10.1017/S1464793103006316
- Bulgakov VP, Shkryl YN, Veremeichik GN, Gorpenchenko TY, Inyushkina YV (2011). Application of *Agrobacterium* Rol Genes in Plant Biotechnology: A Natural Phenomenon of Secondary Metabolism Regulation, Genetic Transformation, Prof. Maria Alvarez (ed.), ISBN: 978-953-307-364-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/genetic-transformation/application-of-agrobacterium-rol-genes-in-plant-biotechnology-a-natural-phenomenon-of-secondary-meta>
- Burns JA, Schwarz OJ (1996) Bacterial stimulation of adventitious rooting on *in vitro* cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) seedling explants. *Plant Cell Rep* 15:405-408.
- Cairney JWG (2000) Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften* 87:467-475
- Cardarelli M, Spano L, De Paolis A, Mauro ML, Vitali G, Costantino P (1985) Identification of the genetic locus responsible for nonpolar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* Ki plasmids. *Plant Mol. Biol.* 6:271-279.
- Cardarelli, M., D. Mariotti, M. Pomponi, L. Spano, I. Capone, and P. Contantino. (1987) *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 209:475-480.
- Carneiro AN, Hall d'Alpuim M, Vacas de Carvalho MA, Pessoa J, Carrasquinho I (2007) Manual Ilustrado Enxertia do Pinheiro Manso. Estação Florestal Nacional (EFN), pp1-41
http://www.inia.pt/fotos/gca/manual_ilustrado_enxertia_do_pinheiro_manso_1369127188.pdf
- Cassán F, Vanderleyden, J and Spaepen S (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the Genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33(2):440-459.
- Chandra S (2012) Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol Lett*, 34(3):407-415.
- Chanway CP, Holl FB (1993) Ecotypic Specificity of Spruce Emergence-Stimulating *Pseudomonas putida*. *Forest Sci* 39(3):520-527(8)
- Chanway CP, Holl FB (1994) Ecological growth response specificity of two Douglas-fir ecotypes inoculated with coexistent beneficial rhizosphere bacteria. *Can J Botany* 72(5):582-586
- Chanway CP (1997) Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Sci* 43(1):99-112
- Chanway CP, Holl FB (2011) First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria of hybrid spruce (*Picea glauca x engelmannii*). *Can J Microbiol* 39(11): 1084-1088
- Chilton MD, Tepfer D, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295 (5842):432-432.
- Choudhury H, Kumaria S and Tandon P (2014) Pinus biotechnology: Progress and Prospects. In book: *Tree Biotechnology*, 1st Edition, Chapter: 8, Publisher: CRC Press Inc, Editors: K. G. Ramawat, Jean-Michel Merillon, M. R. Ahuja, pp.223-247
- Citovsky V, Kozlovsky SV, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, Tovkach A, Tzfira T (2007) Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol.* 9(1):9-20.
- Combs A (2013) Fighting Microbes with Microbes. Doctors turn to good microbes to fight disease. Will the same strategy work with crops? On line article at The Scientist.
<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/33703/title/Fighting-Microbes-with-Microbes/>
- Cortizo M, Alonso P, Fernández B, Rodríguez A, Centeno ML, Ordás RJ (2004) Micrografting of mature Stone pine (*Pinus pinea* L) trees. *Ann. For. Sci.* 61 (2004) 843-845. doi: 10.1051/forest:2004081
- Cyr D, Attree SM, El-Kassaby YA, Ellis DD, Polonenko DR, Sutton BCS (2001) Application of somatic embryogenesis to tree improvement in conifers. In: Morohoshi N & Komamine A (eds) *Molecular Breeding of Woody Plants*.

- Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium (IWBS), Narita, Chiba, Japan, 14-17 March 2001. Elsevier Science B.V., pp. 305-312.
- David A, Faye M, Rancillac M (1983) Influence of auxin and mycorrhizal fungi on the *in vitro* formation and growth of *Pinus pinaster* roots. *Plant and Soil* 71(1-3):501-505
- De Cleene M and De Ley J (1981) The Host range of infectious hairy-root. *Bot Rev* 47(2):147-191
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V (2009) The Ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in Poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 151 (4):1991-2005.
doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.147231>
- Fini A, Frangi P, Amoroso G, Piatti R, Faoro M, Bellasio C, Ferrini F (2011) Effect of controller inoculation with specific mycorrhizal fungi from the urban environment on growth and physiology of containerized shade tree species growing under different water regimes. *Mycorrhiza* 21:703–719
- Finlay RD (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J. Exp. Bot.* 59 (5):1115-1126 doi: 10.1093/jxb/ern059
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2012) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176 (1):22-36. doi: 10.1186/1471-2180-12-164.
- Gay G (1990) Effect of the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in de-rooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Can J Bot* 68:1265-1270
- Georgiev MI, Agostini E, Ludwig-Müller J, Xu J (2012) Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol* 30(10):528–537
- Girouard RM (1973) Propagation of spruce by stem cuttings. *New Zeal J For Sci Vol* 4(2):140-140
- Graham JH, Miller RM (2005) Mycorrhizas: Gene to Function. *Plant Soil* 274:79-100.
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biol Biochem* 37:395–412.
- Grönberg H, Kaparakis G, Sen R (2006) Binucleate Rhizoctonia (*Ceratorhiza* spp.) as non-mycorrhizal endophytes alter *Pinus sylvestris* L. seedling root architecture and affect growth of rooted cuttings. *Scand J Forest Res* 4(21):450-457. doi:10.1080/02827580601019662
- Häggman H, Aronen T (2000) *Agrobacterium rhizogenes* for rooting recalcitrant woody plants. In: Jain, SM & Minocha SC (eds.) *Molecular Biology of Woody Plants, Forestry Sciences* 66, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol. 2, pp. 47-78.
- Hartmann H, Kester D, Davies FT, Geneve R (2013) *Plant Propagation: Principles and Practices*. Pearson New International Edition (8 Edition)
- Hassan S, Mathesius U (2012) The role of flavonoids in root rhizosphere signaling opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J Exp Bot.* 63:3429_3444. doi:10.1093/jxb/err430
- Heinonsalo J, Juurola E, Linden A, Pumpanen J (2015) Ectomycorrhizal fungi affect Scots pine photosynthesis through nitrogen and water economy, not only through increased carbon demand. *Environ Exp Bot* 109:103-112. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/33703/title/Fighting-Microbes-with-Microbes/>
- Husen H (2003) Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indones J Agric Sci* 4(1):27-31
- John A (2002) The Technology of Clonal Forestry of Conifers *In Clonal Forestry: Who are you kidding?* Abstracts from the Conference of the Nordic Group for the Management of Genetic Resources of Trees. Barony Castle, Scotland
- Jesinger R, Hopp RJ (1967) Rooting of conifers cuttings. *In Arnoldia, Bulletin of Popular Information of the Arnold Arboretum, Harvard University, Vol 2* (12):85-90
- Johnston-Monje D, Raizada MN (2011) Integration of Biotechnologies – Plant and Endophyte Relationships: Nutrient Management. In: Murray Moo-Young (ed.), **Comprehensive Biotechnology**, Elsevier Ltd, 2nd edn, vol 4, pp. 713–727.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080885049002646>
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B (2006) Organic acids, sugars and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:250–256
- Kaparakis G and Sen R (2006). Binucleate Rhizoctonia (*Ceratorhiza* spp.) induce adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Pinus sylvestris* L. *Scan J of Forest Res* 21(6):444-449.
- Karabaghli C, Frey-Klett P, Sotta B, Bonnet M, Le Tacon F (1998) *In vitro* effects of *Laccaria bicolor* S238 N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. *Tree Physiol* 18(2):103-111
- Karabaghli-Degron C, Sotta B, Bonnet M, Gay G, Le Tacon F (1998) The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root-cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytol* 140:723-733
- Klimaszewska, K (1995) Somatic embryogenesis in *Picea mariana* (Mill.) In: Jain S, Gupta P & Newton R (eds), vol 44-46, pp 67-79

- Klimaszewska K, Devantier Y, Lachance D, Lelu MA, Charest PJ (1997) *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can. J. For. Res.* 27:538-550
- Klimaszewska K, Park Y-S, Overton C, MacEacheron I, Bonga JM (2001) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 392-399
- Klimaszewska K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park Y-S, Lelu-Walter MA (2007) Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus spp.* In: da Silva J, Shima K (eds). *Tree and Forestry Science and Biotechnology Global Science Books* 1(1):11-25
- Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster*. *Plant Cell Rep* 25:767-776
- Li M, Leung DWM (2003) root induction in radiate pine using *Agrobacterium rhizogenes*. *Electron. J. Biotechnol* 6(3):254-261. [online]
- Lindroth A, Gronroos R, von Arnold S (1997) Study of adventitious root formation through lateral root-specific mRNA and rooting-associated promoters in *Pinus contorta*. In Altman A & Waisel Y (eds) *Biology of root formation and development*. *Basic Life Sciences*, vol 65, pp. 213-214
doi: 10.1007/978-1-4615-5403-5_39
- Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86(1):1-25
- Lynch JM (1985) Origin, nature and biological activity of aliphatic substances and growth hormones found in soil. In: Vaughan et al. (eds); *Soil Organic Matter and Biological Activity*, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 151-174
- Lynn DG, Chang M (1990) Phenolic signals in combination: implications for plant development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 41:497_526
- Magnussen D, Clapham D, Gronroos R von Arnold S. (1993) Induction of hairy and normal roots on *Picea abies*, *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Scand J of Forest Res* 9(1):46-51.
doi:10.1080/02827589409382811
- Malloch DW, Pirozynski KA, Raven PH (1980) Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2113–2118
- Mandal SM, Chakraborty D, Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav.* 5:359-368
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 151(1):145–154.
doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00169.x
- McAfee BJ, White EE, Pelcher LE, Lapp MS (1994) Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss Org* 34(1):53-62
- Meyer A, Tempé J, Costantino P (2000) Hairy root: A molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In: Stacey G & Keen NT eds *Plant-Microbe Interactions*, American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, U.S.A. vol. 5, pp 93–139
- Mihaljević S, Katavić V, Jelaska S (1999) Root formation in micropropagated shoots of *Sequoia sempervirens* using *Agrobacterium*. *Plant Sci* 141(1):73-80. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00223-4,
- Mihaljević S, Stipković S, Jelaska S (1996) Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria. *Plant Cell Rep* 15:610-614.
- Mohajjel-Shoja H, Clément B, Perot J, Alioua M, Otten L (2011) Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *trpC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other *plast* genes. *Mol Plant-Microbe Int* 24:44-53
- Moore L, Warren G, Strobel G (1979) Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2(4):617-626
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497
- Mutke S, Gordo J, Climent J, Gil L (2003) Shoot growth and phenology modelling of grafted stone pine (*Pinus pinea* L.) in Inner Spain. *Ann. For. Sci.* 60:527-537. doi: 10.1051/forest:2003046
- Niemi K, Salonen M, Ernstsén A, Heinonen-Tanski H, Häggman H (2000) Application of ectomycorrhizal fungi in rooting of Scots pine fascicular shoots. *Can J For Res* 30:1221-1230.
- Niemi K, Vuorinen T, Ernstsén A, Häggman H (2002) Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyls cuttings in vitro. *Tree Physiol* 22:1231–1239
- Niemi K, Scagel C, Häggman H (2004) Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers. *Plant Cell Tiss Org* 78:83–91.
- Niemi K, Julkunen-Tiitto R, Tegelberg R, Häggman H (2005) Light sources with different spectra affects root and mycorrhiza formation in Scots pine *in vitro*. *Tree Physiol* 25:123-128.
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2):327-337

- Normand L, Bärtschi H, Debaud JC, Gay G (1996) Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma cylindrosporum*. *Physiol Plant* 98:759–766.
- Normand L, Bärtschi H, Debaud JC, Gay G (1996) Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Physiol Plant* 98:759-766
- Nowak J (1998) Benefits of *in vitro* “Biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 34:122-130
- Oliveira P, Barriga J, Cavaleiro C, Peixe A, Potes AZ (2003) Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry* 76:579-587
- Oswald ET, Ferchau HA (1968) Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. *Plant Soil* 28(1):187-192
- Otten L, Burr T, Szegedi ES (2008) *Agrobacterium* : a disease-causing bacterium. In Tzfira T & Citovsky V (eds), *Agrobacterium*, from biology to biotechnology, Springer Press, pp.1-46.
- Özyiğit İİ (2012) *Agrobacterium tumefaciens* and its use in plant biotechnology. In Ashraf M et al. eds. *Crop Production for Agricultural Improvement*, Springer Netherlands, pp. 317-361
- Park YS (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann For Sci* 59:651-656
- Petit A, Stougaard J, Kuhle A, Marcker KA, Tempé J (1987) Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 207:245-250.
- Pijut PM, Woeste KE, Michler CH (2011) Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. In Janick J ed., *Horticultural Reviews*, Wiley-Blackwell, vol 38, pp 213-251
- Plants in Action: Adaptation in Nature, Performance in Cultivation. Dr Brian J et al. eds; Australian Society of Plant Scientists, New Zealand Society of Plant Biologists, and New Zealand Institute of Agricultural and Horticultural Science 1999.
<http://plantsinaction.science.uq.edu.au/edition1/?q=content/home-page>
- Plett JM, Martin F (2012). Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant Signal Behav.* 17:12_5. doi:10.4161/psb.7.1.18357
- Ragonezi C, Klimaszewska K, Castro MR, Lima M, de Oliveira P, Zavattieri MA (2010) Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors. *Trees* 12/2010; 24(6):975-992. doi:10.1007/s00468-010-0488-8
- Ragonezi C, Caldeira AT, Martins MR, Dias LS, Santos-Silva C, Ganhão E, Miralto O, Pereira I, Louro R, Klimaszewska K, Zavattieri A. (2012) *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert improves growth of adventitious roots and acclimatization on *in vitro* regenerated plantlets of *Pinus pinea* L. *Propag Ornament Plants* 3(12):139-147.
- Ragonezi C, Teixeira D, Caldeira AT, Martins MR, Santos-Silva C, Ganhão E, Klimaszewska K, (2013) O-coumaric acid ester, a potential early signaling molecule in *Pinus pinea* and *Pisolithus arhizus* symbiosis established *in vitro*. *J Plant Interact* 10/2013; 9(1). doi:10.1080/17429145.2013.831489
- Read DJ (1999) Mycorrhiza. The state of art. In Varma A & Hock B eds. *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 3-36
- Richaud F, Aubry C, Beyou A, Boulanger F, Estramareix C, Fleury-Guerout AM, Mignotte C, Reyes O (1987) The *Agrobacterium Rhizogenes* Root-Inducing System. In Verna DPS et al. eds. *Molecular genetics of plant-microbe interactions; Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Martinus Nijhoff Publisher, vol 3, pp 6-10.
doi:10.1007/978-94-009-4482-4_2
- Saharan BS, Nehra V (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research. Aston Journal*, vol. 21, pp 1-30
- Sarmast MK, Salehi H, Khosh-Khui M (2012) *In vitro* rooting of *Araucaria excelsa* R.Br. Var. *Glauca* using *Agrobacterium rhizogenes*. *JCEA* 13(1)123-130 doi:10.5513/JCEA01/13.1.1024
- Scagel CF (1994) Mediation of Conifer Root Growth by Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Regulators. PhD Thesis, Oregon State University, United States.
- Schmulling T, Shell J, Spena A (1988) Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *Embo J.* 7(9):2621-9.
- Schrey SD, Erkenbrack E, Früh E, Fengler S, Hommel K, Horlacher N, Schulz D, Ecke M, Kulika, Fiedler HP, Hampf R, Tarkka MT (2012) Production of fungal and bacterial growth modulating secondary metabolites is widespread among mycorrhiza-associated streptomycetes. *BMC Microbiol* (2)12:164. doi: 10.1186/1471-2180-12-164.
- Seddas P, Gianinazzi-Pearson V, Schoefs B, Küster H, Wipf, D, Balu F (2009) Communication and signaling in the plant–fungi symbiosis: The mycorrhiza. In Baluška F eds. *Plant-Environment Interactions. Signaling and Communication in Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 45-71
- Shishido M, Massicotte HB, Chanway CP (1996) Effect of plant growth promoting *Bacillus* strains on pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection. *An Bot-London*, 77: 433-441,
- Smith RH (2013) *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press.

- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007a) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:425–448
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y (2009) Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. In Kader J-C & Delseny M series eds. *Advances in Botanical Research* vol. 51, pp 283-320
- Taylor AFS, Alexander I (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19(3):102-112 [doi: http://dx.doi.org/10.1017/S0269915X05003034](http://dx.doi.org/10.1017/S0269915X05003034)
- Taylor AFS, Gebauer G, Read DJ (2004) Uptake of nitrogen and carbon from double-labelled (¹⁵N and ¹³C) glycine by mycorrhizal pine seedlings. *New Phytol* 164:383–388
- Tepfer D (1983) The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. In Pühler A ed. *Molecular Genetics of the Bacteria Plant Interaction*, Springer-Verlag, Berlin, pp 248–258
- Tzfira T, Yarnitzky O, Vainstein A, Altman A (1996b) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer in *Pinus halepensis* Mill. *Plant Cell Rep* 16(1-2):26-31.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4 (article 356): 1-19
- Veena V and Taylor CG (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cel Dev Biol – Plant* 43(5): 383-403
- Villalobos-Amador E, Rodríguez-Hernández G, Pérez-Molphe-Balch E (2002) Organogenesis and *Agrobacterium rhizogenes*-induced rooting in *Pinus maximartinezii* Rzedowsky and *P. pinceana* Gordon. *Plant Cell Rep* 20(9):779-785
- Von Arnold S, Ericksson T (1981) *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59:870-874.
- Von Arnold S, Egertsdotter U, Ekberg I, Gupta P, Mo H, Nørgaard J (1995) Somatic Embryogenesis in Norway Spruce (*Picea Abies*). In Jain S, Gupta P & Newton R eds. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Kluwer Academic Publishers, vol 3, pp 17-36
- Vonderwell JD, Enebak SA, Samuelson LJ (2001) Influence of two plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly pine root respiration and IAA activity. *For Sci* 47(2):197–202.
- Wagner AM, Fisher JT, Fancher GA (1989) Vegetative Propagation of 10-Year-Old Blue Spruce by Stem Cuttings. Paper presented at the Intermountain Forest Nursery Association Meeting. Bismarck. N.D. 1989)
- Wallander H (2000) Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonized by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 218:249–256.
- White F, Garfinkel D, Huffman G, Gordon M, Nester E (1983) Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature* 301:348–350
- White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1985) Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 164:33-44.
- Yibrah HS, Grönroos R, Lindroth A, Franzén H, Clapham D, Von Arnold S (1996) *Agrobacterium rhizogenes* - mediated induction of adventitious rooting from *Pinus contorta* hypocotyls and the effect of 5-azacytidine on transgene activity. *Trans Res* 5(2)75-85
- Zahir A, Arshad M, Frankenberger Jr WT (2003) Plant growth promoting rhizobacteria: Applications and perspectives in agriculture. *Adv Agron* 81:97-168
- Zaspel I, Edwal D (1999) Promotion of root development and root growth of forest plants by rhizobacteria. http://www.abitep.de/tl_files/content/pdf/Anwendung_Agrar/Zaspel-root-development-forest-plants-by-rhizobacteria.pdf