

**Relatório de Consultadoria Técnico-Científico**  
**INNEA-Alternativas Biotecnológicas**  
**Valladolid, Espanha**

**Maria Amely Zavattieri**

**Departamento de Biologia**  
**Universidade de Évora**  
**Fevereiro, 2018**

## Índice

<b>1.1 Local da consultadoria</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Objetivos da visita</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Micropropagação do pinheiro manso</b>	<b>4</b>
<b>1.4 A enxertia do pinheiro manso</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Outras espécies</b>	<b>6</b>
<b>1.6 A visita em imagens</b>	<b>7</b>
<b>1.7 Bibliografia</b>	<b>7</b>

# Relatório

## Consultadoria Técnico-Científica ao Laboratório INNEA, Alternativas Biotecnológicas

### 1.1 Local da consultadoria

Entre os dias 30 de janeiro e 4 de fevereiro de 2018 foi realizada uma consultadoria técnico-científica a empresa espanhola INNEA Alternativas Biotecnológicas, com sede social na cidade de Valladolid, Espanha. Esta empresa consta de um laboratório de cultura *in vitro* de espécies lenhosas na localidade de Dueñas, Palencia, onde efetivamente decorreram os trabalhos. (Ver anexos 1 e 2).

### 1.2 Objetivos da visita

O objetivo da visita foi prestar um serviço de consultadoria na cultura *in vitro* de espécies lenhosas de interesse comercial para esta empresa espanhola, particularmente na micropropagação do pinheiro manso (*Pinus pinea* L.), pino piñonero em Espanha. O convite foi efetuado pela experiência da equipe da Universidade de Évora na organogénese de pinheiro manso a partir de cotilédones de sementes maduras e a micorrização *in vitro* com fungos ectomicorrízicos. Estes trabalhos que decorreram por mais de uma década, contaram com a dedicação de uma numerosa equipa de investigação, formada por docentes do Departamento de Biologia (Professores Amely Zavattieri, Celeste Santos Silva, Luís Silva Dias, Paulo de Oliveira e Isabel Pereira<sup>†</sup>) e do Departamento de Química (Professores Ana Teresa Caldeira, Rosário Martins, Dora Teixeira), do aluno de doutoramento Rogério Louro, dos doutores Carla Ragonezi e Mário Rui Castro, técnicos superiores do Departamento de Biologia (Otília Miralto e Elsa ganhão) e consultora externa Krystyna Klimaszewska do Forest Service, Canada, e vários alunos de licenciatura. Este longo trabalho que, entre outros logros, deu origem a uma patente nacional (PT 105239, INPI) de grande interesse para aplicação em co-culturas plantas-fungos e para a realização de diversos estudos bioquímicos das relações plantas simbióticas, recebeu reconhecimento internacional, em este caso particular foi um convite para realizar uma consultadoria numa empresa do setor da produção de plantas.

### 1.3 A micropropagação do pinheiro manso

Atualmente Espanha conta com 5 clones de pinheiro manso (*Pinus pinea* L.) certificados (plantas de qualidade superior, ou *elite*) e que representam o único material que pode ser certificado. No entanto, os protocolos para a multiplicação massal de plantas selecionadas desta espécie são escassos, tanto em Espanha como no resto dos países mediterrânicos. A maior parte dos trabalhos de micropropagação de pinheiro manso foram realizados alguns anos atrás<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup> em Portugal, Espanha e Itália, fundamentalmente onde esta lenhosa tem interesse comercial (pela produção de pinhões e de resina ou pela sua aplicação paisagístico-ornamental).

Uma grande parte dos trabalhos de micropropagação desta espécie foram abandonados pela dificuldade da fase de enraizamento das micro-plantas tanto *in vitro* com *ex-vitro*. No caso do grupo de investigação da Universidade de Évora, conseguimos ultrapassar estas dificuldades pela utilização de fungos ectomicorrízicos colocados na cultura *in vitro* juntamente com as micro-plantas de pinheiro manso durante a última fase de enraizamento (chamada fase de alongamento). A presença dos fungos na capa superior dos meios de alongamento radicular, possibilita o crescimento sustentado das raízes do pinheiro manso e consegue-se a posteriori, na fase de aclimação, a micorrização destas plantas provenientes da dupla-cultura *in vitro* planta-fungo<sup>8,9,10</sup>. No laboratório da INNEA existe a possibilidade de avançar com a micorrização do pinheiro manso com fungos que apresentam uma mais-valia do ponto de vista comercial como boletus ou tortulho (*Boletus edulis*) também conhecido internacionalmente como “porcini” (em Itália) e com miscalos ou niscalos (*Lactarius deliciosus*).

São muitos os fatores que influenciam a micorrização mediada pelo homem, seja em coníferas ou em outras espécies lenhosas. Entre eles podem citar-se, o isolamento do inóculo, a certificação de pureza do mesmo e a sua identificação que hoje em dia preferencialmente se faz recorrendo a técnicas moleculares, a preparação do inóculo, a escolha e a preparação do substrato, ou dos meios de dupla fase no caso que a primeira fase se realize *in vitro*, etc.

Um outro fator, atualmente de grande utilidade são as bactérias associadas as micorrizas e que contribuem para o processo de micorrização<sup>11</sup>. As bactérias podem melhorar o processo de duas formas: ajudando para que a micorrização ocorra, e então chamam-se de *Mycorrhization helper bacteria* ou aumentando a taxa de micorrização interna na planta e neste caso chamam-se de *Mycorrhiza helper bacteria*. Nos dois casos a denominação internacional é MHB<sup>12</sup>. Para estes casos de biotização mais complexa com MHB foram propostos a empresa programas de Cooperação, tanto na seleção das micorrizas a campo, a obtenção de culturas puras, sua

classificação molecular antes e após o estabelecimento das micorrizas em substratos durante a fase de aclimação em estufas. Só assim, será possível vender clones certificados e micorrizados, com garantia.

Durante a estadia foram colocados explantes em cultura (cotilédones de sementes maduras) em meio de cultura, este trabalho foi realizado com o objetivo de transferir conhecimentos das etapas de preparação das sementes, da metodologia da desinfecção das mesmas, extração em ambiente estéril dos cotilédones (entre 12 a 14) e colocação em meio de indução de rebentos (ver fotos no ponto 1.6)

#### **1.4 A enxertia do *Pinheiro manso***

Durante a estadia no Laboratório INNEA um dos temas mais abordados foi o material e o *timing* na enxertia do pinheiro. Os produtores de pinhas na europa mediterrânica reconhecem as vantagens da enxertia dos pomares de pinheiro manso. Em Portugal, os trabalhos de enxertia mais relevantes, pertenceram sem dúvida, as investigadororas Eng. Margarida Hall d'Alpuim da Estação Florestal Nacional em Oeiras, a Eng. Maria Augusta Vacas de Carvalho da Direção Regional de Recursos Florestais e a Eng. Alexandra Neves Carneiro, da Estação Florestal Nacional. Com elas tive a oportunidade de trabalhar no Projeto PAMAF 2090 para a melhoria da produção de pinhão em Portugal. Um manual completo de enxertia em pinheiro manso foi publicado por estas investigadororas, sendo até a atualidade, se não o único, o mais completo manual em enxertia de *Pinus pinea* em Portugal<sup>13</sup>.

No entanto, é demanda da empresa INNEA, uma enxertia durante a fase da cultura *in vitro in vitro*, técnica chamada de micro-enxertia (*micro-grafting*) ou em plantas clonais muito jovens (um ano de idade aproximadamente) derivadas da cultura *in vitro* e preferencialmente micorrizadas. A técnica de micro-enxertia tem sido aplicada em várias coníferas e outras espécies lenhosas com maior ou menor sucesso<sup>14,15</sup>. No laboratório de biotecnologia da Universidade de Évora, foram realizadas micro-enxertias *in vitro* na videira (Micropropagation techniques applied to vine (*Vitis vinifera* L. por João Manuel Evaristo Duarte Martins, 1993 trabalho final do curso de engenharia agrícola).

No pinheiro manso, os investigadores que desenvolveram esta tecnologia enxertando rebentos fasciculares em hipocótilos de sementes germinadas foram as equipes das Universidades de Oviedo e de León dirigidos pelo Professor Ricardo Ordás<sup>16</sup>. Segundo esses autores, os resultados obtidos com rebentos fasciculares (gomos fasciculares) foram semelhantes a aqueles obtidos

usando meristemas apicais como em *Larix*<sup>17</sup> e em *Picea*<sup>18</sup>. A utilização destes rebentos tem a vantagem que os mesmos são abundantes na planta (e podem ser induzidos em plantas muito jovens provenientes de semente) e são fáceis de manipular. No entanto, Ordás et al., 2004, referem que a micro-enxertia não é prática para ser usar em grande escala<sup>19</sup>. Pode, no entanto, ser útil quando ligada a programas de melhoramento e seleção, especialmente para estabelecer campos clonais de ensaio e pomares de sementes. Esta tecnologia, segundo Ordás et al., 2004 é muito interessante para avaliar rapidamente a interação entre porta-enxerto e enxerto. No entanto, será necessário investir um certo tempo ainda na investigação, para que a técnica de micro-enxertia possa render os seus frutos ao nível de uma produção numerosa e economicamente rentável para uma empresa e convirá sempre fazer contas entre o número de horas que o pessoal treinado utilizou nas micro-enxertias, a percentagem de enxertos “pegados”, os recursos empregues, e a rentabilidade destas plantas para o viveirista. As micro-enxertias é uma outra área de possível cooperação entre a UE e o INNEA.

### **1.5 Outras espécies**

O laboratório INNEA sendo um Laboratório de Soluções Biotecnológicas, realiza como o seu nome o indica, uma serie de culturas *in vitro* de outras espécies de interesse comercial. Na maioria destas culturas se verificam condições ótimas e com possibilidades de êxito no futuro próximo. No entanto, existem ainda questões técnicas que abordar em algumas delas, como são as oxidações e a presença de contaminantes internos ou endógenos. No primeiro caso aparece uma área castanha á volta da explante, as poucas horas de serem colocados em cultura. Esta oxidação dos tecidos lenhosos produzidos pela acumulação de compostos fenólicos, se não é controla termina matando as explantes. Na minha experiência com lenhosas, no INTA de Bella-Vista, Corrientes, Argentina, durante uma estadia em 2016, tive graves problemas de oxidação ao colocar em cultura rebentos de duas espécies: *Corymbia citriodora* e *Grevillea robusta*<sup>19</sup>. No entanto, e como acontece na oliveira (trabalhos ainda não publicados) algumas das bactérias endógenas em associação com as plântulas em cultura *in vitro* são bactérias fixadores de nitrogênio e pelo tanto altamente benéficas. Pelo que, sempre é conveniente nas culturas que apresentam estes contaminantes fazer-se um estudo para caracterizar o mais pormenorizadamente possível estes contaminantes endógenos.

## 1.6 A visita em imagens

Devido as restrições impostas pelos laboratórios comerciais em geral, e o INNEA não é uma exceção, não foi possível fazer imagens durante a minha estadia, nem das instalações, nem das culturas propriamente ditas.

## 1.7 Bibliografia

1. Ordás RJ., Alonso P., Cuesta C., Cortizo M., Rodríguez A., Fernández B (2007) Micropropagation of *Pinus pinea* L. Book chapter: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. DOI 10.1007/978-1-4020-6352-7\_4.
2. Cortizo M., de Diego N., Moncaleán P., Ordás RJ (2009) Micropropagation of adult Stone pine (*Pinus pinea* L). *Trees* 23 (4): 835-842.
3. Alonso P., Moncaleán P, Fernández B, Rodríguez A., Centeno ML, et al. (2006) An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). *Annals of Forest Science*, 63 (8):879-885.
4. Sul I-W., Korban SS (2004) Effect of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regulation* 43 (3): 197-205.
5. Capuana M., Giannini R. (1995) In vitro plantlet regeneration from embryogenic explants of *Pinus pinea* L. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. *Plant*, 31 (4): 202-206. URL: <http://www.jstor.org/stable/4293093>
6. Valdés AE., Ordás RJ., Fernández B., Centeno ML. (2001) Relationships between hormonal contents and organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39 (5): 377-384. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01253-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01253-0)
7. Moncaleán P., Alonso P., Centeno ML., Cortizo M., Rodríguez A., Fernández B., Ordás RJ. (2005) Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiology*, 25: 1–9. Heron Publishing—Victoria, Canada
8. Ragonezi C., Caldeira AT., Martins MR., Santos-Silva C., Ganhão E., Miralto O., Pereira I., Louro R., Klimaszewska K., Zavattieri MA (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.

9. Ragonezi, C.; Caldeira, A.T.; Martíns, 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.
10. Ragonezi C., Caldeira AT., Martins MR., Teixeira D., Silva Dias L., Miralto O., Ganhão E., Klimaszewska, K., Zavattieri A (2012) Micropropagation of recalcitrant pine (*Pinus pinea* L.) an overview of the effect of ectomycorrhizal inoculation. Oral presentation Micropropagation of recalcitrant pine (*Pinus pinea* L.). In Second International Conference of the IUFRO Working Party. Brno, Czech Republic. Session 2. Other propagation Techniques.
11. Mediavilla O., Olaizola J., Santos-del-Blanco L., Oria-de-Rueda JA., Martín-Pinto P (2016) Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula. *Mycorrhiza*, 26:161-168
12. Garbaye J (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128: 197-210.
13. Carneiro NA., Hall d’Alpuim, M., Vacas de Carvalho M (2007) Manual ilustrado. Enxertia do Pinheiro manso. Edição Estação Florestal Nacional. Quinta do Marquês, Oeiras, Portugal. URL: <http://www.iniap.min-agricultura.pt/>
14. Fraga M., Cañal MJ., Aragonés A., Rodríguez R (2002) Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting, *Annals of Forest Science*, 59:155–161
15. Ewald D., Kretschmar U (1996) The influence of micrografting in vitro on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44: 249–252.
16. Cortizo M., Alonso P., Fernández B., Rodríguez A., Centeno ML., Ordás RJ (2004) Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. *Annals of Forest Science*, 61: 843-845 INRA, EDP Sciences 2005 DOI 10.1051/forest:2004081
17. Ewald D., Kretschmar U (1995) The influence of micrografting in vitro on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 44: 249–252.
18. Monteuis O (1994) Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*, *Silvae Genetica* 43:91–95.
19. Zavattieri MA (2015) Relatório de Atividades. Sabática 2015. Departamento de Biologia. Universidade de Évora, 78 páginas.

<https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/17803/1/RELAT%C3%93RIO%20DE%20ACTIVIDADES%20-%20Sab%C3%A1tica%202015.pdf>

## **ANEXO 1**

## CARTA DE INVITACIÓN

UNIVERSIDADE DE EVORA

En Valladolid, a 18 de Enero de 2018

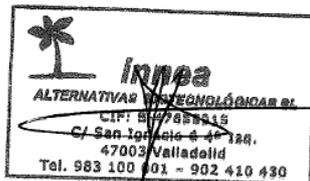
Estimados Señores:

Mediante el presente escrito, nos complace invitar a la Dra. Amely Zavattieri a nuestro laboratorio de cultivo in vitro para desarrollar conjuntamente la coordinación de un nuevo proyecto basado en establecer las pautas de micropropagación mediante organogénesis de unos clones de Pinus Pinea

Dicha colaboración esta prevista durante la semana que transcurre entre los días 29 de enero y 4 de febrero en nuestro laboratorio ubicado en la localidad de Dueñas – Palencia.

Les agradecemos su atención y quedamos a su disposición para cuantas cuestiones consideren necesario plantearnos.

Atentamente,



**Luis Grimal**  
**INNEA, Alternativas Biotecnológicas SL**  
**C/ San Ignacio 6, 4º Izq.**  
**47003 Valladolid**  
**tel: +34 / 983 100 001**  
**tel: +34 / 902 410 430**  
**[lcgrimal@gmail.com](mailto:lcgrimal@gmail.com)**

ANEXO 2

Valladolid, Lunes 5 de febrero de 2018

Por la presente declaro que la Dra. Maria Amely Zavattieri investigadora de la Universidad de Évora, Portugal realizó una visita de trabajo a nuestro laboratorio comercial de cultivo in vitro en Dueñas, Palencia entre los días 29 de Enero y 4 de Febrero.

Durante estos días la Dra. Zavattieri realizó un trabajo de consulting técnico-científico específicamente en un proyecto que lleva la empresa en la micropropagación de pino piñonero.

Por otro lado, se estudiaron las posibilidades futuras de cooperación en la multiplicación in vitro y utilización de técnicas de Biotización para aumentar el valor biológico y comercial de especies leñosas de interés comercial en España

Sin otro particular los saluda atentamente



Luis Carlos Iglesias

Gerente

Innea Alternativas Biotecnológicas SL