

Micropropagação do castanheiro

José Carlos Gonçalves, Teresa Coelho e Graça Diogo

Lab. Biologia Vegetal, Escola Superior Agrária de Castelo Branco

email: jcgoncalves@esa.ipcb.pt

Introdução

Os significativos avanços que têm sofrido as técnicas de propagação clonal, muitas vezes impulsionadas por necessidades de multiplicar rapidamente plantas obtidas por melhoramento genético, têm vindo a permitir aplicá-las com êxito a um cada vez maior número de espécies. As razões e as vantagens da multiplicação vegetativa são conhecidas de todos, das quais podemos destacar a manutenção dos clones seleccionados quer pelas suas características produtivas, quer por resistência a doenças, a possibilidade de propagar plantas que não produzem sementes viáveis e ainda pelo facto de permitirem reduzir os períodos de juvenilidade.

A grande maioria, se não a totalidade, das árvores produtoras de fruto, são de natureza alogâmica, isto é, de fecundação cruzada, pelo que a multiplicação vegetativa é a única via possível para assegurar a difusão de material com características geneticamente seleccionadas, quer sejam porta-enxertos, quer sejam novas variedades ou cultivares. Também o castanheiro está incluído neste grupo de espécies vegetais, pelo que a manutenção das características fenotípicas seleccionadas e a redução do período de juvenilidade são factores mais do que determinantes para que a propagação desta espécie para a produção de fruto seja obrigatoriamente feita por via vegetativa. Também na produção de lenho poderão advir significativas vantagens na utilização da multiplicação vegetativa caso existam programas de selecção e melhoramento.

Desde sempre, na Europa, foi utilizado como porta-enxerto das diversas variedades de castanheiro produtor de fruto a própria espécie, a *Castanea sativa* Miller, proveniente da germinação da semente do castanheiro bravo. No entanto, a partir dos finais do séc. XIX e face ao aparecimento da designada doença da tinta, provocada por fungos radiculares do género *Phytophthora* (*P. cinnamomi* Rand e *P. cambivora* (Petri) Buis) para os quais a *C. sativa* se mostrou extraordinariamente sensível, tornou-se necessário utilizar porta-enxertos que mostrassem resistência aos referidos

fungos já que a luta química se revelou muito ineficaz. As primeiras tentativas de resolver o problema tiveram a ver com a possibilidade de identificar indivíduos de *C. sativa* que pudessem apresentar resistência, o que se veio a revelar infrutífero¹. Como tal, recorreu-se depois à utilização das espécies exóticas *C. crenata* (castanheiro japonês) e *C. molissima* (castanheiro chinês) como porta-enxertos, uma vez que estas espécies apresentavam resistência à doença. Mas cedo se começou a verificar uma certa incompatibilidade nas enxertias com as variedades europeias de castanheiro, bem como a maior exigência edáfica destas espécies. Assim, em Portugal, bem como em Espanha e França, iniciou-se uma via promissora de obtenção de porta-enxertos: a hibridação entre a *C. sativa* com as espécies exóticas, com o objectivo de incorporar na espécie europeia os genes de resistência das espécies exóticas. Deste trabalho, que em Portugal teve como principal intérprete Columbano Fernandes, durante as décadas de 40/60, no extinto Centro de Estudos do Castanheiro, foram obtidos dezenas de híbridos. No entanto, estes trabalhos sofreram grandes atribulações e só no início da década de 80 foram retomados por técnicos da Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade. Nessa altura foi possível proceder a uma identificação e selecção dos híbridos existentes e iniciar campos de testes de compatibilidade para com as principais variedades nacionais. Estes porta-enxertos foram também distribuídos para Vila Real, Sergude e Sabugal.

Estando definidos quais os híbridos que poderão ser utilizados como porta-enxertos, dada a sua compatibilidade com as variedades mais interessantes, tornava-se então indispensável recorrer à propagação vegetativa, a fim de poderem ser multiplicados em larga escala. Dos métodos de multiplicação de porta-enxertos para as espécies fruteiras em geral, e também para o castanheiro são, a mergulhia (amontoa) e a estacaria. E é aqui que desde logo surgiu um grave estrangulamento na multiplicação em larga escala. A estacaria, método mais produtivo mostrou-se ineficaz, face à ineficiência dos métodos e condições de rizogénese aplicados. Só por amontoa foi possível promover rizogénese, com base na aplicação de auxinas e de anilhamento, mas com valores sempre relativamente baixos (de cada touça é possível retirar entre 10 a 12 plantas enraizadas). A juntar a este aspecto, também a viabilidade destas plantas ao fim do primeiro ano é, por vezes, bastante reduzida.

¹ Recentemente a Universidade de Trás os Montes e Alto Douro referiu possuir um clone de *C. sativa* com resistência.

A micropropagação ou propagação *in vitro*

O desenvolvimento de novas técnicas de multiplicação de plantas apareceram no início da década de sessenta, associadas aos estudos sobre o controlo e os modelos de diferenciação dos tecidos vegetais bem como na tentativa de eliminação de doenças, em sistemas de cultura artificiais, isto é, onde era possível controlar os factores químicos, nutritivos e físicos indispensáveis ao desenvolvimento de estruturas vegetais. Estes métodos de multiplicação vieram a ser chamados de micropropagação ou propagação *in vitro* pelo facto de se utilizarem partes vegetativas das plantas de pequenas dimensões (meristemas, ápices e gomos axilares com ou sem caule associado) que eram colocadas em meios de cultura de composição definida (com macro e micronutrientes, vitaminas, reguladores de crescimento e sacarose) em condições de luz e temperatura controladas. Tudo isto processado em condições assépticas.

O processo em si pode ser desenvolvido em cinco fases, com mais ou menos alterações, de acordo com a metodologia de regeneração utilizada (rebetamento axilar, rebetamento adventício ou embriogénese somática). Estas cinco fases, definidas por Murashige (1974) e Debergh e Maene (1981) são (Fig.1):

Fase 0: Selecção da planta mãe e preparação do explante² que envolve toda a fase de manipulação do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*.

Fase 1: Estabelecimento de uma cultura asséptica que inclui o isolamento do explante e a sua colocação em condições assépticas num meio de cultura com formulação definida.

Fase 2: Multiplicação, cujo objectivo é conseguir propagar sem perda de estabilidade genética, no caso da multiplicação clonal.

Fase 3: Preparação para o crescimento em ambiente natural onde se inclui a formação de um sistema radicular funcional.

Fase 4: Transplante e aclimatização onde se pretende adaptar gradualmente a planta produzida *in vitro* às condições de temperatura e humidade naturais por forma a promover a sua autotrofia.

² Qualquer estrutura vegetal que é utilizada para iniciar um programa de multiplicação *in vitro*.

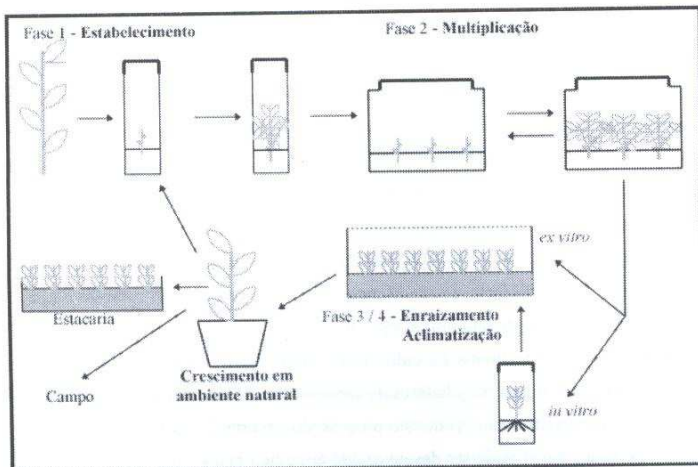


Figura 1. Representação de um sistema de micropropagação por rebentamento axilar. São referidos os dois sistemas alternativos de enraizamento, in vitro e ex vitro. No segundo caso, a expressão e desenvolvimento radicular ocorre em condições autotróficas, podendo considerar-se as plantas em pré-aclimatização. A utilização das plantas micropropagadas pode direccionar-se para a sua colocação no campo, para o estabelecimento de novas culturas ou para a sua utilização como pés-mães para estacaria. (extraído de Gonçalves, 1998)

A micropropagação no castanheiro

Os primeiros ensaios com castanheiro foram desenvolvidos por Jacquot (1950, 1970) a partir do estabelecimento *in vitro* de tecidos cambiais. As primeiras manifestações de organogénese foram observadas por Vieitez *et al.* (1978) que conseguiram obter rizogénese adventícia a partir de *calli* com origem em tecidos cotiledonares. As primeiras plantas completas foram obtidas a partir do desenvolvimento do embrião seminal (Vieitez e Vieitez, 1980a). Os trabalhos que se seguiram permitiram o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de vários tipos de explantes provenientes de plantas com características juvenis, tais como gomos axilares (Vieitez & Vieitez, 1980b, 1982; Chevre *et al.*, 1983) e ápices caulinares (Rodriguez, 1982).

A utilização de explantes com origem em material de características adultas deparou, com algumas dificuldades, quer no estabelecimento quer na sua multiplica-

ção. Os primeiros resultados com algum êxito foram referidos por Biondi *et al.* em 1981, e por Vieitez *et al.* em 1983. Esta última equipa utilizou como explantes segmentos nodais e ápices caulinares de rebentos axilares de varas de amontoa. Na sequência deste trabalho, algumas condições gerais quanto à formulação dos meios de cultura vieram a ser obtidas, no sentido de permitir tornar a fase de multiplicação viável, pelo menos, para alguns clones (Vieitez *et al.*, 1986; Gonçalves, 1991; Gonçalves *et al.*, 1993).

Na fase de enraizamento utilizaram-se meios cuja concentração em macronutrientes era normalmente reduzida a metade da sua concentração (Vieitez *et al.*, 1983; Vieitez *et al.*, 1986), sendo indispensável a utilização de uma auxina em concentrações e tempo de aplicação que variam segundo a metodologia utilizada (Vieitez *et al.*, 1983; Gonçalves *et al.*, 1994, 1998).

Em relação à fase de transplante e aclimatização existe pouca informação disponível. Vieitez *et al.* (1986) referem valores de sobrevivência na ordem dos 35% e Mullins (1987) refere que para rebentos enraizados *in vitro* se registaram elevadas taxas de mortalidade, embora em rebentos com enraizamento *in vivo* se tivessem verificado melhores resultados, mas sem qualquer quantificação, e tudo com material juvenil. Em material adulto, Gonçalves *et al.* (1994) referem taxas de sobrevivência na ordem dos 50% em rebentos com enraizamento *in vitro*. Com a utilização de sistemas de enraizamento *ex vitro*, Miranda & Fernandez (1992) referem taxas de enraizamento na ordem dos 90% e com elevada taxa de sobrevivência das plantas na aclimatização. Com idêntica metodologia Gonçalves *et al.*, (1998) referem percentagens de enraizamento de 87% com 100% de sucesso na aclimatização, isto em condições de laboratório e muito controladas. Como factores de sucesso referem-se não só o bom estado fisiológico das plantas regeneradas *in vitro*, a funcionalidade do sistema radicular e o tipo de substrato utilizado, mas também as condições ambientais, em particular a humidade e a temperatura.

A investigação realizada, em especial, nestas últimas duas décadas com esta espécie e anteriormente referida, definiu, de uma forma mais ou menos eficaz, para um número relativamente elevado de clones, protocolos para a fase de estabelecimento e multiplicação que se podem considerar como comercialmente aplicáveis. No entanto, a fase de enraizamento e aclimatização têm permanecido, ainda, como fases possíveis de sofrerem aperfeiçoamento. Neste sentido tornava-se necessário desen-

volver metodologias de enraizamento eficazes e susceptíveis de viabilizar elevadas taxas de sobrevivência na aclimatização, com caracterização de alguns aspectos morfológicos, anatómicos e bioquímicos da fase de enraizamento, bem como avaliar a influência do tipo de sistema radicular formado, *in vitro* ou *ex vitro*, na sobrevivência e desempenho fisiológico das microplantas na fase de aclimatização. Com base nestes resultados seria então possível definir um protocolo de micropropagação para o castanheiro.

Os resultados obtidos com esta investigação, não só no âmbito deste projecto, foram divulgados em várias publicações e que se encontram referidas na bibliografia. No âmbito desta comunicação iremos abordar o protocolo de micropropagação que foi possível estabelecer para alguns dos clones que têm vindo a ser utilizados, devendo no entanto referir que ele não é universal, pois a nossa própria experiência nos tem revelado que continuam a existir clones considerados como recalcitrantes.

Protocolo de micropropagação

A apresentação do protocolo é feita de acordo com a sequência de fases definidas para um sistema de micropropagação de plantas por rebentamento axilar e que atrás foram referidas.

Fase 0. Selecção das plantas mãe e material vegetal utilizado

Face ao objectivo pretendido, multiplicação de porta-enxertos, foram seleccionados vários clones híbridos de *C. sativa* x *C. crenata* considerados como resistentes à doença da tinta, obtidos no ex-Centro de Estudos do Castanheiro. Estas plantas têm sido multiplicadas por amontoa. A escolha dos clones tem sido feita com base nos resultados já conhecidos das compatibilidades com as diferentes variedades bem como no seu comportamento vegetativo/produzitivo e que foram também objecto de estudo neste projecto.

O procedimento com melhores resultados consiste na recolha das varas dos rebentos do ano durante a sua fase de repouso, de Novembro a Janeiro. Cortadas em estacas de 20/30 cm são desinfectadas por imersão em Benlate 2 g/l. Após secagem são envolvidas em plástico e colocadas no frio a 4 °C durante 2/3 meses. Após este período colocam-se as varas em estufa com a base imersa em água, a 25 °C e fotoperíodo de 16 horas (Fig. 1). Para facilitar e acelerar o processo de abrolhamento

dos gomos dormentes as varas podem ser pulverizadas com uma solução de benzilaminopurina 100 mg l^{-1} .

Fase 1. Estabelecimento de uma cultura asséptica

Após 4 semanas os rebentos axilares atingem uma dimensão de 4 a 6 cm, sendo então destacados da estaca, retiradas as suas folhas e brácteas e colocados em água corrente durante um tempo mínimo de 10 minutos. Antes de se iniciar o processo de desinfecção são parafinadas as bases dos rebentos a fim de evitar a absorção das substâncias desinfectantes. A desinfecção inicia-se por uma passagem por álcool a 70% durante 30 s, seguida da imersão dos rebentos numa solução de hipoclorito de sódio a 1:3 (v:v) (lixívia comercial com 5% de cloro activo e detergente incorporado) durante 10 minutos. De seguida efectuam-se três passagens sucessivas por água destilada e esterilizada, a fim de remover o agente desinfectante, permanecendo os rebentos na quarta água.

Os explantes primários são os ápices e gomos nodais (com 8 a 10 mm) dos rebentos que após seccionamento são mantidos, durante 15 minutos, numa solução de 100 mg l^{-1} de ácido cítrico com 150 mg l^{-1} de ácido ascórbico. O estabelecimento *in vitro* é feito pela colocação do explante assim tratado em tubo de ensaio no meio nutritivo que tem por base a formulação de Murashige e Skoog (1962) com $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP (Fig. 2).

Com este procedimento temos obtido taxas de viabilidade na ordem dos 70 a 80% com um não significativo número de inviáveis.

Fase 2. Multiplicação

Os explantes primários viáveis da fase de estabelecimento entram depois na fase de multiplicação com repicagens sucessivas de 4 em 4 semanas. Os explantes secundários continuam a ser ápices e segmentos nodais com um mínimo de 2 gomos axilares provenientes da proliferação e alongamento dos rebentos axilares já diferenciados *in vitro*. Importante nesta fase é a formulação nutritiva utilizada e que tem por base os macronutrientes de Greshoff e Doy (1972) ou de Heller modificado (macronutrientes de Heller x 1,25) com os micronutrientes de MS e com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP. Com estas formulações obtêm-se taxas de multiplicação entre 2 e 4 e entre 4 e 6 explantes secundários de multiplicação para os clones com melhor capacidade de

regeneração (Fig. 3). Para termos ideia do valor prático destes valores podemos dizer que se partirmos de algumas dezenas de explantes primários estabelecidos poderemos, ao fim de alguns meses de multiplicação, obter milhares de rebentos.

O último subcultivo de multiplicação, também por vezes designado de alongamento, é feito no meio de cultura que tem por base os macro e micronutrientes de Murashige e Skoog com 0,1 ou 0,2 mg^l⁻¹ de BAP. Com esta formulação nutritiva obtêm-se rebentos com maior vigor fisiológico, comparativamente com a formulação de multiplicação que tem por base os macronutrientes de Greshoff e Doy ou de Heller modificado.

Fase 3. Enraizamento

Para o enraizamento utilizam-se os rebentos com alongamento superior a 4 cm aos quais se retiram as folhas basais e se decapitam¹. A fase de enraizamento desenvolve-se em duas sub-fases: a fase de indução e a fase de expressão. A fase de indução exige o contacto dos rebentos com uma auxina, a que se mostrou mais eficaz para a maioria dos génotipos foi o ácido indol butírico (AIB). A sua aplicação pode ser feita, de acordo com os génotipos, pelas seguintes formas:

- i) imersão dos rebentos numa solução concentrada de AIB a 1 g^l⁻¹ durante 30 a 60s (Fig. 4);
- ii) colocação dos rebentos num meio de cultura² com 25 ou 50 mg^l⁻¹ de AIB durante 48 ou 24 horas respectivamente (Fig. 5).

Qualquer das metodologias é executada em condições não assépticas pelo que a facilidade e rapidez de execução são elevadas diminuindo significativamente os custos. De qualquer forma, sendo viável, o primeiro método é, sem dúvida, o de menores custos.

³ A decapitação do ápice é feita para evitar o aparecimento da necrose apical, uma desordem fisiológica ao nível do ápice e que se traduz pela morte deste bem como do próprio rebento no seu todo. Esta operação, onerosa sob o ponto de vista de mão de obra, pode ser fácil e rapidamente executada se o procedimento de enraizamento for feito já em condições não assépticas.

⁴ Com macronutrientes de MS reduzidos a ½ e os nitratos a ¼.

A fase de expressão, período durante o qual se assiste ao desenvolvimento das raízes que vão sendo diferenciadas, é executado já em condições muito próximas das condições naturais. A metodologia que desenvolvemos consiste na colocação dos rebentos numa mistura de turfa e perlite (1:2, v:v) humedecida a 70% da sua capacidade de retenção com uma mistura nutritiva de macronutrientes de Murashige e Skoog reduzidos a metade da sua concentração e o nitratos a um quarto. Os contentores utilizados consistem em caixas de poliestireno expandido (vulgar esferovite) de 60x40x20 cm, onde é possível colocar 70 rebentos (Fig. 6). As caixas são tapadas com uma tampa de plástico acrílico alveolar transparente e colocadas durante 4 semanas sob condições de luz com fotoperíodo de 16 horas e uma intensidade na ordem dos $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas são pulverizadas com água diariamente e fertilizadas semanalmente.

Com estas metodologias, e dependendo dos clones, obtemos percentagens de enraizamento na ordem dos $85\% \pm 10\%$.

Fase 4. Aclimatização

No final das quatro semanas as microplantas apresentam um sistema radicular com uma morfologia e anatomia em tudo normal (Fig. 7) e idêntico aos sistemas radiculares desenvolvidos por estacas convencionais. Apesar da fase de enraizamento ter decorrido já em condições de autotrofia, o desempenho fotossintético e de controlo de perdas de água destas plantas é incipiente, uma vez que as folhas que possuem são ainda as folhas desenvolvidas em condições artificiais *in vitro*.

Neste contexto a fase de aclimatização, que consiste em preparar as plantas para crescerem e se desenvolverem em condições ambientais naturais, exige um controlo em dois factores importantes: a humidade e a luz. Assim, as plantas enraizadas são então repicadas para sacos plásticos com volume de 1000 cm^3 , cheios de terra e colocadas em túneis de aclimatização com controlo de humidade (Fig. 8) que de um valor na ordem dos 95% vai sendo gradualmente reduzida durante 4 semanas até humidade ambiente ($\pm 50\%$). As percentagens de sobrevivência são superiores a 80%. Após este período (Fig. 9), as plantas podem então ser transferidas para uma bancada de estufa convencional, com rega por micro-aspersão, onde se mantêm em crescimento até ao início do período de repouso vegetativo após o que são transferidas para o exterior para aí entrarem em dormência (Fig. 10). Nesse Inverno poderão ser instaladas no seu local definitivo.

Termina-se assim este ciclo de multiplicação de plantas que, no caso do castanheiro, permite já uma significativa rentabilidade do processo para alguns dos genótipos considerados interessantes.

No âmbito deste projecto, o objectivo de micropropagar estes híbridos não foi o de fornecer directamente estas plantas aos produtores, pois essa tarefa, no nosso entender, não cabe a uma instituição de ensino e investigação, mas sim à iniciativa privada, mas foi o de produzir plantas para constituir um campo de pés-mãe que possa vir a ser utilizado para obtenção de material vegetativo para enraizamento por estacas, método muito mais acessível e económico de obtenção de plantas comparativamente com os que acabámos de descrever. Diversos estudos em diversas espécies, inclusive castanheiro, têm demonstrado que estas plantas micropropagadas apresentam características mais juvenis, o que, como é sabido, é um factor determinante na capacidade de rizogénese.

Esse campo de pés-mãe é, já hoje, uma realidade na Colónia Agrícola de Martim-Rei, Sabugal, propriedade da Direcção Regional de Agricultura da Beira Interior (Fig. 11). Embora ainda não completo, vai ser possível ainda este ano estabelecer os primeiros ensaios de enraizamento por estacas por forma a verificarmos a viabilidade futura de obtenção de plantas por este método com o objectivo de poderem ser distribuídas aos produtores.

Fora dos objectivos traçados neste projecto, mas face à inexistência de informações sobre o comportamento de variedades regionais de castanha enxertadas em clones híbridos de castanheiro micropropagados, está também a ser instalado na Colónia Agrícola de Martim-Rei, um campo de demonstração utilizando dois dos porta-enxertos micropropagados e quatro dessas variedades regionais.

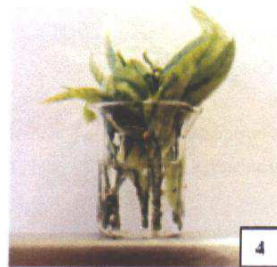
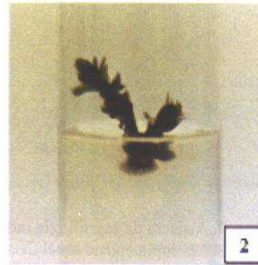


Fig. 3. Rebentos regenerados na fase de multiplicação e alongamento.

Fig. 4. Rebentos na fase de indução de raízes por imersão em AIB.

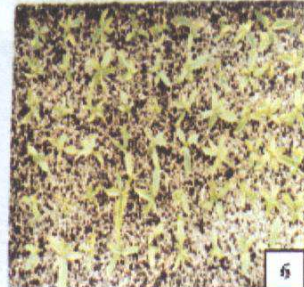


Fig. 5. Rebentos na fase de indução de raízes por AIB no meio de cultura.

Fig. 6. Fase de expressão e desenvolvimento radicular *ex vitro*.



7



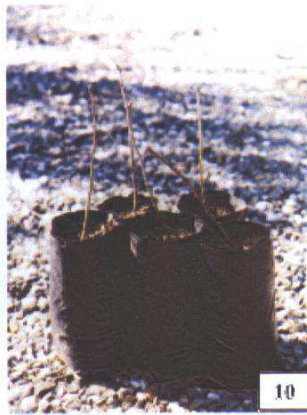
8

Fig. 7. Aspecto da morfologia radicular dos rebentos após rizogênese *ex vitro*.

Fig. 8. Microplantas no túnel de aclimatização.



9



10

Fig. 9. Aspecto de uma microplanta no final da fase de aclimatização.

Fig. 10. Plantas micropropagadas no período de repouso vegetativo.



11

Fig. 11. Vista geral do campo de pés-mãe de plantas micropropagadas.

Bibliografia citada e consultada

- Biondi, S.; Canciani, L.; De-Paoli, G. & Bagni, N., 1981. Shoot formation from bud cultures of mature chestnut. In: *Colloque International sur la Culture In Vitro des Essences Forestières*, AFOCEL, pp. 181-186, Fontainebleau, France.
- Chevre, A.M., Gill, S.S., Mouras, A & Salesses, G., 1983. *In vitro* vegetative multiplication of chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58: 23-29.
- Gonçalves, J. C. (1990) Multiplicação *in vitro* de castanheiro (*Castanea* spp) por rebentamento axilar. *II Congresso Florestal Nacional*, Porto, Portugal.
- Gonçalves, J.C., 1993. Novas técnicas na multiplicação clonal do castanheiro. *Floresta e Ambiente*, 22: 29-35.
- Gonçalves, J.C., 1991. Influência de alguns factores na micropropagação de castanheiro (*Castanea* Miller). *Dissertação de Mestrado*. UTL, Instituto Superior de Agronomia, 113p.
- Gonçalves, J.C., 1998. Micropropagação de castanheiro: estudo das fases de enraizamento e aclimatização. *Dissertação de Doutoramento*. UTL, Instituto Superior de Agronomia, 234p.
- Gonçalves, J.C.; Amâncio, S.; Coelho, M.T.; Vieitez, A.M., 1995. Comparação de dois métodos de indução de rizogénese em rebentos de castanheiro regenerados *in vitro*. *IV Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal*, p. 234. Estoril, Portugal.
- Gonçalves, J.C.; Amâncio, S.; Pereira, J.G., 1993. *In vitro* propagation comparative study of 7 chestnut hybrid clones (*C. sativa* x *C. crenata*). *International Congress on Chestnut*, pp. 211-214. Spoleto, Itália.
- Gonçalves, J.C.; Amâncio, S.; Pereira, J.S., 1994. Rooting and acclimatization of chestnut by *in vitro* propagation. In: Lumsden, P.J.; Nicholas, J.R.; Davies, W.J., (Eds.). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, The Netherlands. pp. 303-308.
- Gonçalves, J.C.; Coelho, M.T. (1996). Estudo anatómico da iniciação e desenvolvimento de raízes em rebentos de castanheiro regenerados *in vitro*. *Simpósio de Propagação Vegetativa de Espécies Lenhosas*, 206-212. Castelo Branco, Portugal.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G.; Amâncio, S. 1998. Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): effects of rooting methods on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during root formation. *Scientia Horticulturae*, 72: 265-275.

- Gonçalves, J.C.; Diogo, G.; Coelho, M.T.; 1999. Effects of elevated CO₂ on acclimatization of *in vitro*-regenerated chestnuts. I. Growth analysis. *3th Meeting of COST G4 - Multidisciplinary Chestnut Research, WG1*. Sopron, Hungria.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G.; Coelho, M.T.; Amâncio, S., 1999. Effect of rooting conditions on survival and growth during acclimatization of micropropagated chestnut plants (*Castanea sativa* x *C. crenata*). *Acta Horticulturae*, 494: 235-241.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G.; Coelho, M.T.; Amâncio, S., 2000. Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. *Acta Horticulturae*, 520 (in press).
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G.; Coelho, M.T.; Amâncio, S., 1998. Foliar morphology and anatomy changes of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. *XXV International Horticultural Congress*. Bruxelas, Bélgica.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G.; Coelho, M.T.; Amâncio, S., 1998. Photosynthesis in micropropagated chestnuts during *in vivo* acclimatization. *IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. Jerusalem, Israel.
- Gonçalves, J.C.; Diogo, G.; Coelho, M.T.; Amâncio, S., 1998. Pigment content and gas exchange of micropropagated chestnuts during *in vivo* acclimatization. *2nd Meeting of COST G4 - Multidisciplinary Chestnut Research, WG1*. Santiago de Compostela, Espanha.
- Gonçalves, J.C.; Vidal, N.; Amâncio, S., 1998. Endogenous auxins levels during *in vitro* rooting of micropropagated chestnut shoots. *5th Meeting of COST 822, WG3 - Identification and Control of Phase Changes in Rejuvenation*. Budapeste, Hungria
- Greshoff, P.M. & Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107:161-170.
- Jacquot, C., 1950. Sur la culture *in vitro* du tissu cambial du châtaigner (*Castanea vesca* Gaerth.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 231:1080-1081.
- Jacquot, C., 1970. Nouvelles recherches sur l'action de quelques dérivés de l'adénine sur la croissance du tissu cambial d'essences forestières cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270: 493-495.
- Miranda, M.E. & Fernandez, J., 1992. Micropropagation as a nursery technique for chestnut hybrid clones. *Proceedings of the International Chestnut Conference*, 101-103. Morgantown, West Virginia.
- Mullins, K.V., 1987. Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Hort.*, 212: 525-530.

- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:135-166.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, E., 1978. *In vitro* culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill. *Scientia Hortic.*, 8:243-247.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L. & Vieitez, E., 1986. Chestnut (*Castanea* spp.). In: Y. P. S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 1, pp. 393-414. Springer-Verlag, Berlin.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L., 1980a. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut growing *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 50:127-130.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L., 1980b. Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 55:83-84.
- Vieitez, A.M. & Vieitez, M.L., 1982. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Scientia Hortic.*, 18:343-351.
- Vieitez, A.M., Ballester, A. & Vieitez, M.L., 1983. *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58(4): 457-463.