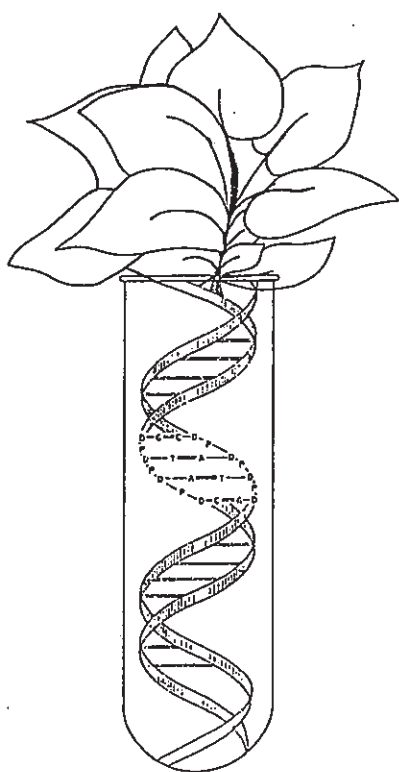


A PROPAGAÇÃO DE PLANTAS POR SISTEMAS *IN VITRO*

José C. Gonçalves *



Em 1927, Went conseguia isolar a primeira das várias substâncias de natureza auxínica, que promovem crescimento celular. Quimicamente, identificou-se como sendo ácido 3-indol acético e logo que se começaram a verificar os efeitos desta substância nos tecidos vegetais, três autores, White, Nobécourt e Gautheret publicaram em 1939, independentemente, resultados obtidos na cultura de tecidos vegetais *in vitro* por longos períodos de tempo, sendo estes trabalhos considerados como pioneiros. Desde então, o ritmo das descobertas foi sendo cada vez maior.

Em 1955, Miller, Skoog e colaboradores conseguem isolar e identificar a substância constituinte do leite de coco que tão extraordinários resultados estava a permitir obter e à qual foi dado o nome de cinetina (Miller *et al.*, 1955).

Os numerosos ensaios de associação de auxinas com citocininas e a apresentação de novas formulações nutritivas cada vez mais adaptadas às necessidades fisiológicas das células vegetais propostas, entre outros, por Heller (1953), Murashige e Skoog (1962), Schenk e Hildebrandt (1972) e Greshoff e Doy (1972), permitiram que fosse possível estabelecer *in vitro*, uma cada vez maior diversidade de células, tecidos e órgãos pertencentes a diferentes espécies.

Estas técnicas foram rapidamente aplicadas a estudos de morfogénese, permitindo a comparação do desenvolvimento da estrutura da planta obtida *in vitro* com o da planta crescendo em ambiente natural e, como tal, significativos acréscimos do conhecimento nas áreas de histogénese e organogénese. Com base nestes estudos, cedo se verificaram as potencialidades destes sistemas de regeneração *in vitro* na propagação de plantas, o que mais tarde se viria a chamar de micropropagação ou propagação *in vitro*. A sua primeira aplicação com grande sucesso foi feita por Morel (1964), para a obtenção de plantas isentas de vírus e propagação clonal de orquídeas.

Foi com base na utilização dos diferentes sistemas de cultura de tecidos que foi possível aprofundar e obter novas linhas de investigação. Assim, as culturas de *calli*, que podem ser obtidas quer directamente dos explants iniciais, quer de células já em cultura, são hoje utilizadas como excelentes meios para obtenção de organogénese indirecta (George e Sherrington, 1984; Pierik, 1987), de rebentamento adventício, quer por embriogénese somática quer por cultura de células em suspensão; são um extraordinário meio no campo do melhoramento, através da obtenção de variabilidade somaclonal (Ahuja, 1987), tendo ainda aplicação no campo da fisiologia, patologia e criopreservação.

A cultura de células em suspensão é hoje utilizada para a produção de metabolitos primários e secundários de grande aplicação industrial; é, teoricamente, um extraordinário sistema para propagação de plantas em larga escala; no campo da fisiologia permitiu

Os princípios fundamentais que suportam a possibilidade de cultivar tecidos vegetais em condições artificiais estão contidos na teoria celular proposta por Schleiden e Schwann. De facto, postula esta teoria que a célula vegetal tem capacidade de autonomia e mesmo de totipotência e, como tal, capacidade de regenerar até se obter uma nova planta completa.

A primeira tentativa de cultivar células e/ou tecidos vegetais surgiu com Haberlandt, em 1902. Embora não tenha sido bem sucedido, este investigador é hoje considerado como o fundador da cultura de tecidos vegetais em meios de cultura artificiais.

estudar o comportamento da célula isolada, sendo assim quebradas todas as interações a nível tecidual; no campo da patologia tornou possível o estudo da interação parasita célula ao nível da acção de toxinas nas membranas e organitos, em ambiente controlado e livre de qualquer outro contaminante.

A cultura de protoplastos tem permitido uma elucidação na especificidade e modo de acção de fungos e bactérias no metabolismo celular, em particular nas bases genéticas da resposta de resistência ou de susceptibilidade das plantas a um factor específico, já que a parede celular, que por vezes pode ser impeditiva dessa relação, está ausente. Estes sistemas têm permitido ainda significativos avanços no campo da genética e melhoramento, já que por fusão é possível a obtenção de híbridos somáticos, com a consequente supressão de barreiras de incompatibilidade sexual, permitindo a obtenção de novas espécies aloplóides. Os sistemas de protoplastos constituem ainda um óptimo sistema para aplicação da tecnologia de DNA recombinante e consequente obtenção de plantas transformadas (Lindsey e Jones, 1989).

A cultura de anteras e/ou grãos de pólen tem sido um sistema utilizado cada vez com maior êxito, para a produção de linhas homocigóticas por duplos haplóides e mesmo para a obtenção de plantas haplóides por androgénese, com grande aplicação em programas de melhoramento.

Todos os sistemas atrás referidos podem ser considerados como sistemas de cultura desorganizados (George e Sherrington, 1984), já que em todos eles as células passam por uma fase de desdiferenciação, aumentando o volume tecidual com total ausência de estruturas organizadas e contendo apenas um limitado número de diferentes células especializadas. Ao contrário, os sistemas de cultura organizados, baseiam-se na continuidade do crescimento e preservação das estruturas histológicas já existentes, dependendo exclusivamente do tipo de estrutura em cultura e do tipo de pré-determinação genética que as células receberam (George e Sherrington, 1984).

A cultura de órgãos determinados, isto é, que estão destinados a possuir um tamanho e forma definidos, tais como folhas, flores e frutos, têm permitido o estudo de efeitos de reguladores de crescimento no desenvolvimento

destes órgãos, mas é, sem dúvida, a cultura de órgãos com crescimento indeterminado, ou seja, cujo crescimento é potencialmente ilimitado, tais como tecidos meristemáticos apicais de caules ou de raízes, que maior aplicação e impacto tem provocado na propagação vegetativa.

De especial importância se reveste a utilização de meristemas e ápices caulinares, já que são o sistema até hoje mais utilizado na propagação vegetativa, e isto porque apesar de todos os sistemas já referidos permitirem a regeneração de plantas completas, a propagação *in vitro* por gomos apicais e/ou axilares apresenta os mais baixos níveis de variabilidade genética, garantindo assim uma elevada manutenção da estabilidade genotípica e, conseqüentemente, fenotípica, dos indivíduos assim obtidos, embora as taxas de multiplicação sejam, em geral, inferiores aos sistemas que fazem uso de culturas desorganizadas. Dois tipos de cultura têm sido utilizados, dependendo do tamanho do explant inicial. Assim, a cultura de meristemas consiste na utilização da extremidade do ápice, constituído exclusivamente por células meristemáticas, com dimensão entre 0.2 e 1 mm, e é de grande aplicação na obtenção de plantas isentas de vírus (Boxus e Druart, 1986); a cultura de ápices caulinares consiste na utilização de explants iniciais com dimensões que podem ir até aos 10 mm de comprimento. Se as condições de cultivo forem as indicadas para a espécie, ambos os tipos de cultura vão permitir o desenvolvimento de pequenos rebentos. Com tratamentos apropriados, os rebentos assim obtidos podem ser induzidos a desenvolver raízes, concluindo-se assim a obtenção da planta completa, ou podem ser utilizados como fonte de obtenção de explants secundários, para assim aumentar o número de rebentos disponíveis para enraizamento e posterior aclimatização.

De acordo com a terminologia proposta pela Associação Internacional de Cultura de Tecidos, entende-se por micropropagação ou propagação *in vitro*, a propagação de plantas em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando contentores de plástico ou vidro, com manipulação em condições assépticas (IAPTC, 1985).

Foram os trabalhos de Murashige (1974)

e posteriormente de Debergh e Maene (1981) que estabeleceram os princípios gerais de um sistema de micropropagação, tendo sido definidas cinco fases:

Fase 0: Seleção da planta mãe e preparação do explant.

Envolve toda a fase de manipulações do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*. Nesta fase incluem-se os pré-tratamentos do material vegetal e sistemas de desinfeção, tornando-se fundamental o controlo de factores como a idade e estado fisiológico da planta mãe, idade e posição do tecido ou órgão na planta, constituição genética, entre outros.

Fase 1: Estabelecimento de uma cultura asséptica.

Inclui o isolamento do explant e sua colocação em condições assépticas no meio de cultura.

Fase 2: Fase de multiplicação.

De acordo com a metodologia utilizada, o principal objectivo é conseguir propagar sem perda de estabilidade genética, tendo como factores mais importantes para o sucesso a formulação dos meios de cultura e as condições físicas do ambiente de crescimento.

Fase 3: Preparação para o crescimento em ambiente natural.

Inclui a formação de raízes adventícias, quer *in vitro* quer *in vivo*, podendo haver necessidade de uma fase prévia de alongamento dos rebentos obtidos na fase 2.

Fase 4: Transferência para o ambiente natural.

São determinantes nesta fase todo um conjunto de factores físicos, tais como luz, humidade e temperatura, que devem ser alterados de forma gradual a fim

de permitir à planta a sua autossuficiência fotossintética.

Teoricamente, são vários os métodos hoje disponíveis para desenvolver sistemas de propagação *in vitro* (Fig. 1). Entre eles podemos referir os sistemas de rebentamento axilar, utilizando como explant primário meristemas, ápices caulinares ou gomos

próprios propágulos de multiplicação, pelo que se conseguem obter números elevados de plantas em áreas reduzidas; iv) a propagação é executada em condições assépticas, livre de agentes patogénicos; v) utilizando metodologias apropriadas, nomeadamente a cultura de meristemas, é possível a obtenção de plantas isentas de vírus;

formulações nutritivas, nomeadamente concentração iónica total, balanços NH_4^+ / NO_3^- e K^+/Ca^{++} e potenciais osmóticos; iv) formação de *calli* como resultado de elevadas concentrações de citocininas e/ou auxinas; v) possíveis diferenças de comportamento genótipo-dependentes.

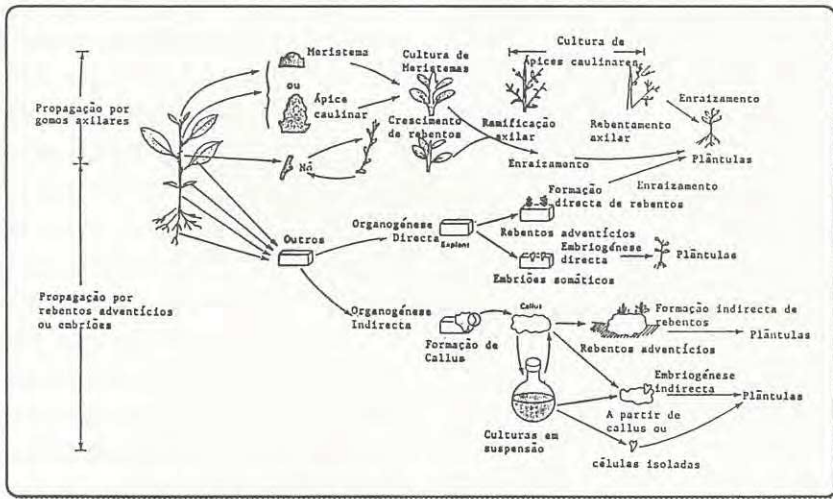


Fig. 1 - Principais métodos de micropropagação. (Adaptado de George e Sherrington, 1984)

nodais; sistemas de organogénese e/ou embriogénese directa, isto é, directamente do explant; e, também, por organogénese e/ou embriogénese indirecta, isto é, passando por uma fase de *calli*, podendo depois estes *calli* serem também utilizados para obtenção de culturas de células em suspensão e de protoplastos com posterior regeneração da planta completa.

Estes sistemas têm vindo a obter uma cada vez maior aplicação, quer em espécies herbáceas, quer em espécies lenhosas e o facto de se assistir a uma cada vez maior utilização e aplicação generalizada dos sistemas de propagação em geral e de clonagem em particular, segundo metodologias *in vitro*, é testemunho mais do que suficiente para demonstrar as inúmeras vantagens potenciais. Dentro delas podemos referir:

- i) a propagação *in vitro* é mais rápida do que a propagação *in vivo*;
- ii) é possível propagar algumas espécies *in vitro* as quais são difíceis ou mesmo impossíveis de propagar *in vivo*;
- iii) as culturas são iniciadas por explants de reduzidas dimensões, bem como os

- vi) como resultado do controle de vários factores, tais como, nutritivos, hormonais e físicos, o efeito das estações do ano pode ser eliminado e, como tal, a produção pode ser contínua;
- vii) a obtenção de plantas enraizadas com o seu próprio sistema radicular torna desnecessário, se for caso disso, o recurso à enxertia;
- viii) as plantas não necessitam de cuidados entre os subcultivos;
- ix) para o melhorador é todo um campo de potenciais aplicações, permitindo a obtenção de resultados que, pelos métodos clássicos, eram impossíveis ou de obtenção lenta e difícil.

Vários são os factores que influenciam o processo de formação de novos rebentos, dos quais podemos referir os seguintes:

- i) influência do número de subcultivos no processo de desenvolvimento das culturas;
- ii) necessidades variáveis de citocininas, com ou sem auxinas, na fase de multiplicação, de acordo com o objectivo pretendido;
- iii) características físicas e qualitativas das

Após a fase de multiplicação (Fig 2), torna-se necessário preparar os rebentos obtidos em ambiente artificial e heterotrófico dos tubos de ensaio, para a sua sobrevivência em ambiente natural e já obrigatoriamente autotróficos. Esta fase, para além de envolver um período de enraizamento (Fig 3), já que são raros os casos em que a rizogénese ocorre simultaneamente com a multiplicação, envolve ainda toda uma alteração no comportamento fisiológico da jovem planta, nomeadamente o estimular da função fotossintética, absorção de água e outros nutrientes através do seu sistema radicular, resistência à desidratação e agentes patogénicos. Apesar dos muitos progressos já obtidos, a fase de enraizamento permanece como uma das mais difíceis na propagação de espécies lenhosas (Németh, 1986). As metodologias possíveis de utilizar para induzir rizogénese são basicamente duas:

- i) os rebentos individualizados podem ser colocados directamente num substrato de enraizamento natural, sob nebulização e elevada taxa de humidade, tendo o processo de rizogénese sido previamente



Fig. 2 - Fase de multiplicação.

estimulado por imersão basal do rebento em soluções hormonais de concentração e em tempos variáveis de acordo com as espécies, geralmente designado por enraizamento *in vivo*;

ii) os propágulos ou rebentos individualizados podem ser colocados em novo meio de cultura sintético, esterilizado, com omissão de citocininas e incremento da concentração de auxinas e, em particular nas espécies lenhosas, com redução das concentrações de macronutrientes do meio de cultura.

Esta última metodologia, de acordo com as espécies e mesmo clones, pode ser favorecida se for utilizado ou adicionado meio líquido, bem como utilização de dois tempos na rizogénese, um de indução, com os rebentos ou propágulos em contacto com o meio com auxinas durante período de tempo variável e um de alongamento, por posterior transferência para um meio livre de auxinas.



Fig. 3 - Fase de preparação para o crescimento em ambiente natural que inclui a formação de raízes adventícias.

A fase de transplante e aclimatização é, também, uma fase crítica em todo o processo (Fig. 4). E isto porque um fraco desenvolvimento da cutícula das plantas, associado a um deficiente funcionamento dos estomas, se tornam numa das principais causas de desidratação nas primeiras horas de aclimatização. Também as folhas, muito finas, são pouco eficientes fotossinteticamente, já que o seu mesófilo tem poucas e pequenas células a constituir os parênquimas em paliçada e grandes espaços intercelulares; quanto às conexões vasculares entre o sistema

caulinar e radicular, elas são reduzidas, o que dificulta o transporte de translocados xilémicos e floémicos. Para além destas causas, é sabido que muitos sistemas radiculares desenvolvidos *in vitro* não são fisiologicamente activos, verificando-se que mais de 50% destas raízes morrem imediatamente ou então mantêm-se durante a aclimatização sem produzir qualquer crescimento (McClelland *et al.*, 1990).

Assim, todo o processo de transplante e aclimatização deverá desenvolver-se de uma forma gradual e vários são os cuidados a ter presentes, tais como:

- i) os rebentos, já enraizados ou não, devem ser bem lavados, para retirar todos os vestígios de agar e tratados com um fungicida;
- ii) o substrato a utilizar deverá ser previamente esterilizado;
- iii) após a transferência, as plantas devem ser protegidas da desidratação e de

elevadas intensidades luminosas através de nebulização e ensombramento, onde devem permanecer vários dias até funcionamento do sistema radicular e mecanismos fotossintéticos;

iv) uma vez estabelecidas, deverão ser gradualmente sujeitas a redução das taxas de humidade ambiental e a acréscimos da intensidade luminosa, até condições ambientais naturais;

v) necessidade de prevenir ataques fúngicos.

Em relação a esta fase, muitos ainda são os progressos e os desenvolvimentos

a esperar, já que ela é uma fase relativamente cara e muito susceptível de falhas, daí que os grandes laboratórios comerciais estejam constantemente a apresentar inovações que permitam não só uma maior eficácia dos tratamentos, como também uma progressiva automatização de todo o sistema, por forma a diminuir os custos.

Assim, é de esperar, num futuro cada vez mais próximo, o lançamento de novos tipos de substratos e contentores que facilitem todas as operações. Quando tal acontecer, o preço das plantas propagadas *in vitro* certamente que irá descer significativamente, o que tornará estas metodologias não só motivantes como também economicamente rentáveis (Levin e Vasil, 1989).

Segundo Bonga e Durzan, em 1987 eram trabalhadas *in vitro* 122 espécies de 52 géneros, sendo 19 espécies de 7 géneros de 4 famílias de gimnospérmicas e 103 espécies de 45 géneros de dicotiledóneas, dentro das espécies consideradas como lenhosas. Contudo, apenas para um pequeno número destas espécies, se têm já definidas e padronizadas quais as condições ideais subjacentes a todo o processo de regeneração, para a sua produção em massa, a fim de que possa ser avaliada a estabilidade genética e morfogenética dos clones sob condições de campo.

É opinião generalizada que existe uma maior dificuldade no estabelecimento de sistemas de propagação *in vitro* de espécies lenhosas do que de espécies herbáceas. Alguns factores que contribuem para tal são a forte influência genotípica inter e intra-específica no tipo de respostas regenerativas, a contaminação das culturas por agentes patogénicos endógenos, a inibição do crescimento por fenóis e polifenóis libertados pelos explants e, finalmente, a dificuldade no estabelecimento em cultivo de explants provenientes de material com características fisiológicas adultas.

Como consequência da forte influência genotípica, é sabido que para cada uma das espécies que se pretende clonar, se torna necessário desenvolver um sistema específico, isto é, o que resulta bem para uma espécie, pode já não funcionar para outra. E em adição a esta variação interespecífica,

assiste-se ainda, por vezes, a uma forte variação intraespecífica, de clone para clone. Quando se pretendem desenvolver sistemas para diferentes géneros, estas dificuldades surgem com muito mais relevância.

Também a contaminação bacteriana das culturas *in vitro*, logo na fase de estabelecimento, ou posteriormente durante a fase de proliferação, é um grave problema. Tal facto, que pode ser consequência de processos de desinfecção deficientes e, então, há que os corrigir, é muitas vezes resultado de actividade bacteriana endógena, dos próprios tecidos e, como tal, não é possível de eliminar pelos processos de desinfecção normais. Quando tal acontece, há que ter em conta aspectos de sanidade da planta mãe que fornece os explants, ou utilizar sistemas de estabelecimento que diminuam esse risco por exemplo, utilizando como explants meristemas ou ápices meristemático;, sistemas de proliferação que favoreçam o rápido alongamento caulinar, com baixas concentrações de citocininas, ausência de luz entre outros e, se necessário, utilização mista destas metodologias associadas ao emprego de antibióticos no meio de cultura. Nestes casos é sempre aconselhável proceder a indexagens regulares.

O terceiro factor, inibição do crescimento por libertação de fenóis para o meio de cultura pelos explants, não sendo possível de evitar, é no entanto possível de minimizar os seus efeitos. Assim vários sistemas podem ser definidos tendo por base a remoção dos compostos fenólicos do meio de cultura à medida que vão sendo libertados, a alteração do potencial redox ou, ainda, por redução da actividade das fenolases ou dos substratos. Na prática, alguns destes sistemas têm sido conseguidos através da inclusão no meio de cultura de anti-oxidantes, como por exemplo o ácido ascórbico, o ácido cítrico e o hidrócloro de cisteína, ou de substâncias com capacidade de absorção de substâncias fenólicas como o carbono activo ou a polivinilpirrolidina; outra solução consiste na passagem sucessiva do explant por meios líquidos com anti-oxidantes antes de serem colocados no meio de cultura ou, ainda, por transferências sucessivas do explant para novo meio de cultura.

Finalmente, o quarto aspecto referido,

dificuldade de estabelecimento de material vegetal de características adultas é, sem dúvida, o que maiores dificuldades tem levantado aos investigadores, em particular em géneros como *Junglans*, *Castanea* e *Quercus*, entre outros, em que a maturidade é atingida muito tardiamente. Assim, já

apenas de uma actividade meristemática de tecidos juvenis que permanecem na planta (Greenwood, 1986). Espécies como a *Pinus radiata* L., *P. pinaster* L. e *Picea abies* Karst. (St-Claire *et al.*, 1985; Franclet, 1981) nas Gimnospérmicas, têm vindo a ser propagadas com este tipo de material vegetal. Nas



Fig. 4 - Fase de transferência e aclimatização em ambiente natural.

que a clonagem deste material é feita a partir de indivíduos cujas características fenotípicas se manifestam na fase adulta, torna-se necessário utilizar ou desenvolver metodologias que permitam obtenção de material vegetal com características juvenis. No primeiro caso, utilização de material com certas características de juvenidade, é sabido que em muitas espécies o material proveniente dos ramos inferiores, em especial próximos do tronco, são mais juvenis, bem como rebentos ortotrópicos que se originam da base do tronco. Quanto ao segundo caso, utilização de técnicas de rejuvenescimento, pode-se actuar quer ao nível da planta mãe, antes de retirar o explant, quer já após o estabelecimento *in vitro*.

As metodologias mais utilizadas até ao momento têm sido a aplicação de citocininas ao nível da planta ou durante o estabelecimento em cultura, enxertias em série, utilização de rebentos de toixa e podas severas (Greenwood, 1986).

No caso da utilização de rebentos obtidos a partir de toixas e da base do tronco ou resultantes de podas severas, eles têm sido largamente utilizados, apesar de também não se ter ainda perfeito conhecimento se o aspecto juvenil dos rebentos é resultado de um processo de rejuvenescimento ou

Angiospérmicas, também várias são as espécies em que se utiliza este tipo de material vegetal para iniciar sistemas de propagação *in vitro*, como por exemplo castanheiro (Vieitez *et al.*, 1983; Gonçalves, 1990), carvalho (Vieitez *et al.*, 1985) e sobreiro (Manzanera e Pardos, 1990; Gonçalves, 1992).

A acrescentar a estas dificuldades juntam-se outras, comuns a todas as espécies que são propagadas por estas metodologias, tais como: necessidade de equipamento laboratorial especializado, riscos de contaminação que podem inviabilizar grande quantidade de culturas, desenvolvimento de métodos específicos para cada espécie, o tamanho inicial das plantas é muito pequeno, são muito susceptíveis a perdas de água e, para além de não serem fotossinteticamente autosuficientes, algumas metodologias não garantem estabilidade genética. Perante tudo isto é, assim, indispensável, quando se inicia um projecto de multiplicação de plantas por cultura de tecidos, ter em conta os seguintes pressupostos:

- i) possibilidade de obtenção de taxas de regeneração elevadas;
- ii) capacidade das plantas obtidas *in vitro* resistirem ao transplante e desenvolverem

- se no campo, segundo as expectativas ou ainda melhor;
- iii) existir uma certa compatibilidade entre os sistemas adoptados e os sistemas de multiplicação convencionais;
- iv) as características seleccionadas deverão justificar economicamente, ou de qualquer outro modo, o uso de sistemas de propagação por cultura de tecidos.

No entanto, todas as metodologias actualmente em utilização necessitam de ser mais amplamente exploradas, para que a sua efectiva utilidade na micropropagação de plantas lenhosas adultas seja uma realidade. Neste sentido, o potencial das técnicas de embriogénese somática aplicadas a espécies lenhosas tem de ser objecto de intensa investigação. Protocolos completos têm que ser desenvolvidos com um adequado controlo da regeneração da planta, para que a fidelidade genética do genótipo dador possa ser amplamente conservada nos seus propágulos posteriores. Também a engenharia genética poderá contribuir de uma forma decisiva para aumentar a eficiência destas metodologias.

Esta investigação poderá então levar a propagação *in vitro* de espécies lenhosas a tornar-se competitiva face à propagação pelos métodos convencionais, não devendo esquecer que um dos importantes aspectos a ser considerado, em termos de aplicação comercial, é a relação custo/benefício.

De facto, torna-se difícil referir com exactidão os custos de obtenção de plantas quer por via convencional, quer por técnicas *in vitro*, mas é assumido que estas podem apresentar valores superiores da ordem dos 30 a 200 %, não devendo no entanto esquecer que um dos aspectos mais importantes na propagação clonal, é o facto de permitir a multiplicação de novas variedades ou de

genótipos melhorados e a sua introdução no mercado muito mais rapidamente do que através dos métodos convencionais. O ganho potencial também é difícil de determinar, mas os quantitativos do produto economicamente útil, madeira, fruto e óleos, podem também ser significativamente mais elevados no material clonado. No aspecto florestal e tendo em conta o importante aspecto económico a longo prazo, tem sido demonstrado que incrementos de apenas 2 a 3 % podem ter um importante impacto económico (Carlisle, 1971).

BIBLIOGRAFIA

- Ahuja, MR (1987) Somaclonal Variation. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga, JM; Durzan, DJ eds) Vol 1 (pp 272-285) Martinus Nijhoff Pub, Dordrecht.
- Bonga, JM; Durzan, DJ (eds) (1987) *Cell and Tissue Culture in Forestry*. 3 Vol Martinus Nijhoff Pub, Dordrecht (1285p).
- Boxus, P; Druart, P (1986) Virus-Free Trees Through Tissue Culture. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj, YPS ed) Vol 1 (pp 24-30) Springer-Verlag, Berlin.
- Carlisle, A; Teich, AH (1971) The costs and benefits of tree improvement programs. *Can For Serv* 1302.
- Debergh, PC; Maene, L (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci Hort* 14:335-345.
- Francllet, A (1981) Rajeunissement et propagation végétative de lignieux. *Annales Afocel* (Ed.) (pp 12-39).
- George, EF; Sherrington, PD (1984) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd, England (710p).
- Gonçalves, JC (1990) Multiplicação *in vitro* de castanheiro (*Castanea Miller*) por rebentamento axilar. Resumo II Congresso Florestal Nacional (p 74) Porto.
- Gonçalves, JC; Rainho, MCT (1990) Micropropagação de sobreiro (*Quercus suber L.*) por rebentamento axilar. *Proc 2º Enc Montados de Sobre e Azinho* (pp 109-118) Évora.

- Greenwood, MS (1986) Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation* 6:1-12.
- Greshoff, PM; Doy, CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107:161-170.
- Heller, R (1953) Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux *in vitro*. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg* 14:1-22.
- IAPTC (1985) Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. *Newsletter* 45:15-22.
- Lindsey, K; Jones, MGK (eds) (1989) *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press, Milton Keynes (241p).
- Manzanera, JA; Pardos, JA (1990) Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber L.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21:1-8.
- McClelland, MT; Smith, MAL; Carothers, ZB (1990) The effects of *in vitro* and *ex vitro* rooting initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23:115-123.
- Miller, CO; Skoog, F; Von-Saltza, MH; Strong, EM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 77:1392.
- Morel, GM (1964) Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids. *Amer Orch Soc Bul* 33:473-478.
- Murashige, T; Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497.
- Murashige, T (1974) Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev Plant Phys* 25:135-166.
- Németh, G (1986) Induction of Rooting. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj, YPS ed) Vol 1 (pp 49-64) Springer-Verlag, Heidelberg.
- Pierik, RLM (1987) *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Pub, Dordrecht (344p).
- St.-Claire, JB; Kleinschmit, J; Svolba, J (1985) Juvenility and serial vegetative propagation of Norway spruce clones (*Picea abies Karst.*). *Silvae Gen* 42-48.
- Vieitez, AM; Ballester, A; Vieitez, ML; Vieitez, E (1983) *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J Hort Sci* 58(4):457-463.
- Vieitez, AM; San-José, MC; Vieitez, E (1985) *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur L.* *J Hort Sci* 60:99-106.

* Biólogo, Professor Adjunto da ESACB.

No próximo número da **Agroforum**:

A Escola Superior Agrária e o Programa Ciência

A Entomofauna do Castanheiro

Investigação na Escola Superior Agrária de Castelo Branco ...