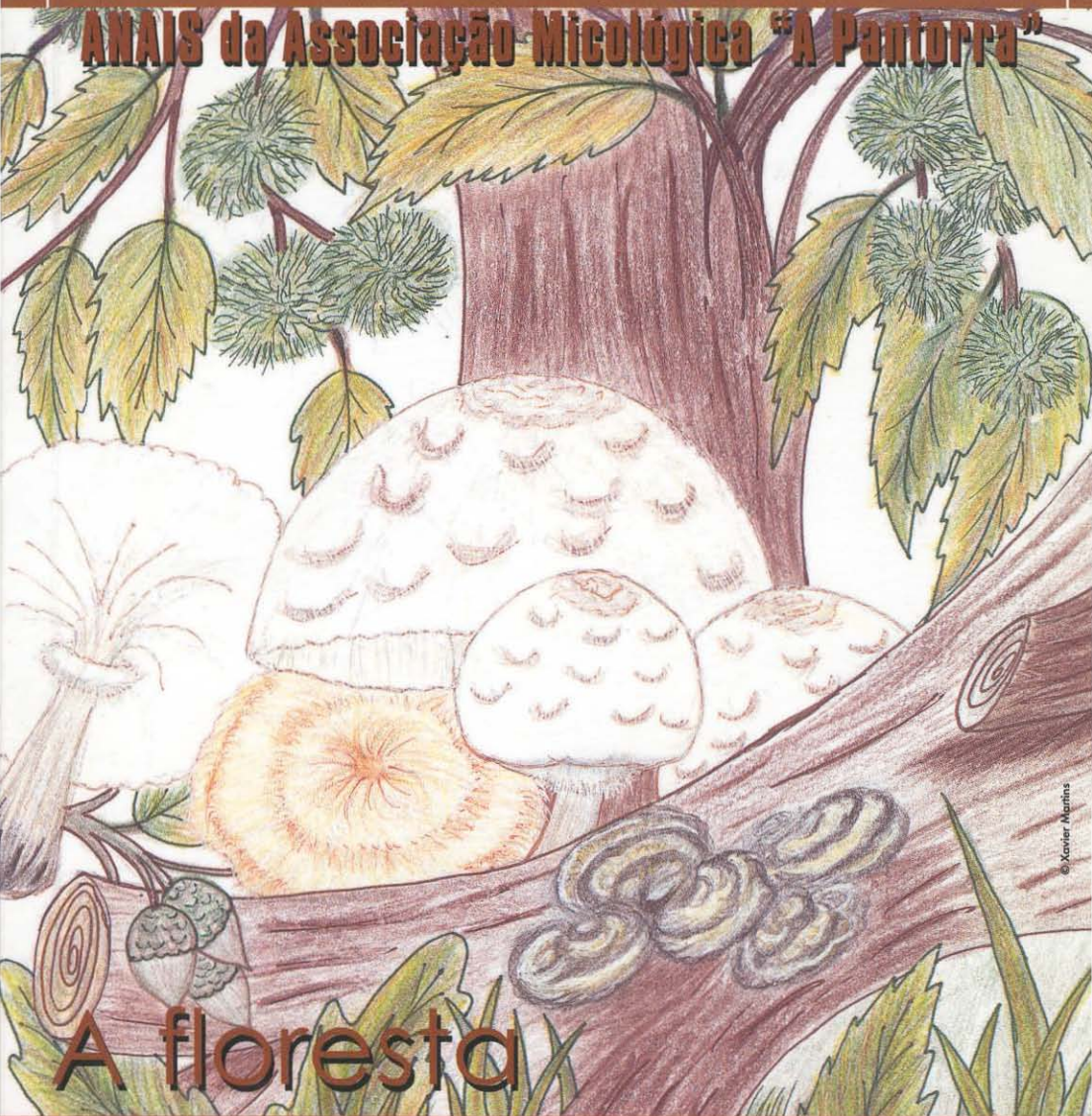


A PANTORRA

ANALIS da Associação Micológica "A Pantorra"



A floresta

e os cogumelos

VOLUME 5

2005

MOGADOURO



Estudos e perspectivas futuras das micorrizas e da indução de micorrização *in vitro* e *ex vitro* de *Castanea sativa* Mill.

Martins A.*, Baptista P.*, Rodrigues P. C.* e Pais M. S.**

*¹ Escola Superior Agrária de Bragança, Quinta de Sta. Apolónia, Apt. 1 172, 5301-855 Bragança • amartins@ipb.pt.

** ICAT – Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia. Campo Grande. Lisboa

Resumo

Apresenta-se uma breve retrospectiva dos estudos de micorrização *in vitro* e *ex vitro* de plantas de castanheiro micropropagadas e germinantes e os efeitos fisiológicos e químicos da micorrização. Pretende-se ainda perspectivar os estudos em vias de desenvolvimento no domínio da micorrização, dos mecanismos e sinais de associação raiz-fungo e dos efeitos comparativos com associações patogénicas do castanheiro. Estudos de biodiversidade de macrofungos associados ao castanheiro e à aplicação de fungos nativos em programas de micorrização controlada serão também apresentados.

Palavras chave: *Castanea sativa* Mill., castanheiro, *Pisolithus tinctorius*, micorrizas, micropropagação, inoculação.

Abstract

A general retrospective of the studies of *in vitro* and *ex vitro* mycorrhization of chestnut tree micropropagated plants and seedlings are shown. Physiological and chemical effects of mycorrhization are also referred. We intend to perspective the developing studies of chestnut mycorrhization in terms of mechanisms and signals of root-fungus association and of the comparative effects with chestnut pathogenic associations. Biodiversity studies of macrofungi associated with chestnut ecosystems and the use of native fungi in mycorrhizal inoculations are also presented.

Key words: *Castanea sativa* Mill., chestnut tree, *Pisolithus tinctorius*, mycorrhizas, micropropagation, inoculation.

Introdução

O castanheiro, *Castanea sativa* Mill. é uma espécie agro-florestal de grande importância económica em Portugal, quer pela produção de fruto quer de madeira, sendo a sua cultura conhecida desde o tempo dos Romanos.

A maioria das espécies vegetais possui micorrizas, associações mutualistas altamente evoluídas entre fungos do solo e raízes de plantas.

As simbioses acompanharam a evolução da biosfera, sendo um dos casos de cooperação entre genomas de organismos diferentes. As micorrizas constituem as infecções fúngicas mais frequentes: todas as Gimnospérmicas, 83% das dicotiledóneas e 79% das monocotiledóneas são micorrízicas.

A simbiose fornece nutrientes minerais à planta hospedeira e o fungo obtém compostos de carbono, que contribuem de forma considerável para a biomassa do solo. O aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, da resistência a agentes patogénicos e da tolerância a metais pesados e à secura, são algumas das vantagens específicas destas associações.

C. sativa, tal como a maioria das espécies, estabelece micorrizas com numerosas espécies de fungos. Problemas conhecidos de sobrevivência e de produção de plantas de castanheiro levaram ao início de programas de propagação *in vitro* e ao estudo da melhoria das condições de aclimação através da micorrização controlada. Os trabalhos prosseguiram com o estudo da micorrização controlada de castanheiro, nos seus aspectos fisiológicos e químicos, quer em condições *in vitro*, quer *ex vitro*.

Plantas de *C. sativa* e o fungo *Pisolithus tinctorius* foram produzidos *in vitro*. Avaliaram-se parâmetros de crescimento, teores de alguns nutrientes minerais, teores em proteína, quantidades relativas e evolução da compartimentação de fosfatos por ^{31}P -RMN, actividades de algumas enzimas (SOD, APX, GR, PO, PPO, lacase, PAL e β -glucosidase).

Ao longo de três anos, a micorrização de germinantes *ex vitro* permitiu quantificar e avaliar as taxas de germinação e crescimento, os teores de azoto e fósforo total e as taxas de sobrevivência à aclimação.

Fazemos uma breve retrospectiva dos estudos de micorrização *in vitro* e *ex vitro* de plantas de castanheiro micropropagadas e germinantes realizados, assim como dos efeitos desta nos seus aspectos fisiológicos e químicos. Pretende-se ainda perspectivar os estudos em vias de desenvolvimento no domínio da micorrização, dos mecanismos e sinais de associação e dos efeitos comparativos com associações patogénicas da mesma espécie. Questões ligadas à biodiversidade de macrofungos associados ao castanheiro e à aplicação de fungos nativos em programas de micorrização controlada serão ainda abordados.

Propagação de castanheiro

A multiplicação de castanheiro constitui um problema quando se trata de variedades de produção de fruto. As plantas para produção de madeira são obtidas exclusivamente por via seminal. As dificuldades de multiplicação vegetativa desta espécie (recalcitrância no enraizamento de estacas) e uma grande sensibilidade das variedades de plantas produtoras de fruto às doenças transmitidas por microrganismos do solo, faz com que elas tenham de ser enxertadas numa planta porta enxerto que

apresente um bom sistema radicular e apresente melhor resistência a essas doenças (Breisch et al. 1995).

A castanha resultante da reprodução sexuada entre dois génotipos quase sempre desconhecidos leva a uma elevada heterozigotia responsável por uma heterogeneidade, não previsível, das populações obtidas por germinação da semente. A dificuldade em inferir as características silvícolas e/ou agrícolas das plantas obtidas levou a um enorme investimento na multiplicação vegetativa da espécie.

Do ponto de vista prático, a propagação por semente implica a recolha das sementes, a conservação no frio, a estratificação durante o Inverno, a sementeira em Março ou Abril e a manutenção dos germinantes em viveiro até terem dimensão que permita a enxertia (um a dois anos). As vantagens desta técnica são a sua simplicidade e o baixo custo, sendo vários os inconvenientes: Problemas de conservação da semente; a grande heterogeneidade das plantas obtidas, que obriga a uma triagem antes da utilização; a sensibilidade à tinta, das plantas de *C. sativa*.

A propagação por via seminal de *C. sativa*, sensível a *Phytophthora* levou ao crescente desenvolvimento de híbridos de *C. sativa* com espécies resistentes. Por serem resistentes, as espécies *C. crenata* e *C. mollissima*, revelaram-se importantes para a produção de híbridos (*C. sativa* x *C. crenata*; *C. sativa* x *C. mollissima*). Estes híbridos podem ser utilizados em programas florestais. A sua utilização como porta enxerto para variedades produtoras de fruto apresenta problemas de incompatibilidade à enxertia e de adaptação edafoclimática (Breisch et al. 1995).

A multiplicação vegetativa de porta enxertos ou de variedades produtoras directas é efectuada recorrendo a três tipos de técnicas: a mergulhia com amontoa de rebentos de touça, a estacaria de material semi-lenhoso e a micropropagação (Breisch et al. 1995).

As dificuldades de enraizamento do castanheiro devem-se, entre outros factores, à existência de dois inibidores, um de crescimento e um de enraizamento (Vieitez et al. 1986). Qualquer das técnicas de enraizamento de estacas tem, por consequência, uma baixa taxa de sucesso, à excepção de material híbrido, no qual essa inibição parece ser mais facilmente ultrapassada.

Várias tentativas têm sido feitas no sentido de obter e clonar variedades resistentes às doenças da tinta e do cancro. A micropropagação conta-se entre as que melhor podem permitir atingir este objectivo.

O castanheiro foi uma das primeiras espécies lenhosas a ser usada para iniciar culturas *in vitro*. Jacquiot (1947) começou a cultura de tecido cambial de árvores adultas, e obteve a formação de tecido indiferenciado (*calli*) (Vieitez et al. 1986).

A micropropagação de plantas do género *Castanea*, tem sido objecto de numerosos trabalhos quer utilizando material juvenil (Vieitez et al. 1975; 1978 a, b 1981, 1983, 1986; Vieitez & Vieitez 1980, 1983; Biondi et al. 1981; Rodriguez 1982; San José et al. 1984, 2001, Chèvre

et al. 1983, Strullu et al. 1986; Mullins 1987) quer utilizando material adulto (Biondi et al. 1981; Feijó 1989, Martins et al. 1996).

A micropropagação do castanheiro compreende várias fases (Fig 1): estabelecimento em cultura dos clones seleccionados pelas suas características silvícolas e/ou agronómicas (não apresentada na figura); a) multiplicação das microestacas; b) alongamento dos entrenós e endurecimento do caule; c) e d) enraizamento; e) aclimação com inoculação micorrízica; f) e g) aclimação a condições *ex-vitro*.

Os problemas de enraizamento, frequentemente encontrados também nas plantas multiplicadas *in vitro* são, por vezes, acompanhados de dificuldades de aclimação (Martins 1992, Martins et al. 1996). Tais problemas devem-se à baixa funcionalidade do sistema radicular ou ao pequeno tamanho das plantas enraizadas que necessitam de um longo processo de aclimação até poderem passar para o campo (Breisch et al. 1995). Apesar destes constrangimentos, a micropropagação de alguns clones está em curso, e o recurso à micorrização, tem vindo a permitir aumentar significativamente a taxa de sucesso na aclimação das plantas micropropagadas, evidenciando os aspectos promissores desta técnica de propagação vegetativa com espécies consideradas difíceis como o castanheiro (Martins et al. 1996).

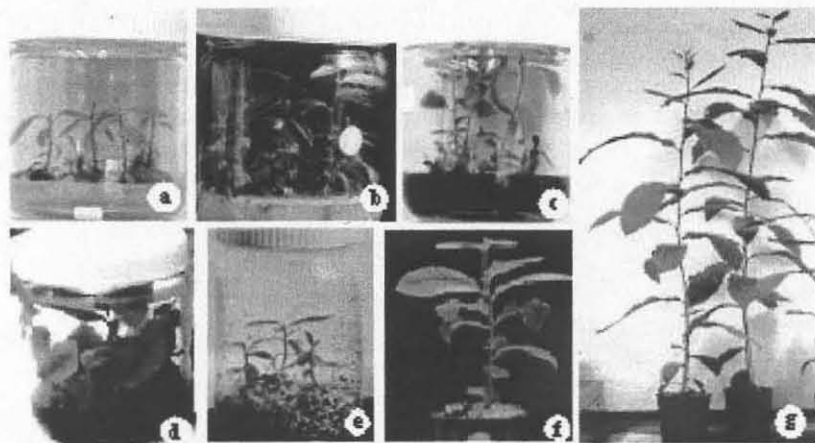


Figura 1 - Fases da micropropagação de castanheiro: a) fase de multiplicação; b) fase de alongamento dos entrenós; c) e d) fase de enraizamento e) fase de micorrização; f) fase de pré-aclimação e micorrização; g) fase de aclimação (Adaptado de Martins et al. 1996).

O transplante e adaptação de plantas micropropagadas às condições de viveiro ou campo é uma fase crítica da técnica de cultura *in vitro*. Esta etapa do processo de micropropagação, designada por atempamento, compromete a sobrevivência de plantas frágeis produzidas em

meios de cultura estéreis. O stresse ambiental que as plantas sofrem, ao sair dos contentores de cultura *in vitro* é devido não só, ao já referido, pobre desenvolvimento radicular mas também à ausência de cutícula responsável por uma elevada perda de água foliar que as torna mais sensíveis ao ataque por agentes patogénicos. O objectivo fundamental do atempamento é a aclimação das plantas às condições naturais, com as maiores taxas de sobrevivência possível. A formação de um sistema radicular funcional e a criação de uma microflora rizosférica benéfica são factores importantes para esse aumento da sobrevivência (Guerrero et al. 1996). *Castanea sativa* Mill., à semelhança da maioria das espécies, é micorrízica, sendo conhecida a sua associação a numerosas espécies de fungos.

A inoculação de fungos micorrízicos pode contribuir para o estabelecimento de uma comunidade microbiana na rizosfera no momento do transplante de um substrato estéril (*in vitro*) para outro não estéril (viveiro ou campo), contribuindo para ultrapassar o conhecido bloqueio de crescimento apical que as plantas micropropagadas sofrem quando transferidas para condições *ex vitro*, devido à falta de fitorreguladores exógenos, que é, directa ou indirectamente, equilibrada pela presença de fungos micorrízicos (Guerrero et al. 1996).

A capacidade das micorrizas aumentarem a tolerância ao stresse hídrico pode aumentar a sobrevivência das plantas ao processo de aclimação, viabilizando o processo de micropropagação (Duddridge et al. 1980, Boyd et al. 1986, Meyer 1987, Feil et al. 1988, Marx & Cordell 1989, Dosskey et al. 1991, Guehl et al. 1992, Garbaye & Churin 1997, Mushin & Zwiazek 2002, Shi et al. 2002). Também o aumento da resistência a agentes patogénicos é referenciado para a micorrização de plantas (Marx 1969, 1974, Marx & Davey 1969 a, b, Azevedo 1973, Perrin & Garbaye 1983, Perrin 1985, Vrót & Grente 1985, Duchesne et al. 1988a, b, Mayer 1988, Kope & Fortin 1990, Stenström et al. 1997, Ursic et al. 1997).

A micorrização *in vitro* foi induzida em germinantes e em plantas micropropagadas de *C. sativa* obtidas a partir de material adulto (Fig. 2). Foram testadas quatro espécies de fungos micorrízicos: *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata*, *Piloderma croceum* e *Pisolithus tinctorius* (Martins 1992, Martins et al. 1996, 1997).

Dos fungos em ensaio apenas *P. tinctorius* foi capaz de estabelecer uma associação estável com *C. sativa* (Fig. 2). *L. laccata* e *A. muscaria* formaram um manto em, respectivamente, 20% e 10% das raízes secundárias das plantas. Contudo o crescimento apical não foi acompanhado pela associação fúngica em *L. laccata* e *A. muscaria* não apresentou capacidade para formar rede de Hartig em muitas das raízes que exibiam manto visível. *Piloderma croceum* não estabeleceu micorrização com as raízes de *C. sativa* apesar de se ter verificado ramificação dicotómica dessas raízes (Martins 1992, Martins et al. 1996).

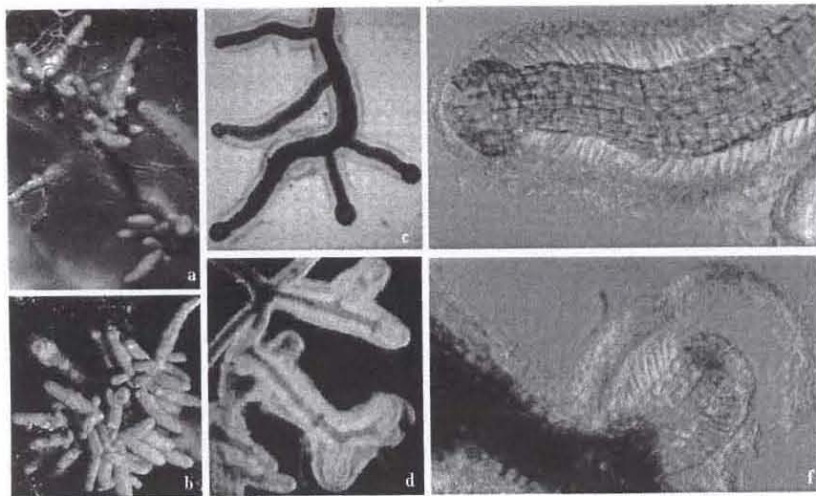


Fig. 2 – Micorrizas de castanheiro com *Pisolithus tinctorius*
 (a) e (b) – Imagens de raízes micorrizadas *in vitro* observadas à lupa,
 (c) a (f) – Fotografias de micorrizas em microscopia óptica com contraste
 interferencial de Nomarski. (e) – Raiz com alongamento transversal oblíquo das
 células epidérmicas entre as quais se encontra a rede de Hartig. (d)
 e (f) – O manto observa-se a branco (d) e destacado das células epidérmicas
 (f). (Adaptado de Martins 1992, Martins et al. 1996).

A aclimação de plantas micorrizadas foi comparada com a de plantas testemunha, em termos de sobrevivência e de crescimento (Martins et al. 1996). Foram ainda determinados alguns parâmetros fisiológicos, como o teor de pigmentos fotossintéticos e de proteínas, as taxas respiratórias e fotossintéticas, o ponto de compensação do CO₂ e a actividade de algumas enzimas do metabolismo fotossintético (RubisCO e PEPcarboxilase) (Martins et al. 1997). Os resultados obtidos indicam que a micorrização com *P. tinctorius* aumenta o crescimento e a produtividade de plantas de castanheiro germinantes e micropropagadas, facilitando ainda o processo de aclimação das plantas micropropagadas (Martins et al. 1996, 1997).

Em ensaios ulteriores, plantas micropropagadas de *Castanea sativa* foram transferidas para caixas de Petri, previamente inoculadas com o fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius*, após enraizamento *in vitro*. O processo de micorrização foi monitorizado em intervalos regulares no sentido de avaliar a formação do manto e rede de Hartig assim como o crescimento das plantas em termos de altura, diâmetro a nível do colo, comprimento da maior raiz e comprimento total das plantas e ainda de pesos fresco e seco até aos 90 dias. As taxas de crescimento por unidade de tempo ($\Delta x/\Delta t$) e relativas (TCR) foram determinadas de modo a

avaliar o efeito da micorrização nas taxas de crescimento das plantas independentemente do seu tamanho e/ou peso iniciais (Martins, 2004).

As raízes das plantas apresentam hifas aderentes à sua superfície 24 horas após a transferência das plantas para as caixas com meio. Aos 20 dias já se observa um manto estruturado e uma rede de Hartig em formação, ainda que sem alteração da morfologia das células epidérmicas. Aos trinta dias a rede de Hartig encontra-se bem desenvolvida e com alongamento das células epidérmicas. As plantas micorrizadas apresentam taxas de crescimento em altura e diâmetro a nível do colo mais elevados do que as plantas não micorrizadas a partir dos 50 dias de contacto raiz - fungo. O comprimento da maior raiz é superior em plantas não micorrizadas a partir dos 40 dias. Os pesos fresco e seco de plantas micorrizadas são mais elevados a partir dos 30 dias. As taxas de crescimento das plantas micorrizadas de castanheiro estão de acordo com o desenvolvimento morfológico das estruturas micorrízicas observadas em cada um dos tempos de micorrização. O estabelecimento da simbiose pressupõe a formação de um manto e de uma rede de Hartig que já se encontravam bem desenvolvidos aos 30 dias quando se verificam diferenças de peso fresco e seco entre plantas micorrizadas e não micorrizadas (Martins, 2004).

Em conclusão, podemos dizer que, em condições *in vitro*, a micorrização começa a manifestar os seus efeitos, nomeadamente no crescimento das plantas, a partir dos 20 dias. Aumenta as taxas de crescimento em termos de pesos fresco e seco e em altura e diâmetro a nível do colo, diminuindo o crescimento da maior raiz das plantas micorrizadas (Martins, 2004).

Nutrição mineral

Os efeitos positivos das associações ectomicorrízicas são numerosos, contando-se o aumento da disponibilidade de nutrientes minerais como o mais importante. A nutrição de plantas pode ser definida como o conjunto de interações que a planta estabelece com elementos químicos e compostos disponíveis, quer na planta, quer na sua interface com o ambiente externo. Os benefícios nutricionais têm sido, tradicionalmente, atribuídos ao efeito quantitativo do micélio extrarradicular na absorção de nutrientes em solução no solo (Smith & Read 1997). A rede de hifas interligadas, ou os seus agregados, constituem órgãos especializados, os rizomorfos. Estes formam um compartimento supracelular responsável pelo transporte de nutrientes desde os locais de absorção, até aos locais de utilização e transferência (Chalot et al. 2002).

No sentido de proceder aos estudos de nutrição, produziram-se plantas de *C. sativa* por micropropagação e o fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius* por cultura *in vitro* em meio sólido e líquido. A micorrização foi induzida num sistema axénico, em caixa de Petri, no qual os simbiontes foram postos em contacto, após um período de crescimento

inicial do fungo no meio de cultura. O desenvolvimento da micorrização e das plantas foi acompanhado desde o primeiro dia de contacto planta-fungo, até aos 90 dias, tendo sido avaliados, em plantas micorrizadas (M), não micorrizadas (NM) e fungo, ao longo do processo de micorrização, os teores dos seguintes nutrientes minerais: 1) azoto (total, amónio e nitratos); 2) fósforo (total, orgânico e inorgânico); 3) potássio; 4) cálcio; 5) magnésio; 6) ferro; 7) manganésio; 8) cobre; 9) zinco; 10) sódio; e ainda 11) teores de proteína e 12) quantificação relativa e evolução da compartimentação de fosfatos, em raízes de plantas M, NM e no fungo, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, ^{31}P -RMN (Martins et al. 1999, Martins, 2004).

Nos resultados obtidos em plantas micropropagadas de *C. sativa* micorrizadas *in vitro* com *P. tinctorius* verificámos que a micorrização influencia de forma determinante a nutrição mineral das plantas, ainda que de forma diversa entre os diferentes minerais analisados e a partir de tempos diferentes de micorrização. Assim podemos dizer que em termos de nutrição mineral as micorrizas de castanheiro com Pt aumentam a absorção de: N, sobretudo na forma de NH_4^+ , aumentando ainda os teores de proteína; P (Pi e POrg) analisados quimicamente e monitorizados por ^{31}P RMN; K; Ca; Mg e Na. Relativamente a nutrientes como o Fe e o Cu, observa-se uma alteração dos teores desses nutrientes, nalguns dos órgãos e/ou em alguns dos tempos de ensaio. Não se observa qualquer alteração na nutrição de Zn e a nutrição de Mn é diminuída nas plantas micorrizadas. Além das diferenças nos teores de nutrientes minerais, observaram-se ainda diferenças na distribuição relativa de alguns deles pelos órgãos das plantas. Os teores de proteína são sempre superiores em plantas M (Martins, 2004).

A quantificação relativa e compartimentação de fosfatos no fungo e raízes das plantas revelou que: os espectros de ^{31}P -RMN do fungo, quer em cultura pura, quer em co-cultura com as plantas, mostram a presença de ressonâncias devidas a uma reserva de ortofosfato vacuolar (Pi) e a uma reserva de polifosfatos (Poli-P). Nos espectros de raízes não micorrizadas observa-se apenas uma ressonância devida a fosfato inorgânico enquanto nas raízes micorrizadas ocorrem também polifosfatos (-22.3 ppm), resultantes da presença de fungo (Martins et al. 1999, Martins, 2004).

Actividades enzimáticas

A evolução dos organismos aeróbios deu lugar a um paradoxo, pois a grande vantagem adaptativa conferida pela produção de maiores quantidades de energia, leva simultaneamente à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que ao serem libertadas, se não forem rapidamente eliminadas, causam importantes danos nas células (Scandalios 1997a, b). Os mecanismos antioxidantes enzimáticos são constituídos por enzimas com a capacidade de remover, neutralizar ou eliminar radicais livres (SOD, CAT, APX, GR entre outros).

Dentre os agentes de stresse biótico contam-se os fungos patogénicos, capazes de, após infecção, despoletar a activação ou síntese de novo de enzimas nas plantas infectadas. Nas plantas, a redução da invasão de um agente patogénico verifica-se, com frequência, através da morte das células em redor do local da infecção. Esta morte é, provavelmente, provocada pelas ROS formadas na sequência da infecção (Wojtaszek 1997, Lamb & Dixon 1997, Bestwick et al. 1998). Os fungos micorrízicos e o processo de associação simbiótica obrigam a uma interacção raiz - fungo, até agora não esclarecida relativamente ao mecanismo de reconhecimento dos parceiros simbióticos e da interacção, ou do momento a partir do qual ela é reconhecida como tal.

O conhecimento de que uma das respostas fisiológicas ao stresse biótico consiste no aumento da actividade de um conjunto de enzimas do stresse oxidativo (SOD, APX, GR, PO), na produção de compostos com actividade antimicrobiana (fenóis, quinonas, fitoalexinas) e a activação de enzimas que catalisam as reacções de produção de compostos que funcionam como barreiras químicas ou físicas (PPO, lacase, PAL e β -glucosidase) (Scandalios 1993, Prasad & Rengok 1998, Shigeoka et al. 2002) levou à avaliação das actividades destas enzimas ao longo do processo de micorrização. As lenhinas cuja síntese é regulada pela PO, lacase e PAL entre outras, foram também avaliadas em plantas micorrizadas e não micorrizadas de castanheiro com o fungo *Pisolithus tinctorius*.

Os resultados obtidos mostram que não existem diferenças nas actividades enzimáticas da SOD, APX e GR entre raízes de plantas M e NM, pelo que podemos inferir que o mecanismo de reconhecimento dos fungos micorrízicos pelas plantas hospedeiras não corresponde a uma resposta a um stresse biótico semelhante ao que ocorre em relações de tipo patogénico.

As actividades da PO e PPO por outro lado revelam um decréscimo em raízes e parte aérea das plantas M, que confirma as diferenças de resposta à presença de fungos micorrízicos e patogénicos. A supressão específica das actividades das PO e PPO sugere que o simbionte fúngico é capaz de influenciar a reacção de defesa do hospedeiro em situações de simbiose micorrízica.

A PAL, a β -glucosidase e a lacase, por outro lado, apresentam actividades, respectivamente, acrescidas nas duas primeiras e semelhantes na terceira, entre raízes de plantas M e NM, podendo os aumentos das primeiras corresponder à actividade do fungo presente nas raízes, o qual apresenta também elevadas actividades relativas das mesmas. O papel destas enzimas na síntese de lenhinas e outros compostos da via dos fenilpropanóides e na activação dos derivados glicosilados de fitoreguladores e de fenóis permitem-nos dizer que os fungos micorrízicos são capazes de influenciar o metabolismo das plantas hospedeiras ao nível das funções destes compostos. O aumento dos teores de lenhina em plantas M de castanheiro é expressão dessa influência, carecendo de investigação futura que possibilite a explicação dos mecanismos de inte-

racção planta-fungo. Um melhor esclarecimento passa pela monitorização das mesmas enzimas para tempos inferiores a 24 h, no sentido de verificar se a resposta ao contacto raiz-fungo passa, em algum momento, por mecanismos de tipo oxidativo que os parceiros controlam em tempos posteriores ao reconhecimento.

Ensaio de contacto raiz-fungo para tempos de 1h, 3h, 5h, 10h e 24h mostram que existem efectivamente diferenças entre os níveis de H_2O_2 em raízes em contacto com fungo e sem contacto com o fungo. Após 1h verificava-se um aumento dos níveis daquele composto em raízes em contacto com o fungo, com diminuição ulterior. Os mecanismos subjacentes a esta dinâmica de produção – inactivação de H_2O_2 são objecto de estudo neste momento.

Ensaio de micorrização de germinantes de *Castanea sativa* em estufa e viveiro: sobrevivência à aclimação e taxas de crescimento

Frank (1894) demonstrou, pela primeira vez, a necessidade de micorrização de espécies florestais. Árvores de muitas espécies incluindo da família *Pinaceae* não se desenvolvem normalmente se não tiverem micorrizas. Projectos de reflorestação com espécies ectomicorrízicas falham inevitavelmente na ausência de micorrizas funcionais (Marx et al. 1991). A micorrização controlada das espécies florestais leva ao estabelecimento da associação, na estufa ou viveiro, de raízes de plantas jovens com estirpes fúngicas micorrízicas (Le Tacon et al. 1997). A formação de micorrizas em germinantes de espécies florestais no viveiro pode melhorar as condições fisiológicas desses germinantes e as suas capacidades de adaptação e crescimento após transplante (Marx et al. 1991). Após transferência para o campo, as micorrizas asseguram uma melhor sobrevivência, um melhor crescimento ou mesmo uma maior resistência das plantas a agentes patogénicos (Le Tacon et al. 1997).

Os primeiros ensaios de micorrização controlada em estufas florestais foram realizados na segunda década do século XX, na Austrália. Após estes trabalhos têm tido lugar muitos outros em vários países diferentes (França, Estados Unidos da América, Espanha, Canadá, China e Filipinas entre outros) (Le Tacon et al. 1997).

A maioria dos trabalhos de inoculação controlada de fungos micorrízicos baseia-se em duas premissas (Marx et al. 1991): (1) é preferível o estabelecimento de uma micorriza com as raízes de um germinante ou de uma estaca, com um qualquer fungo, do que a não existência de micorrizas; (2) algumas espécies de fungos ectomicorrízicos são mais benéficas do que outras para determinadas condições ambientais. Os fungos mais utilizados em programas de inoculação são *Pisolithus tinctorius* e *Laccaria bicolor*. Estes fungos têm sido produzidos em larga escala para aplicação em programas de reflorestação.

Existem diversas razões para proceder à inoculação de fungos micorrízicos num viveiro de produção de plantas florestais. A desinfecção total ou parcial dos solos das estufas e/ou dos viveiros florestais realiza-se para eliminar agentes patogénicos que atacam os germinantes ou que provocam necroses radiculares. Esta desinfecção, em numerosos casos, destrói os fungos micorrízicos levando a dificuldades de sobrevivência e crescimento dos germinantes ali produzidos. A reconstituição do complexo ectomicorrízico após desinfecção do solo/substrato é lenta e faz-se de forma aleatória. Nestas circunstâncias, a heterogeneidade de fungos que naturalmente se instalam, leva a respostas diversas pelas plantas, quer em termos de sobrevivência, quer em termos de crescimento durante o primeiro ano de vida. Nestas circunstâncias, é desejável a inoculação micorrízica (Le Tacon et al. 1997). Nos Estados Unidos, 95% dos substratos e solos das estufas e dos viveiros florestais são desinfectados antes da sementeira. A inoculação de fungos micorrízicos tornou-se uma prática comum sendo, actualmente, realizada em grande escala. Em 1990, no Sudoeste dos Estados Unidos, dez milhões de sementes de pinheiro (1+0) foram inoculadas artificialmente com *Pisolithus tinctorius*. Em 1996 este número subiu para dezoito milhões (Marx 1997 comunicação pessoal) atingindo dois mil milhões em 2000 (Lakhanpal 2000).

A baixa eficiência do inóculo disponível nos solos e substratos de viveiros e estufas pode ser motivo para se proceder a uma inoculação controlada (Grove & Maljczuk 1994). *Telephora terrestris* é uma espécie micorrízica com grande capacidade para se desenvolver e produzir carpóforos em solos sujeitos a manipulação e desinfecção como os de estufas e viveiros. Esta espécie é conhecida pela sua elevada tolerância a substratos com estas características mas é, frequentemente, considerado como um fungo contaminante, uma vez que confere uma baixa vantagem às plantas com que se associa em termos de sobrevivência ou crescimento. A incidência de fungos como *T. terrestris* pode ser diminuída com a inoculação de espécies mais eficientes (Grove & Maljczuk 1994).

P. tinctorius tem diferentes características que o tornam adequado para aplicação em programas de inoculação controlada: (1) é um fungo com uma vasta distribuição geográfica e que coloniza uma vasta gama de hospedeiros; (2) apresenta tolerância a numerosos stresses ambientais (temperatura, baixa fertilidade p. ex.); (3) pode ser facilmente propagado em laboratório numa variedade de meios sólidos e líquidos; (4) a cor das suas hifas (amarelo - dourado - mostarda) facilita a detecção e quantificação de ectomicorrizas nas raízes das plantas; (5) produz abundantes cordões de hifas extramatriciais quer em cultura pura quer nas raízes, podendo, desta forma, aumentar a eficiência da absorção de nutrientes e água; (6) os carpóforos de *P. tinctorius* são facilmente identificados sem observação microscópica, porque os esporos castanho-amarelados produzidos em compartimentos (peridiolos) são uma característica única. Este fungo tem um número de hospedeiros superior a 50 e, em condições naturais, conhecem-se associações com outras 25 espécies.

Foi relatada a sua ocorrência em 33 países. Além de existir em locais com condições adversas, foi encontrado em áreas urbanas, pomares, diferentes habitats florestais e, ocasionalmente, em viveiros (Marx et al. 1984, 1991). A sua ocorrência em povoamentos de castanheiro no nordeste transmontano está inventariada, sendo mesmo relatada a sua importância etnomicológica local, dado que eram usados para tingir lã e têm a designação local de “pintões”.

Na sequência de anteriores trabalhos de micorrização de plantas de castanheiro (*Castanea sativa*), iniciámos um trabalho de produção de inóculo micorrízico tendente à realização de inoculações em estufa e viveiro, para avaliação do efeito da micorrização em condições de terreno. Para o efeito, iniciou-se um projecto de Consórcio, no sentido de produzir inóculo micorrízico e micorrizar germinantes de castanheiro em estufa, com ulterior transferência para o viveiro da Empresa. O efeito da aplicação de inóculo micorrízico na sementeira foi avaliado em termos das taxas de germinação, da sobrevivência e do crescimento ao longo do processo de germinação e aclimação (Fig. 3).

A inoculação do fungo no substrato não influenciou as taxas de germinação. A germinação deu-se segundo um padrão idêntico quer em substrato inoculado quer não inoculado, uma vez que mais de 75% das sementes se encontravam germinadas aos 10 dias em qualquer dos anos de ensaio, e as restantes germinaram nos 20 dias seguintes. O crescimento das plantas é influenciado pela micorrização, sobretudo no que se refere à relação altura/diâmetro a nível do colo, evidenciando, nestas plantas, maior robustez, ou seja um maior engrossamento dos caules comparativamente com as não inoculadas. A inoculação do substrato na sementeira revelou-se mais favorável ao crescimento das plantas do que a inoculação do fungo quando da plantação (Fig. 3). Em termos de peso fresco e seco, a micorrização influencia a relação peso seco/peso fresco das plantas (Ps/Pf). As diferenças nas relações Ps/Pf entre plantas micorrizadas e não micorrizadas revelam uma maior produtividade (expressa em maior massa seca por unidade de massa fresca) em plantas micorrizadas. As plantas micorrizadas instaladas em viveiro infectado com *Phytophthora cinnamomi* apresentam maior sobrevivência do que as não micorrizadas. O uso da inoculação de *P. tinctorius* como ferramenta biológica para aumentar a sobrevivência e crescimento das plantas em solos pobres e em locais degradados tinha já sido sugerido por Marx et al. (1984, 1991). Os resultados de sobrevivência de plantas M em solos contaminados revelam que as micorrizas podem ser utilizadas como ferramenta biológica para ultrapassar estes problemas de contaminação. O aumento de sobrevivência que, geralmente, justifica o interesse económico da inoculação micorrízica (Kropp & Langlois 1990, Kuek 1994) parece poder também aplicar-se à micorrização de plantas de castanheiro, desde que se evitem os constrangimentos metodológicos que diminuem a eficácia da micorrização.

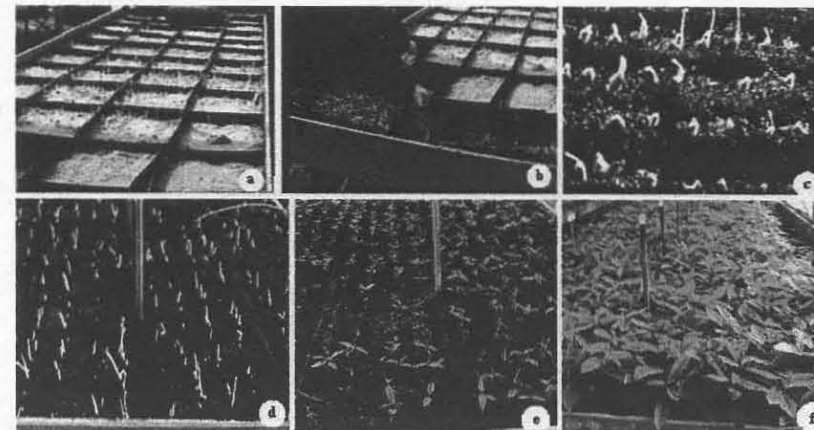


Fig. 3 – Estratificação (a, b), sementeira (c), germinação (d, e) e desenvolvimento de germinantes de castanheiro (f) em condições controladas (Martins - Estufas da Escola Superior Agrária de Bragança – Projecto PRAXIS MESOCASMIC).

Estudos em curso e perspectivas futuras

As perspectivas de trabalho no âmbito da propagação e micorrização controlada de castanheiro passam pela inventariação das espécies de cogumelos que ocorrem nos povoamentos (Martins et al. 2002). Neste sentido, tem vindo a ser desenvolvido o projecto AGRO 689, do qual se apresentam os resultados referentes à primeira época de colheita nas figuras 4 e 5.

Ao longo da época de amostragem de 2004, no souto foram apenas colhidas oito espécies, pertencentes a cinco géneros, sendo os mais representados *Inocybe* e *Tricholoma*. As espécies que surgiram em maior quantidade (expressa em número de carpóforos encontrados) foram *Inocybe geophylla*, *Inocybe flocculosa* e *Hebeloma crustuliniforme*.

Quanto aos grupos funcionais, no souto surge uma clara dominância dos macrofungos micorrízicos (Figura 4).

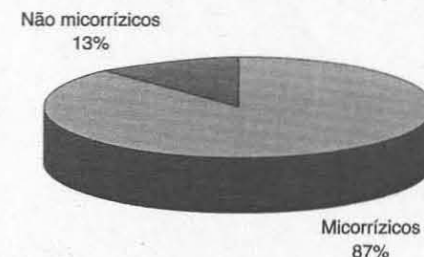


Fig. 4 – Percentagem de espécies de macrofungos micorrízicos e não micorrízicos, do total colhido no souto, durante o período de amostragem.

Verificou-se um aumento substancial do número de espécies durante o mês de Novembro, para depois decair o valor no mês de Dezembro (Figura 5).

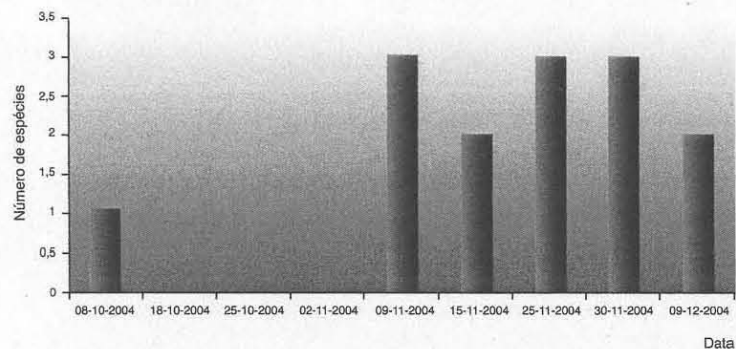


Fig. 5 – Número de espécies encontradas no souto durante o período de amostragem.

O número de carpóforos colhidos, durante o período de amostragem, teve um crescimento gradual, atingindo valores elevados no final do mês de Novembro (dia 25), data a partir da qual se registou um decréscimo do seu número (Figura 6).

A produção de carpóforos registada no souto ficou aquém do esperado, uma vez que trabalhos anteriormente desenvolvidos (Meireles, 1997; Barrote, 1998; Estevinho, 1998; Martins et al., 2002; Baptista et al., 2003a, b) têm vindo a demonstrar que, associada a este habitat, existe uma grande biodiversidade macrofúngica. As condições climáticas do ano de 2004, com precipitações muito abaixo das normais para a época do ano e temperaturas inicialmente elevadas (Outubro/ meados de Novembro) e muito baixas a partir daí, podem estar na origem destes resultados. O trabalho de amostragem prolongar-se-á por mais dois anos, nos períodos de Primavera e Outono, pelo que estes resultados apresentam, além de um carácter atípico, uma natureza meramente preliminar.

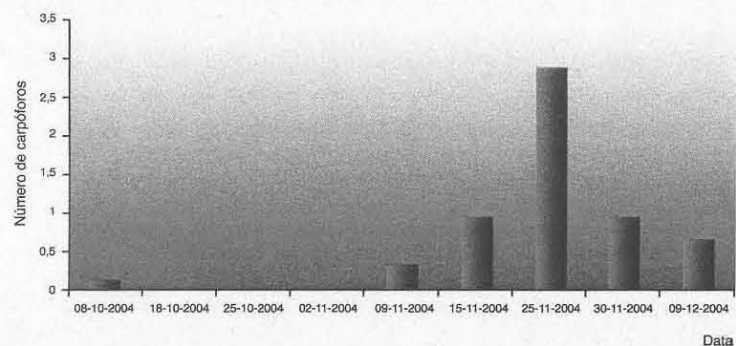


Fig. 6 – Número total de carpóforos colhidos no souto durante o período de amostragem.

O trabalho associado a este Projecto (Projecto AGRO 689 “Demonstração do papel dos macrofungos na vertente agronómica, económica e ambiental no Nordeste Transmontano. Aplicação à produção de plantas de castanheiro, pinheiro e carvalho”) passa ainda pelo isolamento dos fungos micorrízicos autóctones, produção de micélio e teste de eficiência de micorrização *in vitro*, para avaliação da possibilidade de aplicação em viveiro. Pretende-se ainda continuar os estudos de reconhecimento dos mecanismos de associação simbiótica e estabelecer comparação com os mecanismos de infecção planta - patógeno radicular no sistema castanheiro.

Referências Bibliográficas

- Azevedo NF, 1973: Micorrizas e doenças. Bol Soc Broteriana. 47: 337-346.
- Baptista P; Branco S, Martins A, 2003^a: Evaluation of the biodiversity and relative abundance of mycological flora in chestnut trees, *Castanea sativa* Mill., in the Northeast of Portugal: preliminary results. 4rd International Conference on Mycorrhizae ICOM4, Canadá (Montreal), 10-15 Agosto 2003.
- Baptista P, Branco S and Martins A, 2003b. Preliminary evaluation of edible mushroom biodiversity and production in the Northeast of Portugal. 3rd International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms: Ecology, Physiology and Cultivation, Canadá (Victoria), 17-19 Agosto 2003.
- Barrote S, 1998: Organização de um herbário de macromicetas na Escola Superior Agrária de Bragança. Trabalho de fim de Curso de Licenciatura em Engenharia Florestal. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, 36 pp.
- Bestwick CS, Brown IR, Mansfield JW, 1998: Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 118: 1067-1078.
- Biondi S, Canciani, L. De Paoli G, Bagni, L, 1981: Shoot formation from bud cultures of mature chestnut. In: Colloque Internationale sur la Culture *In vitro* Des Éssences Forestières- AFOCEL IUFRO, Fontainebleau, 181-185.
- Boyd R, Furbank RT, Read DJ, 1986: Ectomycorrhiza and the water relations of trees. In: *Mycorrhizae, Physiology and Genetics.* Gianinazzi-Pearson, S.Gianinazzi (eds), pp 689-693. INRA, Paris.
- Breisch H, Boutitie A, Reyne J, Salesses G, Vaysse P, 1995: Chataignes et marrons. Ctfil. 238 pp.

- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D, Botton B, 2002: An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil*. 244: 165-175.
- Chèvre AM, Gill SS, Mouras A, Salesses G, 1983. *In vitro* végétative multiplication of chestnut. *J. Hort. Sci.* 58: 23-29.
- Dosskey MG, Boersma L, Linderman RG, 1991. Role for the photosynthate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas fir seedlings to drying soil. *New Phytologist*. 117: 327-334
- Duchesne LC, Peterson RL, Ellis BE, 1988a: Pine root exudate stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.* 108: 471-476.
- Duchesne LC, Peterson RL, Ellis BE, 1988b: Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.* 66: 558-562.
- Duddridge JA, Malibari A, Read DJ, 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*. 287:235.
- Estevinho I, 1998: Avaliação do estado de micorrização e parâmetros de crescimento de plantas micropropagadas de castanheiro, após micorrização *in vitro*. Trabalho de fim de Curso de Gestão de Recursos Florestais. Escola Superior Agrária de Bragança. 57 pp.
- Feijó JA, 1989: Propagação *in vitro* de *Castanea sativa* Mill. Dissertação de Mestrado em Secreção Vegetal e Produtos Naturais Renováveis. Universidade de Lisboa.
- Feil W, Kottke I., Oberwinkler F, 1988: The effect of drought on mycorrhizal production and very fine root system development of norway spruce under natural and experimental conditions. *Plant and Soil*. 108: 221-231.
- Frank AB, 1894: Die bedeutung der mykorrhiza-pilze für die gemeine Kiefer. *Fortwissenschaftliches Centralblatt*. 16.: 185-190. In: Smith & Read 1997.
- Garbaye J, Churin J-L, 1997: Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. *For. Ecol. Manag.* 98: 221-228.
- Grove TS, Malajczuk N, 1994: The potential for management of ectomycorrhizae in forestry. In: Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. AD Robson, LK Abbott, N Malajczuk (Eds.). 201-210.

- Guehl JM, J Garbaye and A Wartinger, 1992: The effects of ectomycorrhizal status on plant-water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas Fir. In: Mycorrhizas in Ecosystems. Eds. D. J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter and I. J. Alexander, pp. 323-332. C.A.B. International.
- Guerrero E, Rivillas C, Rivera EL, 1996: Perspectivas de manejo de la micorriza arbuscular en ecosistemas tropicales. Bogota, Fondo Fen. Colombia, 181-206
- Jacquot C, 1947: Effect inhibiteur des tannins sur le développement des cultures *in vitro* du cambium de certains arbres fruitiers. *C.R. Acad. Sci. Ser.D.* 226: 434-436. In Vieitez et al. 1986
- Kope HH, Fortin JA, 1990: Antifungal activity in culture filtrates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Bot.* 68: 1254-1259.
- Lamb C, Dixon RA, 1997: The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:251-275.
- Le Tacon F, Mousain D, Garbaye J, Bouchard D, Churin J-L, Argillier C, Amirault J-M, Généré B, 1997: Mycorrhizes, pépinières et plantations forestières en France. *Revue Forestière Française*. Numéro Sp. 131-154.
- Martins A, 1992: Micorrização *in vitro* de plantas micropropagadas de *Castanea sativa* Mill. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Martins A, 2004: Micorrização controlada de *Castanea sativa* Mill.: Aspectos fisiológicos da micorrização *in vitro* e *ex vitro*. Dissertação de doutoramento em Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências de Lisboa. Universidade Clássica de Lisboa. 506 pp.
- Martins A, Barroso J, Pais MS, 1996: Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza* 6: 265-270.
- Martins A, Casimiro A, Pais MS, 1997: Influence of mycorrhization on physiological parameters of *Castanea sativa* Mill micropropagated plants. *Mycorrhiza*. 7: 161-165.
- Martins A, Santos MM, Santos H, Pais MS, 1999: A ³¹P NMR study of phosphate levels in roots of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal *Castanea sativa* Mill. *Trees*. 13: 168-172.
- Martins A, Baptista P, Sousa MJ, Meireles T and Pais MS, 2002: Edible mycorrhizal fungi associated with *Castanea sativa* Mill. trees in the North-east of Portugal. In: Edible mushrooms and their cultivation.

- Second International Workshop on Edible Mycorrhizal Fungi. Eds. Ian Hall, Wang Yun, Eric Danell & Alessandra Zambonelli. ISBN 0-478-10828-X.
- Marx DH, 1969: The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. 59: 153-163.
- Marx DH, 1974: Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopatol.* 10, 429-454. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Marx DH, Cordell CE, 1989: Use of ectomycorrhizas to improve forestation practices. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. JM Whipps, RD Lumsden (eds). Cambridge.
- Marx DH, Cordell CE, Kenney DS, Mexal JG, Artman JD, Riffle JW, Molina RJ, 1984: Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. *Suppl. Forest Science. Monograph* 25. Vol. 30. nº 3. 101 pp.
- Marx DH, Davey CB, 1969a: The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathol.* 59. 549-558.
- Marx DH, Davey CB, 1969b: The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. IV. Resistance of naturally occurring mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*. 59: 559-565.
- Marx DH, Ruehle JL, Cordell CE, 1991: Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: *Methods in Microbiology*. Vol 23. JR Norris, DJ Read, AK Varma Eds. 384-411.
- Meireles MT, 1997: Inventário e Isolamento dos macromicetas de um castinçal do Distrito de Bragança. Trabalho de fim de Curso de Gestão de Recursos Florestais financiado no âmbito do projecto PRAXIS Consórcio - MESOCASMIC - Melhoramento da Sobrevivência de Castanheiro por Micorrização, através da bolsa PRAXIS XXI/BTI/12363/96
- Meyer FH, 1987: Extreme site conditions and ectomycorrhizae (especially *Cenococcum geophyllum*). *Mycorrhiza and Plant Stress*. *Mycorrhiza und bei Pflanzen*. *Angew. Bot.* pp.39-46.
- Mullins KV, 1987: Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Hort.* 212: 525-530.

- Mushin TM, Zwiazek JJ, 2002: Ectomycorrhizas increase apoplastic water transport and root hydraulic conductivity in *Ulmus americana* seedlings. *New Phytol*, 153, 153 -, 158.
- Perrin R, 1985: L'aptitude des mycorhizes à protéger les plantes contre les maladies: panacée ou chimère? *Ann. Sci. For.* 42 (4): 453-470. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Perrin R, Garbaye J, 1983: Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium*-infested soils and substrates: *Plant and Soil*, 71: 345-351.
- Prasad MNV, Rengel Z, 1998: Plant acclimation and adaptation to natural and anthropogenic stress. *Ann. New York Acad. Sci.* 851: 216-223.
- Rodriguez R, 1982: *In vitro* propagation of *Castanea sativa* Mill. through meristem tip culture. *Hortscience*, 17: 888-889.
- San José MC, Ballester A, Vieitez AM, 2001: Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. *J. Hort. Sci. Biotec.* 76: 588-595.
- San José MC, Vieitez AM, Vieitez E, 1984: *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. *J.Hort. Sci.* 59: 359-365.
- Scandalios JG, 1993: Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101. 7-12.
- Shi L, Guttenberger M, Kottke I, Hampp R, 2002: The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.): changes in community structure and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. *Mycorrhiza*. 12: 303-311.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Myigawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K, 2002: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53. 372: 1305-1319.
- Smith SE, Read DJ, 1997: *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. pp 605.
- Stenström E, Damm E, Unestam T., 1997: Le rôle des mycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol. *Rev. For. Fr.* nº sp. 121- 128.
- Strullu, D.G, Grellier, B, Marciniak, D, Letouzé, R, 1986: Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal synthesis *in vitro*. *New Phytol*, 102: 95-101.
- Ūrsic M, Peterson RL, Husband B, 1997. Relative abundance of mycorrhizal fungi and frequency of root rot on *Pinus strobus* seedlings in a southern Ontario nursery. *Can. J. For. Res.* 27: 54-62.

- Vieitez AM, Ballester A, Vieitez ML, 1975: Conyferyl alcohol from of *Castanea sativa* cultured *in vitro*. *Experientia*. 31, 1163.
- Vieitez AM, Ballester A, Vieitez ML, Vieitez E, 1983: *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.* 58: 457-463.
- Vieitez AM, Gonzalez ML, Vieitez ML, 1978a: *In vitro* culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill.. *Sci. Hort.* 8: 243-247.
- Vieitez AM, Gonzalez ML, Vieitez ML, 1978b: Root formation on cotyledon tissue of chestnut *in vitro*. Inaugural Meeting FESPP, Edinburgh (Abstr.). pp. 552-553.
- Vieitez AM, Vieitez ML, 1980: Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J. Hort.Sci*, 55: 83-84.
- Vieitez AM, Vieitez ML, 1983: *Castanea sativa* plantlets proliferation from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hort*, 18: 343-351.
- Vieitez AM, Vieitez ML, Ballester, A, 1981: *In vitro* chestnut regeneration: anatomical and chemical changes during the rooting process. *Proc. Coll. Int. Cult. In vitro* Essences For. IUFRO. Fontainebleau. France, AFOCEL, pp, 148-152.
- Vieitez AM, Vieitez ML, Vieitez E, 1986: Chestnut (*Castanea* spp.), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Bajaj, YPS, Ed, Springer Verlag, Berlin, Vol, 1 -Trees- 393-414.
- Vrot F, Grente J, 1985: Recherche d'un moyen de lutte biologique la maladie de l'encre du châtaignier par utilisation de la symbiose mycorhizienne. *Agronomie*, 5 (6): 558-559.
- Wojtaszek P, 1997: Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.