

**DURACIÓN DEL EFECTO REVIGORIZANTE DE PODAS SEVERAS DE PLANTAS ADULTAS DE AVELLANO EUROPEO (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta SOBRE EL CULTIVO *IN VITRO***

**Duration of the reinvigorating effect of severe pruning of mature European hazelnut plants (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta with *in vitro* cultivation**

**Manuel Sánchez-Olate<sup>1\*</sup>, Darcy Ríos<sup>1</sup>, Roberto Rodríguez<sup>2</sup>, María Elena Materán<sup>3</sup>, Guillermo Pereira<sup>4</sup>**

**ABSTRACT**

The duration of the reinvigorating effect of severe pruning on mature European hazelnuts (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta was analyzed. The *in vitro* stimulation and proliferation rate of the resulting explants from cutting stimulation obtained from adult plants not pruned (T1), epicormic shoots of non-pruned plants (T2), once-pruned plants (T3) and plants pruned twice (T4) were evaluated. In a first stage, the response to climatic stimulation was evaluated using shoots between 25 and 35 cm length and basal diameters between 0.5 and 1.5 cm, obtained from T1, T2, T3 and T4 plants. In a second stage, the proliferation rate of *in vitro* explants generated by the climatic stimulation was evaluated. Results were analyzed by ANOVA using a completely random design. The positive effect of continuous severe pruning on the morphogenic capacity was confirmed, being significantly larger for T2 and T4 (100 and 87.5% stimulation, respectively). The *in vitro* multiplication rate was significantly larger in T2 and T4 (3.9 and 3.2 new shoots per explant, respectively), showing that epicormic shoots and severe pruning every two years are alternatives to obtain adequate plant material for *in vitro* multiplication of this species. It was also established that severe pruning does not significantly affect the physiology and development of explants, and that the reinvigorating effect of severe pruning has a duration near to two years. It is necessary to consider this treatment as a fundamental technique to keep the species vigorous.

**Key words:** hazelnut, *in vitro* culture, morphogenic capacity, mature tissue.

**RESUMEN**

Se analizó la duración del efecto revigorizante de podas severas de avellano europeo (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta adulto. Se evaluó la estimulación y la tasa de proliferación *in vitro*, sobre explantos resultantes de la estimulación de varetas obtenidas desde plantas adultas sin poda (T1), brotes epicórmicos de plantas sin poda (T2), plantas podadas una sola vez (T3) y plantas podadas dos veces (T4). En una primera etapa, se evaluó la respuesta a la estimulación climática utilizando varetas de entre 25 y 35 cm de largo y diámetros basales de entre 0,5 y 1,5 cm, obtenidas de plantas T1, T2, T3 y T4. En una segunda etapa, se evaluó la tasa de proliferación *in vitro* de explantos originados por la estimulación climática. Los resultados se analizaron mediante ANDEVA, utilizando un diseño completamente aleatorio. Se confirmó el efecto positivo de podas severas continuas sobre la capacidad morfogénica, siendo significativamente mayores para T2 y T4 (100 y 87,5% de estimulación, respectivamente). Las tasas de multiplicación *in vitro* fueron significativamente mayores en T2 y T4 (3,9 y 3,2 tallos nuevos por explanto, respectivamente), dejando de manifiesto que los brotes epicórmicos y podas severas cada dos años, son alternativas para la obtención de material vegetal adecuado para la multiplicación *in vitro* de esta especie. Además, se estableció que podar severamente no afecta significativamente la fisiología y desarrollo de explantos, y que el efecto revigorizante de las podas severas tiene una duración cercana a los dos años, siendo necesario considerar este tratamiento como una técnica fundamental para mantener el vigor de la especie.

**Palabras clave:** avellano, cultivo *in vitro*, capacidad morfogénica, tejido adulto.

<sup>1</sup> Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile. E-mail: msanche@udec.cl \*Autor para correspondencia.

<sup>2</sup> Universidad de Oviedo, Facultad de Biología, Oviedo, España. E-mail: rrodri@cpd.sci.uniovi.es

<sup>3</sup> Universidad Nacional Experimental de Guayana, Puerto Ordaz, Venezuela. E-mail: mmateran@uneg.edu.ve

<sup>4</sup> Universidad de Concepción, Unidad Académica Los Angeles, Los Angeles, Chile.

Recibido: 21 de marzo de 2003. Aceptado: 10 de mayo de 2003.

## INTRODUCCIÓN

En trabajos anteriores realizados en avellano europeo, *Corylus avellana* L. (Díaz-Sala *et al.*, 1994; Rey *et al.*, 1994a; Berros, 1996), se ha demostrado el efecto revigorizante inmediato de podas severas, observándose que la posibilidad de introducción *in vitro* de materiales adultos (Díaz-Sala *et al.*, 1990), así como la tasa de proliferación y enraizamiento, dependían de la aplicación de podas intensivas (Rey *et al.*, 1994b). Además se puso de manifiesto que una vez introducido *in vitro*, el material revigorizado incrementaba su rejuvenecimiento parcial a medida que aumentaba el número de subcultivos en presencia de BAP (Bencil amino purina) (Díaz-Sala *et al.*, 1995). De acuerdo a Rey *et al.* (1994a) estas respuestas macromorfológicas guardaban estrecha relación con cambios en los balances endógenos de poliaminas (PAs), con patrones proteicos, metilación de ADN (Díaz-Sala *et al.*, 1995) y según Fraga (2000) se asocia a la expresión de la subunidad grande de 1,5-ribulosa difosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y puesto que la revigorización es una vía factible que permite la manipulación del potencial organogénico no sólo en *C. avellana*, sino en todas las especies leñosas de interés, sobre todo de aquellas que no presentan manifestación espontánea de tejidos rejuvenecidos, como brotes epicórmicos, esferoblastos, etc. (Pacheco, 1995), pareció determinante comprobar en qué medida se mantiene el efecto revigorizante aplicado, ya que la determinación de la transitoriedad de dicho efecto incide directamente en dos aspectos aplicados: a) disminuir la frecuencia de podas, y por tanto, no alterar excesivamente la fisiología del árbol donador, y b) demostrar que la revigorización parcial no altera el comportamiento morfofisiológico de la especie. Además, el trabajo intenta demostrar que en aquellos individuos que presenten brotes epicórmicos es más factible introducir material adulto *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron estaquillas de *Corylus avellana* cv. Negretta, procedentes del Centro Experimental de Villaviciosa (43°20' lat. Norte; 5°26' long. Oeste), en la Provincia de Asturias, España. Las plantas donantes habían sido sometidas a tratamientos de revigorización mediante poda mecánica (Díaz-Sala *et al.*, 1994).

Las estaquillas se colectaron en la época de invierno (febrero 1995). El tamaño de éstas varió entre 25 y 35 cm de largo, y entre 0,5 y 1,5 cm de diámetro basal, no importando el número de yemas en cada vareta, pero cuidando que la diferencia entre una y otra no fuera superior a tres yemas.

A las varetas se les efectuó una asepsia externa eliminando el tejido superficial muerto o envejecido, mediante la utilización de una escobilla pequeña, para enseguida llevarlas a cámara de flujo laminar y realizar un lavado con alcohol al 85% por 5 min; lavado con agua destilada estéril por 3 min; inmersión en hipoclorito de sodio (0,8 g de cloro activo por litro) más una gota de Tween 20, durante 20 min; para posteriormente, lavar tres veces con agua destilada estéril (5, 15 y 20 min). Seguidamente, se colocaron en una solución de sulfato de hierro (40 g de  $\text{SO}_4\text{Fe}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  en 500 mL de agua) y captan (4 g en 500 mL de agua) por 3 min. Pasado este tiempo, se colocaron a secar sobre papel filtro, orientadas en forma paralela al flujo laminar de la cámara.

Una vez secas, dos tercios de las varetas se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron en oscuridad en una cámara de frío a 4°C, mientras que las restantes se colocaron en un recipiente de vidrio conteniendo 100 mL de agua destilada estéril, y cubiertas con una bolsa de polietileno, ajustándola con cinta adhesiva en la base. Para evitar condensación, se realizaron pequeñas perforaciones en la parte superior de la bolsa. La estimulación climática se llevó a cabo en cámara de incubación con fotoperíodo de 16:8 h (luz:oscuridad) y temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , por un período que osciló entre los 16 y 38 días.

Se analizó el efecto de los tratamientos de revigorización aplicados a las plantas, mediante la poda de tallos del árbol donador en diferentes épocas y frecuencias. Se utilizaron plantas de 10 años, que habían sido sometidas a poda intensa de su copa y tallo a diferentes edades: T1: Control, sin poda; T2: Brotes epicórmicos de la planta control; T3: Plantas con una poda severa a los 4 años; T4: Plantas podadas severamente a los 4 y 6 años.

Para conocer el efecto de los tratamientos de revigorización mencionados sobre la estimulación de yemas y su posterior comportamiento *in vitro*, se registraron los siguientes antecedentes: porcentaje de estacas con yemas inducidas (%), según diámetro basal (cm); porcentaje de estacas con yemas inducidas (%), según período de estimulación (días); respuesta de explantos (%) al cultivo *in vitro* según tratamiento revigorizante y número de subcultivo; tasa de multiplicación de explantos establecidos *in vitro* según tratamiento revigorizante y número de subcultivo. Esta variable se determinó mediante el coeficiente de proliferación (CP), calculado como el número de nuevos tallos superiores a 1 cm por explanto cultivado (Sánchez-Olate *et al.*, 1997).

Las varetas de cada tratamiento se clasificaron en tres grupos de acuerdo al diámetro basal: 0,5; 1 y 1,5 cm. Posteriormente se sometieron a períodos variables de estimulación climática, los que oscilaron entre 16 y 38 días. Una vez completado el período de estimulación se procedió a escindir los explantos obteniendo segmentos nodales y apicales desde las yemas estimuladas. En el caso de segmentos nodales se utilizaron explantos de entre 1 y 1,5 cm de longitud, con dos nudos; mientras que los segmentos apicales fueron de aproximadamente 1,5 cm de longitud, con un nudo y la yema apical acompañada de un par de primordios foliares poco desarrollados.

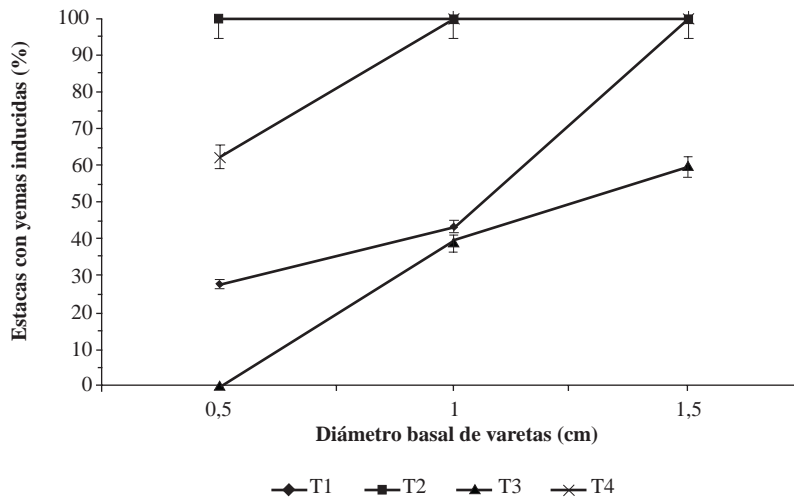
El cultivo *in vitro* de los explantos, se realizó en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado (MS2) y utilizado por Sánchez-Olate *et al.* (1997) para nogal (*Juglans regia* L.). Se agregó BAP (2,5 mg L<sup>-1</sup>), AIA (Ácido indolacético) (0,01 mg L<sup>-1</sup>) y GA<sub>3</sub> (Ácido giberélico) (0,1 mg L<sup>-1</sup>),

regulando el pH en 5,8. Luego se adicionó agar agar (7 g L<sup>-1</sup>), se dispensó en tubos de ensayo conteniendo 15 mL de medio de cultivo y se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120°C y 0,101 MPa. Una vez sembrados los explantos en los tubos de ensayo, se cultivaron en una cámara de cultivo con 25 ± 1°C de temperatura y fotoperíodo de 16:8 h (luz:oscuridad) a una intensidad lumínica de 40-50 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Los subcultivos posteriores (1 al 6) se realizaron durante 30 días en el mismo medio de cultivo, pero en recipientes de vidrio (10 cm de altura, 5,5 cm de diámetro) cerrados con tapas de polipropileno magenta sin filtro poroso (Sigma B 8648®, St. Louis, Missouri, USA).

El análisis estadístico se realizó en dos etapas. En la primera, se evaluó la respuesta a la estimulación climática utilizando varetas (porciones caulinares de entre 25 y 35 cm de longitud, con diámetros basales de entre 0,5 y 1,5 cm) de los tratamientos T1, T2, T3 y T4; se utilizó un diseño completamente aleatorio, con 10 varetas por tratamiento, repetido tres veces. En la segunda etapa se evaluó la respuesta al cultivo *in vitro* de los explantos originados por la estimulación climática; para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente aleatorio, con cuatro tratamientos y cinco repeticiones, la unidad experimental estuvo compuesta por un recipiente, conteniendo cinco explantos de entre 2 y 2,5 cm, con al menos dos yemas axilares sobre el nivel del medio de cultivo. Los resultados se analizaron por ANDEVA para el diseño utilizado, y cuando hubo diferencias significativas entre tratamientos, éstas se identificaron mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) con corrección de Kramer (Steel y Torrie, 1985), para minimizar el efecto de posible muerte de explantos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los resultados de estimulación de varetas se realizó para un período de 30 días para todos los tratamientos, al final del cual los resultados mostraron que el desarrollo de nuevas yemas a partir de la estimulación climática de varetas de campo fue favorecido por el aumento en el diámetro basal y el origen de éstas (Figura 1). Esta



**Figura 1. Varetas estimuladas (%) según tratamiento de revigorización y diámetro basal de la vareta utilizada. T1: Tratamiento control, sin poda severa; T2: Brotes epicórmicos de plantas del tratamiento control; T3: Plantas con una poda a los 4 años; T4: Plantas con dos podas, a los 4 y 6 años.**

**Figure 1. Stimulated shoots (%) according to reinvigorating treatment and basal diameter of shoot. T1: Control treatment, without severe pruning; T2: Epicormic shoots on T1 plants; T3: Plants with one pruning in 4<sup>th</sup> year; T4: Plants pruned twice, in 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> years.**

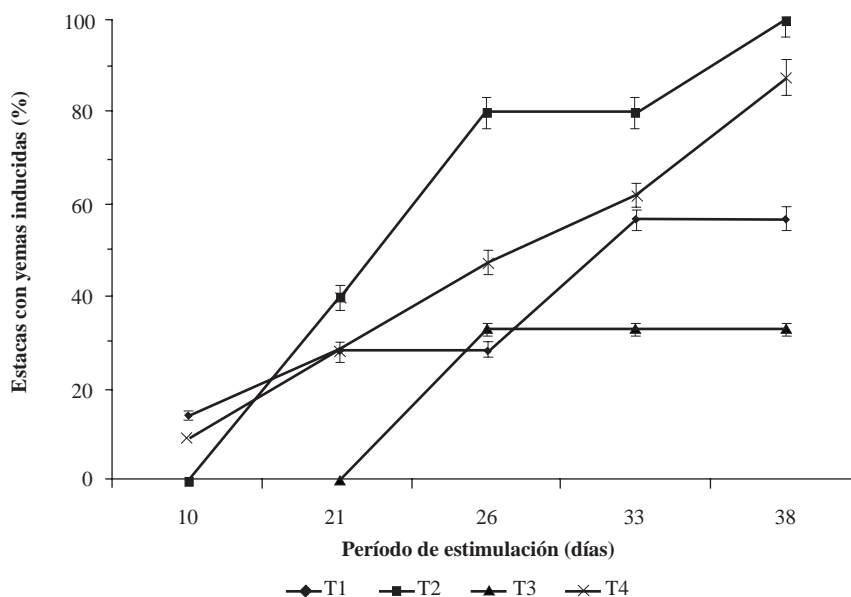
situación se apreció claramente en los porcentajes de estimulación de varetas del tratamiento T3 (con una sola poda), ya que a medida que aumentó el diámetro de las varetas, aumentó el porcentaje de estimulación de yemas.

Si se obtiene el promedio de estimulación por tratamiento (57, 100, 33 y 87,5%, para T1, T2, T3 y T4, respectivamente), se observa que el efecto del tratamiento revigorizante no fue tan marcado en cuanto a estimulación del desarrollo de nuevas yemas, como el diámetro basal de la vareta; sin embargo, los porcentajes relativamente bajos de estimulación de los tratamientos T1 y T3, se deberían a una menor juvenilidad de estos tejidos, ya que al primero no se le realizó poda aérea y el segundo, aun cuando fue podado en una oportunidad (a los 4 años de edad), la duración del efecto revigorizante fue menor a 6 años, período al final del cual se realizó este experimento. Lo anterior se puede corroborar al analizar los tratamientos T2 y T4, en que el primero correspondió a brotes epicórmicos de conocida juvenilidad y reactividad a tratamientos de estimulación en leñosas (Sánchez-Olate *et al.*, 2002), mientras que el segundo correspondió a material vegetal con dos

podas de tallos aéreos, la última de ellas hace 4 años, con lo cual aún se logra un estado de mayor vigor en el material vegetal, comportándose como un material muy reactivo y útil para la obtención de material vegetal nuevo de un individuo seleccionado (Díaz-Sala *et al.*, 1994; Azarenko *et al.*, 1997; Kurtela *et al.*, 2001).

Cuando se analizó la variación de la respuesta a la estimulación climática, en cuanto al desarrollo de yemas axilares según la duración del período de estimulación, se observó un comportamiento similar, aun cuando pareciera que los tejidos más revigorizados (T2 y T4) mantienen por más tiempo su respuesta (Figura 2).

Aun cuando los tratamientos con material vegetal más juvenil o rejuvenecido (T2 y T4), presentaron una baja respuesta a períodos cortos de estimulación, su tasa de desarrollo de yemas aumentó a medida que transcurrió el tiempo, llegando a valores sobre el 80% (Figura 2). Este comportamiento puede reflejar el efecto del tratamiento de asepsia al cual se sometió el material antes del inicio de la estimulación, ya que al ser un material más joven, con tejidos más sensibles a



**Figura 2. Respuesta de varetas (%) según duración del período de estimulación (días). T1: Tratamiento control, sin poda; T2: Brotes epicórmicos de plantas del tratamiento control; T3: Plantas con una poda a los 4 años; T4: Plantas con dos podas, a los 4 y 6 años.**

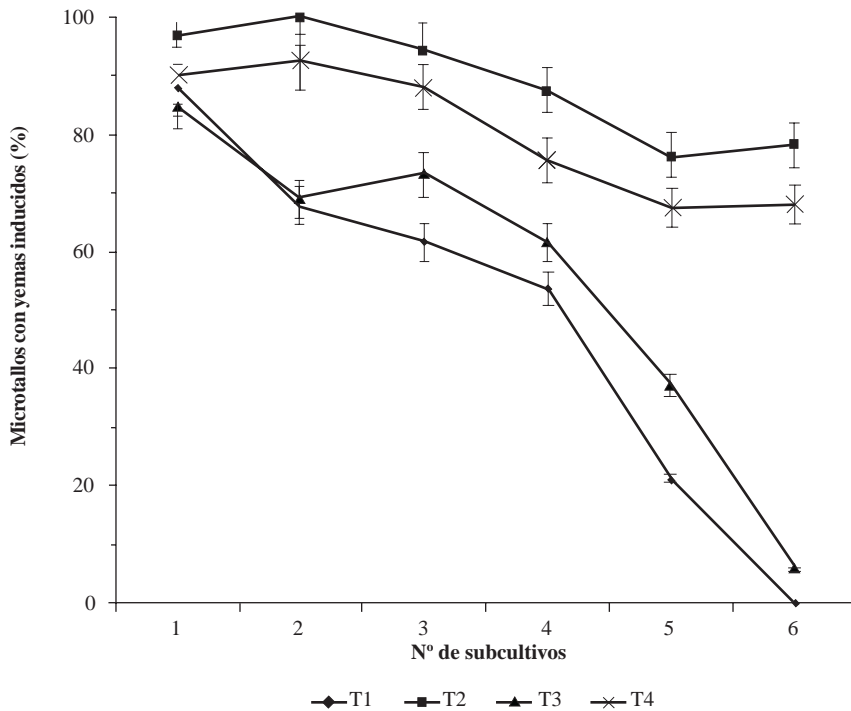
**Figure 2. Shoots response (%) according to the stimulation period (days). T1: Control treatment, without severe pruning; T2: Epicormic shoots on T1 plants; T3: Plants with one pruning in 4<sup>th</sup> year; T4: Plants pruned twice, in 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> years.**

las sustancias desinfectantes, éstas (etanol e hipoclorito de sodio) pueden alterar las yemas en dormancia, situación que explicaría la brotación de yemas auxiliares o acompañantes en vez de aquellas yemas axilares con las que inicialmente se colectó la porción caular. Este hecho debe tomarse en cuenta al momento de realizar un proceso de multiplicación, porque una disminución de la concentración de las soluciones utilizadas en asepsia podría ahorrar tiempo al permitir utilizar las yemas vegetativas existentes y no esperar a que las auxiliares se inicien, estimulen y desarrollen. Este último caso, establece ventanas temporales para el desarrollo de agentes patógenos (hongos y bacterias) que normalmente se expresan en esta fase de estimulación.

Por otro lado, el alto porcentaje de respuesta a la estimulación de varetas en ambos tratamientos (100 y 87,5%, respectivamente), denota la reactividad de estos tejidos y la eficiencia del tratamiento revigorizante, cualidades que se expresan también durante la etapa de cultivo *in vitro*

y proliferación de los explantos logrados tras la estimulación (Figura 3).

Los resultados expuestos en la Figura 3 muestran el efecto positivo de los tratamientos T2 y T4 en la respuesta al cultivo *in vitro* de los explantos provenientes de varetas estimuladas. Al parecer, los tratamientos revigorizantes se expresan en cambios fisiológicos del material vegetal con diferente duración en el tiempo (Azarenko *et al.*, 1997; Fraga, 2000). Así, la capacidad morfogénica de los explantos T2 y T4 se mantiene estable a través de varios subcultivos, llegando a un porcentaje de explantos reactivos mayor al 80% en el cuarto subcultivo. En los subcultivos sucesivos, el porcentaje de respuesta desciende levemente, estabilizándose a niveles de 75 y 80%. Con este material, los procesos de proliferación de tallos y producción de microplantas son exitosos, debido a que los procesos críticos de rizogénesis y crecimiento posterior, también se ven favorecidos (Rey *et al.*, 1994b).



**Figura 3.** Respuesta de explantos de *Corylus avellana* L. cultivados en medio MS2 suplementado con BAP (2,5 mg L<sup>-1</sup>), AIA (0,01 mg L<sup>-1</sup>) y GA<sub>3</sub> (0,1 mg L<sup>-1</sup>) durante seis subcultivos de 30 días. T1: Tratamiento control, sin poda; T2: Brotes epicórmicos de plantas del tratamiento control; T3: Plantas con una poda a los 4 años; T4: Plantas con dos podas, a los 4 y 6 años.

**Figure 3.** Response of *Corylus avellana* L. explants cultured in MS2 medium supplemented with BAP (2.5 mg L<sup>-1</sup>), IAA (0.01 mg L<sup>-1</sup>) and GA<sub>3</sub> (0.1 mg L<sup>-1</sup>), during six subcultures of 30 days. T1: Control treatment, without severe pruning; T2: Epicormic shoots on T1 plants; T3: Plants with one pruning in 4<sup>th</sup> year; T4: Plants pruned twice, in 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> years.

MS2: medio Murashige y Skoog; BAP: bencil amino purina; AIA: ácido indol acético; GA<sub>3</sub>: ácido giberélico.

En sentido contrario, la respuesta al cultivo *in vitro* de los explantos originados desde plantas sin poda revigorizante (T1) y plantas podadas una sola vez (T3), disminuyó paulatinamente hasta desaparecer al sexto subcultivo. A partir del cuarto subcultivo, la respuesta de este tipo de explantos se tradujo en una elongación caulinar, en el caso de explantos apicales, que originaron pequeños brotes que son considerados como nuevos explantos y que pueden ser tomados como parte de la fase de multiplicación de dichos genotipos, sin que se traduzca en la producción de nuevos tallos.

La situación descrita para los tratamientos T1 y T3, permite deducir que la multiplicación de esta especie utilizando explantos provenientes de plan-

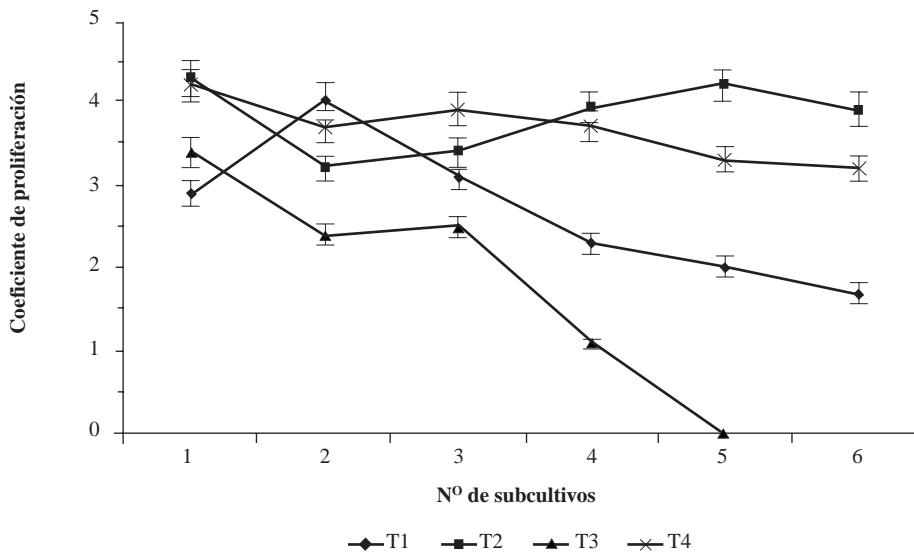
tas intactas (no revigorizadas) o desde plantas con podas leves o distanciadas entre sí, es poco probable, o al menos, mucho más difícil que si los tratamientos revigorizantes son más intensos (T4) o se utiliza material vegetal ontogénica y fisiológicamente más joven, como aquel proveniente de brotes epicórmicos (T2), tejidos que como se ha demostrado en otras especies (Sánchez-Olate, 1996; Sánchez-Olate *et al.*, 2002) permiten mejores tasas de proliferación durante el cultivo *in vitro*, asociados a aumentos significativos de algunos reguladores del crecimiento vegetal como las poliaminas (Sánchez-Olate *et al.*, 2002), y entre ellas, putrescina, la cual ha sido asociada a procesos morfogénicos *in vitro* (Ríos *et al.*, 2000; Uribe, 2000).

Según la Figura 3, la respuesta al estímulo originado por el medio de cultivo (MS2 + BAP + AIA + GA<sub>3</sub>) varió en función del número de subcultivos, asociándose al efecto temporal del tratamiento revigorizante. No obstante, cuando se analizó el comportamiento de la tasa de multiplicación, mediante el cálculo del coeficiente de proliferación (CP), expresado como el número de nuevos tallos por explanto cultivado, se observa que las respuestas fueron diferenciales para cada tratamiento revigorizante (Figura 4).

Los explantos provenientes de plantas intactas (T1), experimentaron un aumento en el número de nuevos tallos al final del primer subcultivo, reduciendo drásticamente su tasa de proliferación en los sucesivos subcultivos, llegando a valores inferiores a dos nuevos tallos en el subcultivo 6, aunque según lo analizado precedentemente, en estos casos sólo se trató de explantos apicales, donde la multiplicación para el siguiente

subcultivo se realizó mediante la excisión caulinar en uno o más explantos, ya que la respuesta observada en la Figura 3 se tradujo en elongación caulinar por efecto de la yema apical, y no por la formación de nuevas yemas, por ejemplo de origen axilar, que pudieran dar origen a nuevos tallos.

En el caso de explantos obtenidos a partir de brotes epicórmicos (T2) y de plantas con dos podas (T4), el coeficiente de proliferación se mantuvo sobre tres nuevos tallos por explanto, no importando el número de subcultivos aplicados (Figura 4). No obstante, se registró un descenso significativo para T4 hacia el final del período de experimentación, asociado a una disminución del efecto temporal del tratamiento revigorizante, coincidiendo con resultados registrados en plantas creciendo en campo, donde las podas severas han llegado a constituir la técnica de manejo preferida para revigorizar esta especie (Azarenko *et al.*, 1997; Mark, 2001). De todas maneras, los



**Figura 4.** Coeficiente de proliferación de explantos de *Corylus avellana* L. cultivados en medio MS2 suplementado con BAP (2,5 mg L<sup>-1</sup>), AIA (0,01 mg L<sup>-1</sup>) y GA<sub>3</sub> (0,1 mg L<sup>-1</sup>), según subcultivos de 30 días. T1: Tratamiento control, sin poda; T2: Brotes epicórmicos de plantas del tratamiento control; T3: Plantas con una poda a los 4 años; T4: Plantas con dos podas, a los 4 y 6 años.

**Figure 4.** Proliferation coefficient of *Corylus avellana* L. explants cultured in MS2 medium, supplemented with BAP (2.5 mg L<sup>-1</sup>), IAA (0.01 mg L<sup>-1</sup>) and GA<sub>3</sub> (0.1 mg L<sup>-1</sup>), in 30 day subculture periods. T1: Control treatment, without severe pruning; T2: Epicormic shoots on T1 plants; T3: Plants with one pruning in 4<sup>th</sup> year; T4: Plants pruned twice, in 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> years.

MS2: medio Murashige y Skoog; BAP: bencil amino purina; AIA: ácido indol acético; GA<sub>3</sub>: ácido giberélico.

tratamientos culturales basados en podas severas y fertilización, no siempre resultan en mejores respuestas a la propagación vegetativa de este tipo de especies (Kurtela *et al.*, 2001).

La decisión de utilizar como material de partida tejidos revigorizados mediante podas severas o bien aquel proveniente de brotes epicórmicos, debiera basarse en la cantidad de tejido disponible en cada caso, más que en la capacidad morfogénica del material mismo. En tal sentido, aun cuando los brotes epicórmicos suelen presentar mayor capacidad morfogénica, permiten disponer de menor cantidad de tejido para cultivar *in vitro*.

## CONCLUSIONES

El efecto revigorizante de podas severas en plantas de *Corylus avellana* L. cultivadas en campo presentó una corta duración, siendo necesario utilizar este tratamiento cada dos años a fin de mantener una fuente de material con rasgos juveniles y una adecuada respuesta a la propagación

El efecto revigorizante en el cultivo *in vitro* se traduce en un aumento de la tasa de proliferación, sin alterar significativamente el comportamiento y desarrollo posterior de las plantas tratadas.

Es factible la utilización de brotes epicórmicos de *Corylus avellana* L. para cultivo y multiplicación *in vitro*.

## LITERATURA CITADA

- Azarenko, A.N., S. Mehlenbacher, R. Smith, and D. McCluskey. 1997. Advanced hazelnut selections. 2 p. Oregon State University Extension Service, Oregon, USA.
- Berros, B. 1996. Ontogenia y caracterización molecular e histológica de la organogénesis-embriogénesis en avellano. 128 p. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo, Facultad de Biología, Oviedo, España.
- Díaz-Sala, C., M. Rey, A. Boronat, R. Besford, and R. Rodríguez. 1995. Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Corylus avellana* L.) associated with sequential *in vitro* subcultures. *Plant Cell Rep.* 15:218-221.
- Díaz-Sala, C., M. Rey, and R. Rodríguez. 1990. *In vitro* establishment of a cicloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell Tissue* 23:151-157.
- Díaz-Sala, C., M. Rey, and R. Rodríguez. 1994. Temporary modification of adult filbert proliferation capacity by sequential subcultures: intensive pruning as a pre-treatment for *in vitro* reinvigoration. *J. Hortic. Sci.* 69:673-678.
- Fraga, M. 2000. Indicadores moleculares de envejecimiento-revigorización, problemas y soluciones para la micropropagación de genotipos elite de *Pinus radiata* D. Don. 234 p. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- Kurtela, M. A. Siftar, I. Vrsek, and K. Karlovic. 2001. Effect of growth regulator on adventitious rooting of *Corylus colurna* L. Volume 3:524-529. In Salas, P. (ed.) Proceedings of 9<sup>th</sup> International Conference of Horticulture, Lednice, Czech Republic, September 3 – 6. 2001.
- Mark, R. 2001. Introduction to fruit crops (Hort 3020). 4 p. University of Georgia, Atlanta, Georgia, USA.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Pacheco, J. 1995. Revigorización de material adulto de *Pinus nigra* Arn.: Criterios morfológicos y moleculares. 185 p. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- Rey, M., A.F. Tiburcio, C. Díaz-Sala, and R. Rodríguez. 1994a. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and *in vitro* rejuvenated hazel. *Tree Physiol.* 14:191-200.



- Rey, M., C. Díaz-Sala, and R. Rodríguez. 1994b. Exogenous polyamines improve rooting of hazel microshoots. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 36:303-308.
- Ríos, D., M. Sánchez-Olate, I. Feito, y R. Rodríguez. 2000. Contenido endógeno de PAs asociado a fases del proceso rizogénico en porciones cotiledonares de nogal (*Juglans regia* L.) cultivadas *in vitro*. *Gayana Botánica* 57 (Sup.):12-13.
- Sánchez-Olate, M. 1996. Bases macromorfológicas y moleculares de la micropropagación de nogal (*Juglans regia* L.) 214 p. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- Sánchez-Olate, M. D. Ríos, M. Gea, R. Rodríguez, and M. Revilla. 1997. Parameters affecting the *in vitro* growth and rooting of *Juglans regia* L. *Acta Hort.* 442:235-240.
- Sánchez-Olate, M., D. Ríos, M. Revilla, y R. Rodríguez. 2002. Participación de poliaminas endógenas en el desarrollo de injertos y brotes epicórmicos de nogal. *AGROCIENCIA* 17:215-219.
- Steel, R.G.D., y J.H. Torrie, 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. 165 p. 2ª ed. McGraw-Hill, Bogotá, Colombia.
- Uribe, M. 2000. Poliaminas y la manipulación de la morfogénesis en el género *Pinus* L. 178 p. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo, Oviedo, España.