

VARIACIÓN DE LA TASA DE ENRAIZAMIENTO ASOCIADA AL NÚMERO DE SUBCULTIVO Y DIÁMETRO DE MICROTALLOS DE CASTAÑO  
*Castanea sativa* MILL.

Rooting rate variation related to subculture number and diameter of chestnut  
*Castanea sativa* Mill. microshoots

Darcy Ríos L.<sup>1</sup>\*, Fabiola Avilés M.<sup>1</sup>, Manuel Sánchez-Olate<sup>1</sup>, René Escobar R.<sup>1</sup>  
y Guillermo Pereira C.<sup>2</sup>

ABSTRACT

This study had the objective of determining the subculture number and the shoot basal diameter that produces the best rooting rate *ex vitro* of chestnut, *Castanea sativa* Mill., microshoots obtained via *in vitro* culturing. The plant material corresponded to microcuttings obtained from embryo cultures with between 7 and 12 subcultures in the proliferative stage, for which Driver and Kuniyuki Walnut (DKW) medium was used with the macronutrients reduced to a half and supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> indole-3-butyric acid (IBA). The quick induction rooting method was used, submerging the base of the microcuttings in a solution of 0.5 mg mL<sup>-1</sup> of IBA for 15 min. For the rooting stage, pine bark:perlite (4:1, v/v) substrate was used, carrying out the evaluation of results at 20 days after culturing. The evaluated variables were survival rate (%), rooting rate (%), root number, root length (mm), callus presence and visual aspect of the rooting system. The results showed a decrease of rooting capacity as the subculture number increases. The factor microcutting diameter did not present significant differences with respect to the evaluated variables.

**Key words:** chestnut, micropropagation, *in vitro* culture.

RESUMEN

Este estudio tuvo por objeto determinar el número de subcultivo y el diámetro basal en el cual se obtiene la mayor tasa de enraizamiento *ex vitro* para microtallos de castaño, *Castanea sativa* Mill., obtenidos vía cultivo *in vitro*. El material vegetal correspondió a microtallos provenientes del cultivo de embriones con entre 7 y 12 subcultivos durante la etapa de proliferación, para la cual se utilizó medio Driver y Kuniyuki Walnut (DKW) con los macronutrientes reducidos a la mitad y suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzilaminopurina (BAP) y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol 3-butírico (AIB). Se utilizó el método de inducción rápida de enraizamiento sumergiendo los tallos en una solución de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de AIB durante 15 min. Para la etapa de enraizamiento, se utilizó como sustrato corteza de pino:perlita (4:1, v/v) evaluando los resultados a los 20 días de cultivo. Las variables evaluadas fueron tasa de supervivencia (%), tasa de enraizamiento (%), número de raíces, largo de raíces (mm), presencia de callo y aspecto del sistema radicular. Los resultados mostraron una disminución de la capacidad de enraizamiento a medida que aumenta el número de subcultivo. El factor diámetro de microtallo no presentó diferencias significativas respecto a las variables evaluadas.

**Palabras clave:** castaño, micropropagación, cultivo *in vitro*.

<sup>1</sup>Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Victoria 631, Concepción, Chile.

E-mail: drios@udec.cl \*Autora para correspondencia.

<sup>2</sup>Universidad de Concepción, Departamento de Ciencias Forestales, Unidad Académica Los Ángeles, Casilla 341, Los Ángeles, Chile.

Recibido: 10 de noviembre de 2003. Aceptado: 20 de abril de 2004.

## INTRODUCCIÓN

El castaño (*Castanea sativa* Mill.) presenta ventajas importantes para su cultivo en Chile respecto de otros países. Según Loewe *et al.* (1995), los rendimientos en producción de frutos son mayores a los promedios europeos, aún con un manejo rústico y sin elección de variedades, a lo que es posible agregar la ausencia de agentes patógenos de importancia (Benedetti y Subiri, 2000). Sin embargo, pese a las ventajas que presenta Chile para su cultivo, existen también inconvenientes importantes, entre ellos la escasez de oferta de castaño, que ha determinado en gran medida los bajos niveles de comercialización y los altos precios que alcanza la madera. En lo relativo al fruto, uno de los grandes problemas en la comercialización se debe a la falta de homogeneidad, calibre y desconocimiento de las variedades cultivadas, entre otras (Loewe *et al.*, 1998).

Para corregir las limitaciones mencionadas anteriormente, es imprescindible contar con un stock suficiente de plantas de castaño de las variedades adecuadas para la comercialización del fruto. Esto no es posible a partir de plantas originadas de semillas, ya que se produce una gran variabilidad genética de los individuos resultantes. Por otro lado, dentro de las técnicas de propagación asexual, la macropropagación se hace difícil, ya que el castaño es una especie altamente recalcitrante, lo que dificulta su enraizamiento (Sierra, 2001). Sin embargo, mediante la micropropagación es posible producir masivamente plantas de diferentes variedades de castaño, cuyas características de producción y tipo de fruto ya se encuentran establecidos (Hartmann y Kester, 1998).

No obstante, es importante considerar que las características anatómicas y fisiológicas (como el diámetro de tallo y contenidos hormonales endógenos de las plantas micropropagadas) hacen necesaria para su supervivencia en condiciones *ex vitro*, una adaptación o aclimatación gradual a las condiciones medioambientales del invernadero y posteriormente del campo, siendo imprescindible contar con un sistema radicular adecuado (Gonçalves *et al.*, 1998).

Pierik (1990) señala que el proceso de formación del sistema radicular está influenciado por diversos factores. Entre éstos se menciona el número de subcultivos que han sufrido los microtallos antes de su enraizamiento. En cuanto a la importancia de este factor, se ha demostrado que la formación de raíces declina con los subcultivos sucesivos (Norton y Norton, 1986, citados por Pierik, 1990). Sin embargo, en cultivos de manzano (*Malus domestica*) var. Jonathan, se ha encontrado que con un número creciente de subcultivos, el porcentaje de enraizamiento aumenta, desde 0 hasta 100% después de nueve subcultivos. Respecto al cultivo del castaño, Sánchez *et al.* (1997) encontraron tendencia de un aumento del porcentaje de enraizamiento con subcultivos jóvenes (desde el 1° al 6° subcultivo). Sin embargo, no aclaran si esta tendencia continúa con subcultivos posteriores, o si se revierte. Por lo tanto, queda de manifiesto que el número de subcultivos influye en la tasa de enraizamiento de una especie micropropagada.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el número de subcultivos y el diámetro basal en el cual se obtiene la mayor tasa de enraizamiento *ex vitro* para microtallos de *Castanea sativa* obtenidos vía cultivo *in vitro*, parámetros necesarios de establecer cuando se necesita un programa de producción de plantas mediante técnicas de micropropagación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Forestal de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile, durante el año 2002. Se utilizaron microtallos de *Castanea sativa* Mill. generados a partir de cadenas proliferativas inducidas desde el cultivo de embriones maduros aislados, realizándose subcultivos en intervalos de cinco semanas. El material vegetal utilizado correspondió a aquel que tenía entre 7 y 12 subcultivos, en los cuales se clasificaron los microtallos según su diámetro de cuello, obteniendo tres clases diamétricas: < 1,5 mm; 1,5 - 3,0 mm; y > 3,0 mm.

Los microtallos de cada subcultivo y clase diamétrica se seleccionaron de acuerdo a

características morfológicas (grado de desarrollo y turgor de las hojas, entre otras) y estado sanitario, con una longitud aproximada de 25 a 30 mm.

El medio de cultivo utilizado durante la etapa de proliferación fue el medio DKW, desarrollado por Driver y Kuniyuki (1984) para nogal (DKW) suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol 3-butírico (AIB) y sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>). El pH se ajustó a 5,8 y después de adicionar 7 g L<sup>-1</sup> de agar agar, la mezcla se dispensó en recipientes de vidrio conteniendo 25 mL de medio, los cuales se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1 atm de presión por 20 min.

El método de enraizamiento utilizado en este estudio correspondió al método de inducción rápida, recomendado por Dinamarca (2002). Para ello, se sumergió 1 cm de la parte basal de cada microtallo en una solución de AIB de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> por 15 min. Posteriormente, los microtallos se llevaron al medio de enraizamiento correspondiente a una mezcla de corteza de pino:perlita (4:1, v/v) previamente esterilizado en autoclave, dispuesta en una bandeja de plástico de color blanco de dimensiones (45 x 12 x 10 mm) con tapa transparente. Esta bandeja se colocó en cámara de cultivo a fotoperíodo de 16 h, con una intensidad lumínica de 3.000 lux, temperatura de 25 ± 1°C día/ 22 ± 1°C noche, y humedad relativa aproximada de 40%. El riego se realizó cada tres días con agua estéril. La evaluación de los microtallos se realizó a los 20 días de cultivo. Las variables cuantitativas fueron: tasa de super-

vivencia (%), tasa de enraizamiento (%), número de raíces/microtallo y longitud de raíz más larga (mm). Las variables cualitativas fueron presencia o ausencia de callo, apariencia de los microtallos y apariencia del sistema radicular en cuanto a la fibrosidad y presencia de pelos radiculares y raíces secundarias.

Se utilizó un diseño completamente al azar (Montgomery, 1991). En el caso de la supervivencia y la tasa de enraizamiento las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de diferencia mínima significativa ( $P \leq 0,05$ ). La unidad muestral estuvo conformada por grupos de tres microtallos, realizando cinco repeticiones para cada tratamiento. Las variables largo de raíces y número de raíces por microtallo se analizaron sólo en base a microtallos enraizados y por tanto los tratamientos no tenían un número fijo de repeticiones, se utilizó la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ ) (Montgomery, 1991), situación en que la unidad muestral correspondió al microtallo enraizado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Porcentaje de supervivencia

Los resultados obtenidos muestran que la tasa de supervivencia de microtallos es afectada significativamente por el número de subcultivos (Cuadro 1). La mayor tasa de supervivencia al final del experimento se obtuvo con microtallos del octavo subcultivo. Por otro lado, los microtallos del subcultivo 12 sólo permanecieron vivos hasta los 20 días de cultivo. Estas

**Cuadro 1. Supervivencia (%), enraizamiento (%), número de raíces y largo de raíces (mm) de microtallos de *Castanea sativa* Mill. respecto del número de subcultivo.**

**Table 1. Survival (%), rooting (%), number of roots and length of roots (mm) of microcuttings of *Castanea sativa* Mill. with respect to subculture number.**

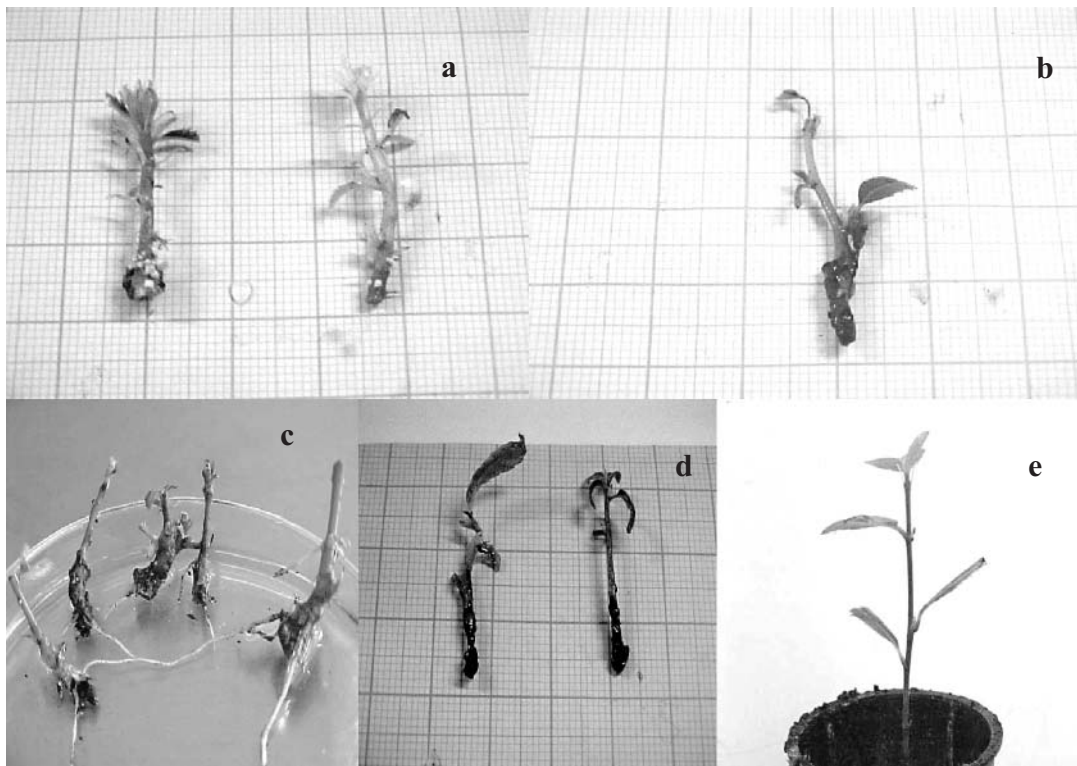
Subcultivo	Supervivencia (%)	Enraizamiento (%)	Número de raíces	Largo de raíces (mm)
7°	71,2 ab	13,3 bc	2,8 a	16,7 a
8°	80,0 a	31,0 a	1,4 b	5,6 b
9°	68,9 ab	28,8 ab	1,5 ab	4,4 b
10°	55,6 b	24,4 ab	1,8 ab	5,0 b
11°	24,4 c	4,4 c	2,0 ab	5,0 b
12°	2,2 d	0,0 c	Sin raíces	Sin raíces

Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de diferencia mínima significativa ( $p \leq 0,05$ ).

observaciones confirmaron que el porcentaje de supervivencia declina con el aumento del número de subcultivos, lo que coincide con resultados obtenidos por Vieitez *et al.* (1985), quienes asocian este comportamiento al proceso de hiperhidratación que sufren los microtallos. En este estudio se evidenció hiperhidricidad a partir del subcultivo 10 (Figura 1a), identificándose como la principal causa de mortalidad de microtallos durante el proceso de enraizamiento. La hiperhidricidad estaría relacionada con la concentración de citoquininas, auxinas e iones amonio, lo que generaría un efecto acumulado que provoca una disminución de la supervivencia

de los microtallos durante el proceso de enraizamiento (Vieitez *et al.*, 1985; Deberg y Maene, 1985, citado por Pâques y Boxus, 1987; Dencso, 1987).

El factor diámetro de los microtallos no presentó diferencias significativas, lo que indica que este factor no afecta el porcentaje de supervivencia durante el enraizamiento (Cuadro 2). Sin embargo, los resultados muestran una tendencia de aumento en la supervivencia respecto del aumento del diámetro de microtallos lo que podría explicarse porque, con una mayor cantidad de tejido de reserva y mayor desarrollo y lignificación de los



**Figura 1.** Aspecto de microtallos de *Castanea sativa* Mill. durante el proceso de enraizamiento: a) Microtallos provenientes del subcultivo 11 en proceso de hiperhidratación; b) Microtallo con necrosis apical; c) Microtallos enraizados sin desarrollo de brotes provenientes del subcultivo 7; d) Microtallos no enraizados con presencia de brotes y hojas provenientes del subcultivo 8; e) Plántula en proceso de aclimatación con desarrollo de hojas y brotes a los 70 días de cultivo.

**Figure 1.** Aspect of microcuttings of *Castanea sativa* Mill. during the rooting process: a) Hyperhydrated microcuttings coming from 11<sup>th</sup> subculture; b) Microcutting with apical necrosis; c) Rooted microcuttings without development of shoots from 7<sup>th</sup> subculture; d) Unrooted microcuttings with the presence of shoots and leaves from 8<sup>th</sup> subculture; e) Rooting plantlet with developing shoots and leaves after 70 days of culturing in the process of acclimatization.

tejidos protectores, se evita la desecación (Ríos *et al.*, 2002a), permitiendo una mayor supervivencia de los microtallos.

Otro aspecto importante fue el fenómeno de necrosis apical que se presentó en forma aleatoria en todos los tratamientos de enraizamiento *ex vitro* (Figura 1b). Este hecho ha sido reportado en condiciones *in vitro* por Dinamarca (2002), Micheli *et al.* (1993), Piagnani *et al.* (1996), Ríos *et al.* (2002b), Sánchez *et al.* (1997) y Vieitez *et al.* (1985) en las etapas de multiplicación, elongación o enraizamiento, produciéndose pérdida de un gran número de propágulos. Sin embargo, en *Castanea sativa* no existen estudios que reporten dicho comportamiento en condiciones de enraizamiento *ex vitro*, por lo que es posible inferir que este fenómeno es independiente a las condiciones de enraizamiento, pero dependiente del genotipo (Piagnani *et al.*, 1996), por lo que se explicaría el comportamiento aleatorio en la presencia de la necrosis apical en los microtallos provenientes de cultivo de embriones.

#### Porcentaje de enraizamiento y número de raíces

Los tratamientos que respondieron al proceso de enraizamiento, presentaron las primeras raíces entre los 10 y 12 días después de la inducción radicular, lo que coincide con los resultados obtenidos por Vieitez y Vieitez (1982) y por Dinamarca (2002).

El análisis del número de subcultivo respecto al porcentaje de enraizamiento, indica que existen diferencias significativas entre los distintos niveles (Cuadro 1). El mayor porcentaje de plantas

enraizadas se obtuvo en el subcultivo 8. Por el contrario, el valor más bajo se alcanzó en el subcultivo 12. Los resultados mostraron que en una primera etapa, el porcentaje de enraizamiento *ex vitro* aumenta hasta alcanzar los subcultivos 8, 9 y 10 para luego descender en los subcultivos siguientes. Esta tendencia coincide con lo reportado por Sánchez *et al.* (1997) para enraizamiento *in vitro* de microtallos de *C. sativa*, quienes evaluaron este proceso organogénico desde el primero al sexto subcultivo, siendo este último el que presentó el mayor porcentaje de enraizamiento.

La disminución del porcentaje de enraizamiento a partir del subcultivo 10, estaría relacionado con el proceso de hiperhidratación que se observa en microtallos cultivados *in vitro* durante el proceso de enraizamiento (Vieitez *et al.*, 1985), y que afecta negativamente el número de microtallos enraizados a medida que aumenta el número de subcultivos. Esto se relaciona también con los estudios realizados por Vidal *et al.* (1994), quienes encontraron que la concentración de BAP es inversamente proporcional al enraizamiento en microtallos de *C. sativa*. Este resultado, en particular, permite deducir que el efecto de subcultivos sucesivos, con microtallos expuestos por un mayor tiempo a altas concentraciones de citoquininas durante la fase de multiplicación, se traduce en un menor porcentaje de enraizamiento.

Un hecho importante es aquel que indica que la mayoría de los microtallos enraizados (Figura 1c) no presentaron desarrollo de brotes y hojas, en contraste con los microtallos no enraizados (mayoritariamente del subcultivo 8 en adelante),

**Cuadro 2. Supervivencia (%), enraizamiento (%), número de raíces y largo de raíces (mm) de microtallos de *Castanea sativa* Mill. respecto del intervalo diamétrico.**

**Table 2. Survival (%), rooting (%), number of roots and length of roots (mm) of microcuttings of *Castanea sativa* Mill. with respect to interval diameter.**

Intervalo diamétrico (mm)	Supervivencia (%)	Enraizamiento (%)	Número de raíces	Largo de raíces (mm)
d < 1,5	44,4 a	17,8 a	1,5 a	3,8 a
1,5 < d < 3,0	53,3 a	20,0 a	1,8 a	7,1 a
d > 3,0	54,4 a	14,4 a	1,9 a	8,9 a

Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de diferencia mínima significativa ( $p \leq 0,05$ ).

los cuales presentaron en general buen desarrollo de brotes y hojas (Figura 1d). La ausencia de crecimiento y desarrollo tanto de nuevos brotes como de hojas, ha sido asociada a los efectos de cambios en la relación citoquinina/auxina endógenas, lo cual está asociado a la inducción rizogénica mediada por AIB, reduciendo los niveles endógenos de la relación, situación que también ha sido observada en nogal (*Juglans regia* L.) (Sánchez-Olate, 1996). En el análisis bioquímico realizado por Vidal *et al.* (1994), se encontró que un alto coeficiente de multiplicación asociado a elevados contenidos de citoquininas endógenas, resulta en una baja tasa de enraizamiento, lo que explicaría la ausencia de raíces en microtallos con buen desarrollo de brotes y hojas. La cuestión es que si existen microtallos que no enraizan con aplicación de AIB en las concentraciones analizadas, podría indicar que se evidencian microtallos con requerimientos diferenciales de niveles endógenos de auxina, lo que no fue posible evaluar en la fase de selección de los microtallos para el proceso de rizogénesis adventicia analizado aquí. Asimismo, observaciones preliminares muestran que los microtallos enraizados de todos los tratamientos, logran la inducción de brotes y hojas a partir de los 70 días de cultivo (Figura 1e), momento en el cual el sistema radicular está en pleno desarrollo y expansión.

Respecto al análisis del diámetro de microtallo, éste no arrojó diferencias significativas entre los diferentes niveles (Cuadro 2). Lo anterior indicaría que el diámetro no influye en el enraizamiento de microtallos de *Castanea sativa*. Por su parte, el número de subcultivo se encuentra ligado al número de raíces por microtallo enraizado (Cuadro 1), ya que los resultados muestran diferencias significativas entre los subcultivos 7 (2,83 raíces por microtallo) y 8 (1,35 raíces por microtallo). Estos resultados coinciden con aquellos descritos por Sánchez-Olate (1996) para *Juglans regia*, quien obtuvo un mayor número de raíces en el sexto subcultivo.

No se encontraron diferencias significativas entre los distintos diámetros analizados; sin embargo, se observó una tendencia al aumento del

número de raíces, conforme aumenta el diámetro del microtallo (Cuadro 2). Esta situación ha sido descrita anteriormente, asociándose a una mayor cantidad de tejidos de reserva que contienen los microtallos más gruesos, lo que favorecería el desarrollo de las raíces (Hartmann y Kester, 1998; Ríos *et al.*, 2002a).

### Largo de raíces

La longitud de las raíces inducidas y manifestadas al final del ensayo, muestra diferencias significativas respecto de la variable número de subcultivo (Cuadro 1). Los subcultivos 8, 9, 10 y 11 no difieren entre sí; sin embargo, el subcultivo 7 presentó diferencias significativas respecto de los anteriores y alcanzó 16,7 cm.

La variable longitud de raíces no presenta diferencias significativas con respecto al diámetro del microtallo (Cuadro 2). Esta respuesta puede estar ligada al hecho que tallos más gruesos disponen de mayor cantidad de sustancias de reserva para aportar durante la fase de inducción y manifestación radicular (Sánchez-Olate, 1996; Ríos *et al.*, 2002a), al igual como ocurre con el número de raíces por microtallo. Finalmente, se observó que las raíces desarrolladas fueron gruesas, de aspecto fibroso y sin pelos radiculares, todo ello independiente del diámetro y del número de subcultivo (Figura 1c).

## CONCLUSIONES

La mayor tasa de enraizamiento *ex vitro* se obtiene entre los subcultivos 8 y 10, siendo los subcultivos 11 y 12 significativamente menores.

El diámetro de microtallo utilizado no influye significativamente en la tasa de enraizamiento, supervivencia y número y largo de raíces adventicias originadas.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores de la presente investigación agradecen a la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción por el apoyo brindado a nuestra línea de investigación mediante el Proyecto DIUC 99.140.007.1-0.

## LITERATURA CITADA

- Benedetti S., y M. Subiri. 2000. El castaño: una opción de producción forestal. 112 p. Ediciones LOM Ltda., Santiago, Chile.
- Dencso, I. 1987. Factors influencing hiperhidration of carnation and conifers. *Acta Hort.* 212:167-176.
- Dinamarca, P. 2002. Enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Castanea sativa* Mill. Tesis Ingeniero Forestal. 64 p. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile.
- Driver, D., and D. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19:507-509.
- Gonçalves, J., G. Diogo, M.T. Coelho, and S. Amancio. 1998. Effect of rooting conditions on survival and growth during acclimatization of micropropagated chestnut plants (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*). *Act. Hort.* 494:235-241.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1998. Propagación de plantas: Principios y prácticas. 760 p. Editorial Continental, Ciudad de México, México.
- Loewe, V., A Neuenschwander, y C. Alvear. 1995. El castaño en Chile: un cultivo fruto-forestal promisorio. Estudio de casos y análisis financiero. Informe Técnico N° 136. Instituto Forestal (INFOR), Santiago, Chile.
- Loewe, V., M. Toral, M. González, G. Pineda, C. Delard, y M. Subiri, *et al.*. 1998. Silvicultura de especies no tradicionales: una mayor diversidad productiva. Informe Final. 129 p. Documento de Trabajo N° 199. INFOR. Santiago, Chile.
- Micheli, M., V. Perrone, y A. Standardi. 1993. Possibilita' applicative della micropropagazione del castagno (*Castanea sativa* Mill.). Estratto de Cellulosa e Carta N° 5. p. 18-23.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. 589 p. Grupo Editorial Iberoamericana S.A., México.
- Pâques, M. and Ph. Boxus. 1987. Hiperhidration: a review of literature. *Acta Hort.* 212:155-166.
- Piagnani, C., G. Zocchi, and I. Mignani. 1996. Influences of Ca<sup>2+</sup> y 6-benziladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis (Abstract). *Plant Sci.* 188:89-95.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 326 p. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Ríos, D., M. Sánchez-Olate, M. Gea, y R. Rodríguez. 2002a. Nuevos sistemas experimentales para el estudio de la rizogénesis en nogal. *Agrociencia* 17:221-227.
- Ríos, D., M. Sánchez-Olate, R. Hasbún, y R. Escobar. 2002b. Estudios morfofisiológicos de la propagación *in vitro* de castaño (*Castanea sativa* Mill.). In Primer Congreso de las Ciencias Forestales. Octubre 2002. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Sánchez, M. C., A. Ballester and A.M. Vieitez. 1997. Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. *Ann. Sci. For.* 54: 359-370.
- Sánchez-Olate, M. 1996. Bases macromorfológicas y moleculares de la macropropagación de nogal (*Juglans regia* L.) cv. Serr. 203 p. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, España.
- Sierra, C. 2001. Propagación vegetativa de *Castanea sativa* Mill. y *Juglans regia* L., a través de estacas. 48 p. Tesis de Ingeniero Forestal. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile.
- Vidal, N., A. Ballester, M.C. Vieitez, C. Kevers, and Th. Gaspar. 1994. Biochemical characteristics of chestnut shoots related to *in vitro* multiplication and rooting capacities. *Adv. Horticultural Science* 8:19-24.
- Vieitez, A.M. and M.L. Vieitez. 1982. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hortic. (Canterbury, Engl.)* 18:343-351.
- Vieitez, A.M., A. Ballester, M.C. San José, and E. Vieitez. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. *Physiol. Plant.* 65:177-18.