



CAPÍTULO 9

PROPAGACIÓN

Miguel Ellena D., Ing. Agrónomo Dr.
Abel González G., Ing. Agrónomo M.Sc.
Paola Sandoval F., Ing. Agrónomo
Juan Abarzúa C., Ing. Agrónomo M.Sc.
Felipe Marchant C., Ing. Agrícola

En Chile la propagación de especies frutales, como avellano europeo, se realiza en empresas especializadas, viveros autorizados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), que garantizan la calidad y sanidad del material vegetal comercializado. Estas empresas disponen de mano de obra altamente calificada e infraestructura como invernaderos, camas de propagación, laboratorios de micropropagación, cámaras de frío y sistemas de riego tecnificado.

Existen numerosos sistemas de propagación del avellano. Por vía gámica (reproducción o propagación por semilla) y por vía agámica (multiplicación o propagación vegetativa) que comprende la autorradicación entre los cuales destacan sierpes, acodo simple, acodo de montículo, acodo de trinchera, estacas, micropropagación e injertación por medio de la realización de injertos sobre portainjertos francos o clonales. La auto radicación aprovecha la capacidad de diferentes órganos vegetativos (brotes, ramos) de formar y emitir raíces; el injerto por otra parte está constituido por una planta formada por dos miembros, uniendo dos individuos diversos.

A nivel de viveros comerciales, el método más utilizado en el mundo y en Chile es el acodo con sus respectivas variantes, debido a su fácil manejo y buenos resultados. De manera particular, la tasa de multiplicación y enraizamiento de los brotes obtenida por planta madre y buena calidad del material vegetal puede ser llevado a recría en vivero.

9.1. Semilla

La propagación por semilla es utilizada en silvicultura para la multiplicación de especies ornamentales. En el caso de especies frutales se emplea en programas de mejoramiento genético y multiplicación de patrones francos. Por semilla se ha propagado un gran número de plantas. Sin embargo tiene el inconveniente de una elevada variabilidad del material, siendo no apropiado como sistema de multiplicación para esta especie. La propagación a través de semillas solo tiene interés desde el punto de vista del mejoramiento genético y de la obtención de patrones o portainjertos francos, los cuales también presentan variabilidad, siendo más apropiado el uso de portainjertos clonales, como ya se ha indicado.

Adicionalmente, muchas especies frutales requieren varios años para superar la fase juvenil, improductiva, durante la cual se manifiesta esterilidad y características vegetativas diferentes a las plantas adultas (hojas más pequeñas, corteza menos densa) y por una elevada heterocigosis y por tanto, una variabilidad acentuada en aquellos caracteres de interés agronómico como: forma de frutos, forma de semilla, longitud del involucro, caída libre de los frutos del involucro, vigor, arquitectura del árbol, época de floración y maduración, entre otros. Además, las plántulas obtenidas a partir de semillas generalmente están libres de virus, debido a que gran parte de

las virosis no se transmiten a través de la reproducción (Hartman y Kester, 1981).

Las semillas derivan de óvulos fecundados, constituidas generalmente por un embrión que con el endosperma o los cotiledones está protegido por el tegumento. En general, cada semilla tiene un solo embrión. No obstante, existen semillas poliembriónicas que derivan de óvulos con dos ovocélulas fecundadas de tubos polínicos diferentes o de la diferenciación de embriones adventicios de tejidos nucelares o tegumentales. Este fenómeno conocido como poliembriónia se presenta en algunas especies frutales tales como avellano, nogal, manzano y especialmente cítricos. De cada semilla poliembriónica se generan más plantas (Baldini, 1992).

9.2. Multiplicación vegetativa

En relación a la reproducción por semilla, la multiplicación agámica presenta la ventaja de producir plantas más homogéneas que entran rápidamente en producción (luego de 3-5 años) y presentan las mismas características de las plantas madres que le dieron origen, salvo que en estas últimas no hayan ocurrido mutaciones de yemas. En tal caso, el material de propagación (yemas) tiene una constitución genética diferente que puede transmitirse a las plantas propagadas de manera vegetativa. Histológicamente las mutaciones por yema, denominadas también citoquimeras autógenas, pueden ser de cuatro tipos: totales, periclinales, sectoriales y mericlinales, en relación a la extensión y disposición de los tejidos meristemáticos normales y mutados. Las mutaciones totales y periclinales son más estables que las sectoriales y mericlinales de las cuales se originan órganos (con la propagación) y plantas con características diferentes e inestables. En fruticultura, la aparición espontánea de mutaciones ha permitido seleccionar y multiplicar vegetativamente nuevas variedades que se diferencian de aquellas que las han originado, por algunas características como color de fruto y otras vegetativas como vigor y arquitectura de la planta. Sin embargo, las mutaciones pueden ser regresivas y causar la aparición de caracteres negativos. Dichas mutaciones, al no ser eliminadas dentro del ámbito de una determinada variedad pueden conducir a la formación de biotipos con caracteres de bajo valor y diferentes, por lo que la variedad misma ya no presenta homogeneidad genética.

Por otra parte, el material de propagación recolectado de plantas madres con virosis transmite esta fisiopatía a las descendencias agámicas, excepto la micropropagación a través de meristemas. En la propagación vegetativa es necesario considerar el principio de la polaridad, es decir, los materiales empleados (estacas, púas) deben conservar la orientación que tenían en las plantas madres. Se ha determinado que invirtiendo la polaridad de dichos órganos vegetativos se disminuye la tasa de multiplicación en los diferentes métodos de propagación vegetativa (Ellena, 1998).

La multiplicación vegetativa comprende diferentes métodos de auto-enraizamiento del material vegetal (acodos, estacas, micropropagación), de los que se desarrollan plantas auto-enraizadas de variedades de interés para plantaciones comerciales, materiales para injerto y portainjertos clonales (Hartman y Kester, 1981).

9.2.1. Acodo aéreo

Este método de propagación contempla circundar un brote mediante anulación o incisión, con aplicación de un sustrato fino y húmedo envuelto en un film plástico, con el fin de estimular la emisión de raíces adventicias. Una vez emergidas las raíces, el brote se corta por debajo del punto de emergencia de éstas. Dicho sistema de propagación se utiliza preferentemente para programas de selección clonal; no es aplicable a nivel comercial por su gran laboriosidad y complejidad de ejecución.



Foto 1. Acodo aéreo en avellano europeo.

Fuente: Dr. Alesandro Roversi, Italia.

9.2.2. Acodo simple

El acodo simple se obtiene plegando en forma de arco un brote largo y flexible, para enterrar la sección media desde la cual se desarrollarán raíces adventicias. Este método se emplea ocasionalmente para la propagación comercial del avellano, por su baja tasa de multiplicación. Sin embargo, permite obtener plantas de alta calidad (Bergamini y Cristofori, 1968; Fregoni y Zioni, 1968).

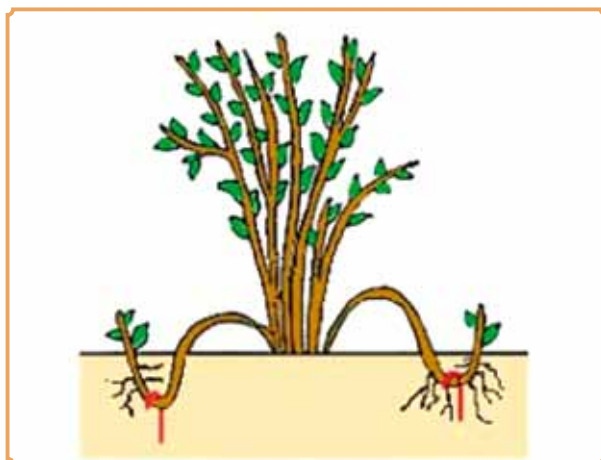


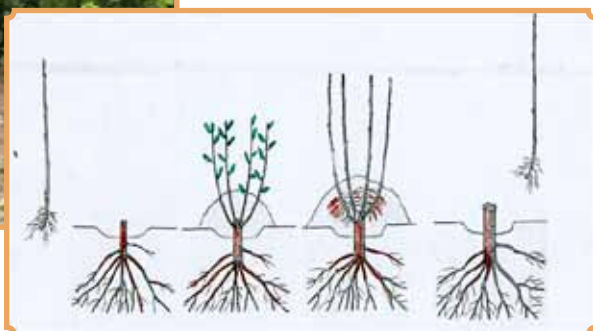
Figura 1. Acodo simple

9.2.3. Acodo de montículo

Esta técnica es utilizada por la mayoría de los viveros especializados, particularmente para la obtención de portainjertos clonales (Hartmann y Kester, 1964). Es el método más antiguo y más empleado para propagar el avellano, particularmente con el uso del anillado en la base de los hijuelos y utilización de sustratos que permiten el etiolado de los tejidos basales y con ello los rendimientos por planta madre. Con este sistema se han logrado mayores rendimientos (tasas de multiplicación) de las plantas madres que con el acodo simple. Sin embargo, las plantas obtenidas son de inferior calidad y mayor requerimiento de mano de obra que aquellas logradas con el acodo simple (Manzo *et al.*, 1974).



Foto 2. Acodo en montículo



En este sistema las plantas madres se ubican en el suelo, con un marco de plantación de 1,5-2 m x 3-4 m (entre y sobre hileras respectivamente), en donde crecen por uno o dos años. Posteriormente, en invierno durante el periodo de receso vegetativo la planta se rebaja a nivel de suelo. Los hijuelos o brotes desarrollados en la primavera se aporcan evitando la lignificación de los tejidos basales, con el fin de favorecer el proceso de etiología. Como ya se indicó, se puede recurrir al estrangulamiento de brotes en la parte basal mediante anillado para estimular el proceso de rizogénesis. Los brotes débiles no se anillan y se dejan como tirasavia. En otoño-invierno, las plantas se descalzan y se obtienen brotes con raíces adventicias, que sucesivamente se establecen en vivero y se dejan crecer durante una temporada para lograr un adecuado tamaño y desarrollo radicular. Ello permite un rápido crecimiento de las plantas, luego de establecidas en huertos comerciales. A través de este método de propagación se pueden producir alrededor de 15-20 plantas año⁻¹, en plantas madres de cuatro a cinco años de edad. Es un método lento de multiplicación, especialmente para el desarrollo masivo de nuevas selecciones y variedades. Estudios en ejecución efectuados por la Plataforma Frutícola de INIA Carillanca han determinado las tasas promedio de multiplicación por planta madre y buena calidad de plantas (altura y diámetro del tronco) durante una temporada de crecimiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tasa de multiplicación y calidad de plántulas derivadas de acodo de montículo.

Variedad	Tasa de multiplicación/planta madre
RST 1	30
RST 2	38

En cepas antiguas de los cultivares de las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni se han logrado tasas de multiplicación promedio de 20 plántulas enraizadas para la variedad Barcelona y 15 para la variedad Tonda di Giffoni. Para el caso de portainjertos RS T1 y RS T2 (selecciones INIA), se han obtenido tasas de multiplicación de 30 y 38 plántulas enraizadas de calidad por planta madre respectivamente.

9.2.4. Acodo por trinchera

Este método se utiliza también a nivel de viveros comerciales para la propagación del avellano. El sistema se inicia con plantas establecidas inclinadas y distanciadas entre 0,7-1,0 m una de otras, en surcos poco profundos, distanciados entre ellos en alrededor de 1,50 m. Al segundo año, previo a la brotación, las plantas son inclinadas horizontalmente en los respectivos surcos recortando los brotes laterales más débiles y despuntando o apitonando aquellos más vigorosos. Luego, las plantas son totalmente cubiertas con un sustrato de tierra fina. Durante la brotación, los brotes que emergen de las yemas vegetativas de estas plantas emergen del suelo y crecen velozmente. De manera sucesiva, cuando los brotes han alcanzado mayor altura se cubren nuevamente con tierra en torno a su base, con el fin de lograr una buena etiolación. En la zona basal de los brotes se desarrollarán abundantes raíces y en el periodo de caída de hojas (latencia) se extraen los nuevos materiales, cortándolos a la base de las plantas madres (Hartman y Kester, 1981; Roversi y Mozzone, 1998). En la actualidad es un sistema de menor eficiencia, comparado con nuevos métodos de propagación para el avellano como es la micropropagación (Avanzato e Preka, 1999), que se describirá con detalle más adelante en este libro.

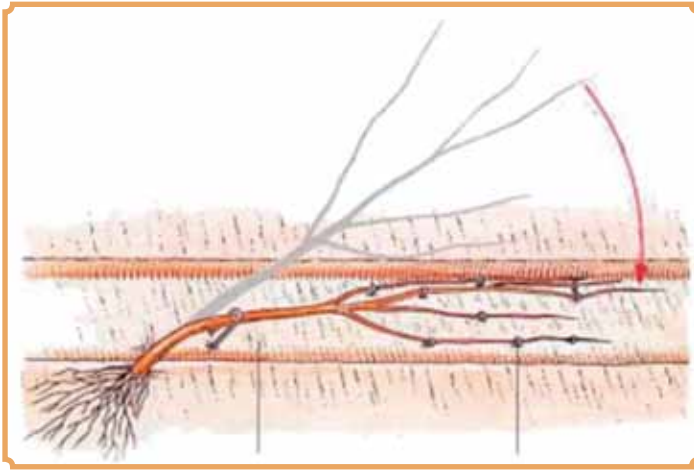


Figura 2. Acodo por trinchera

9.2.5. Hijuelos

Este sistema de propagación aprovecha la capacidad rizogénica de los hijuelos, es decir de brotes vigorosos que emergen directamente de las raíces de los árboles de avellano. El empleo de esta técnica de multiplicación es muy limitada, debido a una baja cantidad de hijuelos de calidad que se pueden obtener por planta (Alvarez Requejo, 1965; Lagerstedt, 1987; Tombesi, 1985; Bignami *et al.*, 1999).



Foto 3. Hijuelos en avellano, para propagación de plantas. Tallo libre con hijuelos.

Fuente: INIA Carillanca

9.2.6. Estacas

La estaca es una sección de un órgano vegetativo (brote, rama) que luego de haber sido recolectada de una planta madre, es establecida para la emisión de raíces y brotes con el fin de formar una nueva planta autónoma. Para el caso del avellano europeo se pueden utilizar estacas semi-leñosas cuando provienen de brotes parcialmente lignificados y leñosos, y han sido formadas de secciones de ramos o de ramas. En general, las estacas semi-leñosas han presentado una mayor capacidad de emitir raíces respecto a aquellas leñosas. Sin embargo, se ha evidenciado que las primeras tienen una mayor posibilidad de sufrir estrés cuando las raíces no se forman rápidamente. En el proceso de enraizamiento las estacas producen en su base un tejido denominado callo cicatricial, que es índice de una intensa proliferación celular pero no necesariamente de una elevada capacidad de enraizamiento. La capacidad de enraizar es una característica genética que varía de especie en especie y entre variedades, relacionada a factores exógenos tales como: estado nutricional de las plantas madres de las cuales se obtienen los materiales de propagación, época de recolección y edad de las estacas, técnicas utilizadas para el enraizamiento de las estacas y condiciones micro-ambientales durante el proceso de radicación (Cristofori *et al.*, 2009).

En general, las estacas leñosas se recolectan de las plantas madres en el período de reposo vegetativo y son conservadas estratificadas o en cámaras de frío a temperatura de 0-4°C. Estos materiales se establecen a fines de invierno. En el caso de una rápida emisión de raíces, previo a la brotación, se ha determinado que las estacas no sufren estrés y se desarrollan adecuadamente. Al contrario, se ha determinado que aquellas estacas leñosas que emiten brotes antes que raíces mueren luego de haber agotado las reservas nutricionales e hídricas. En el caso del avellano europeo, que por lo general emite raíces lentamente y en forma dificultosa, se ha evidenciado que las estacas sometidas a temperatura basal (20°C) en las camas de propagación, emiten raíces previas a la brotación de las yemas alcanzando una mayor tasa de enraizamiento y posteriormente una mejor ambientación. Por otro lado, se ha demostrado que las estacas semi-leñosas provistas de hojas están sujetas a una elevada transpiración y en consecuencia a un mayor estrés si el enraizamiento no ocurre rápidamente. Para facilitar el proceso de enraizamiento de las estacas se han utilizado técnicas como la temperatura basal (resistencia eléctrica) y nebulización (Ercisliy Read, 2001; Hartman y Kester, 1981).



Foto 4. Temperatura basal mediante resistencia eléctrica.

Fuente: INIA Carillanca



Foto 5. Sistema de nebulización automática bajo invernadero y micro-túneles.

Fuente: INIA Carillanca

La técnica de la temperatura basal ha tenido buenos resultados con estacas semi leñosas de diferentes especies frutales con dificultad de enraizar. La nebulización consiste en la aspersión de gotas finas de agua sobre las estacas establecidas en un bancal de enraizamiento, con el fin de reducir la transpiración de las hojas de las estacas, evitando así el estrés hídrico y el calentamiento del material vegetal. Adicionalmente, esta técnica permite mantener la temperatura con niveles compatibles al desarrollo de diferentes procesos fisiológicos.

El sustrato de enraizamiento deber ser muy permeable para evitar un mal drenaje, que es altamente perjudicial para el proceso de rizogénesis del material vegetal. Los principales sustratos utilizados en las camas de propagación son: arena gruesa, perlita, vermiculita, turba, lana de coco, entre otros inertes.

Luego del proceso de enraizamiento las estacas enraizadas deben pasar por un período de aclimatado gradual, con reducción en los ciclos de nebulización y luego trasplante a contenedores y establecimiento en invernadero o sombreaderos, donde las condiciones ambientales son más parecidas a las naturales (cielo abierto).

Las estacas de avellano europeo con dificultad para enraizar son tratadas previamente con hormonas a su establecimiento en las camas de propagación. Los principales productos utilizados a base de sustancias promotoras del enraizamiento, son el ácido beta-indol butírico (IBA) y el ácido alfa-naftalenacético (IAA). Estos compuestos empleados en forma líquida o en polvo se aplican a nivel de la base de las estacas. La dosis de los compuestos rizógenos debe ser baja (500-1.000 ppm), (Ellena, 1998).



Foto 6. Aplicación de hormonas en polvo (izquierda) y líquida (derecha) para estimular enraizamiento en estacas de avellano europeo.

Fuente: INIA Carillanca



Foto 7. Multiplicación por estacas en camas de propagación. Centro Regional INIA Carillanca, Comuna de Vilcún, Región de La Araucanía.

Fuente: INIA Carillanca

La función de estos compuestos es aumentar la potencialidad rizógena latente de las estacas, con el fin de asegurar un mayor porcentaje de enraizamiento.

A pesar que la propagación por estacas ha tenido resultados experimentales aceptables, estos no se han empleado a escala comercial (Tombesi, 1967; Howard, 1968; Roversi, 1969 y 1972; Lagerstedt, 1970; Germain *et al.*, 1974; Piskornik *et al.*, 1982a; Rodríguez, 1983; Howard *et al.*, 1985; Solar *et al.*, 1994, Kantarci y Ayfer, 1994). Estudios realizados en el extranjero han evidenciado un aumento en el porcentaje de enraizamiento con tratamientos en dosis altas de auxina (2.500 ppm de IBA) con estacas de 25 cm de longitud y temperatura basal entre 21-27 C°. A la vez, en estudios desarrollados con estacas semi-leñosas (sub-apicales) de la variedad Nocchione, colectadas en otoño y tratadas con dosis de 1.000 y 2.000 ppm de IBA, se han determinado porcentajes de enraizamiento entre 50 y 46,7% respectivamente (Cristofori *et al.*, 2009). En la variedad Tonda di Giffoni, en estacas de un año de edad tratadas con 2.000 ppm de IBA, se ha obtenido una tasa de enraizamiento de 46,7%, formación de callo (46,7%) y calidad de raíz (3,7 raíces por estaca). Al contrario, en la variedad Tonda Romana sometida a los mismos tratamientos se determinó un bajo porcentaje de enraizamiento (20%) (Cristofori *et al.*, 2009).

Otros experimentos realizados por los mismos autores, con estacas semi-leñosas colectadas en otoño de la variedad Tonda Gentile Romana, tratadas con 1000 ppm de IBA y 1.600 ppm de putrescina, han mostrado un porcentaje alto de enraizamiento (76,6%), (Cristofori *et al.*, 2009). Los tratamientos con putrescina también han influenciado positivamente la capacidad de enraizamiento (60%) en la variedad Nocchione, en estacas semi-leñosas de un año de edad, con tratamientos de 1.000 ppm de IBA. No se observaron efectos positivos para esta variedad cuando las estacas fueron tratadas con putrescina en dosis de 1.600 ppm (Cristofori *et al.*, 2009). A la vez, estudios recientes realizados con el cv. Tonda Gentile delle Langhe (TGL), determinaron que los tratamientos con IBA (1.000 ppm y 500 ppm) no conducen a diferencias significativas en el porcentaje de enraizamiento (76,9 y 75,6%, respectivamente). No obstante, con la dosis más baja de IBA (500 ppm) se logró una mayor retención de yemas en las estacas (64,4 %), que con la dosis más alta de IBA (48,1%), equivalente a 1.000 ppm (Contessa *et al.*, 2014). Por otra parte, en estudios realizados con inhibidores del etileno (1-MCP) y sales de plata (AgNO₃) y auxina (IBA) se obtuvo un mayor porcentaje de retención de yemas en las estacas tratadas (43,8 y 45%) respecto de los testigos sin tratamiento (31,3 y 30 %, respectivamente) (Contessa *et al.*, 2014; Ercisli y Read, 2001; Kantarci y Ayfer, 1994).

Los resultados de estos estudios indican la acción de las auxinas (IBA) sobre la abscisión de yemas luego que las estacas han sido tratadas con

esta hormona. Es conocido que las auxinas pueden afectar la producción de etileno (Ecker, 1995; Ellena, 1998). En especies leñosas ornamentales se ha observado que el etileno causa estrés y ocasiona sucesivamente caída de hojas, aborto de yemas y abscisión de yemas (Serek *et al.*, 2006).

Trabajos de la Plataforma Frutícola de INIA Carillanca han evidenciado caída prematura de hojas en estacas semi-leñosas de avellano de la selección RS T1 tratadas con dosis altas de auxina (1000-2.000 ppm durante la fase de inducción radicular). Ello se debería a una elevada producción de etileno durante esta fase, con ocurrencia de un fuerte estrés con senescencia anticipada de la lámina foliar de las estacas, en concordancia con lo informado por otros investigadores (Yang y Hoffman, 1984). Además, se ha verificado que la producción de etileno aumenta súbitamente después de la ocurrencia de estrés causado por productos químicos, heridas, enfermedades, radiación ionizante, excesos térmicos, deshidratación, entre otros y en materiales vegetales tratados con dosis elevadas de auxinas. También se ha demostrado que tejidos vegetales tratados con dosis altas de auxina han presentado un aumento de la enzima ACC-sintetasa, estimulando la producción de etileno (Alpi *et al.*, 1992).

La producción de etileno, luego de ocurrencia de daños a nivel de tejidos vegetales, se atribuye a la inducción de la síntesis de la ACC-sintetasa, que es la enzima que controla la velocidad de biosíntesis del etileno. Por otra parte, se ha demostrado que el aumento de la ACC-sintetasa ocurre previamente al incremento de la curva de producción del etileno en los tejidos vegetales. Tal situación permitiría hipotetizar que la regulación de la senescencia es producto de una modificación a nivel de los mecanismos de biosíntesis del etileno (Alpi *et al.*, 1992).

Para evitar el efecto negativo del etileno sobre la radicación en estacas de especies leñosas, se ha demostrado que algunos inhibidores de este gas permiten bajar la incidencia de abscisión de yemas, defoliación prematura de hojas y aumento en las tasas de enraizamiento, como ya se mencionó. Existen diversos factores químicos y ambientales que tendrían la capacidad de inhibir la acción del etileno. Se ha determinado que estos factores impiden el ligamiento del gas a sus sitios activos y que obstaculizan además el metabolismo celular que sería esencial para la actividad biológica (Beyer y Blomstrom, 1980). Los inhibidores de la acción del etileno han sido empleados a nivel experimental como una alternativa a los inhibidores de la biosíntesis, en condiciones en que el etileno podría influenciar negativamente el crecimiento y morfogénesis de los tejidos. Por ejemplo, se ha relevado que iones de plata, bajo la forma de tiosulfato de plata (AgS_2O_3) o nitrato de plata (AgNO_3), han permitido inhibir la acción del etileno en las plantas (Beyer, 1976a, b). Estudios recientes, realizados por el equipo de la Plataforma Frutícola de INIA Carillanca, demostraron una acción positiva del nitrato de plata, evitando el desyeme y caída prematura

de las hojas en selecciones de avellano europeo, respecto de la condición del testigo no tratado con este compuesto. Los mejores resultados fueron obtenidos con la selección RS T1 (INIA), con un 57,6% de las estacas sin desyeme prematuro y sobrevivencia del material, respecto de lo ocurrido con el testigo, con 100% de desyeme y muerte total de estacas.

La capacidad de enraizamiento y caída de yemas parece estar bajo control genético e influenciado también por los métodos de propagación utilizados (Lagerstedt, 1982; Cristofori *et al.*, 2010; Contessa *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha evidenciado un efecto positivo de un sustrato de enraizamiento liviano o poroso sobre la sobrevivencia de las estacas, debido a una mayor oxigenación en la base de éstas durante el proceso de diferenciación radicular (Contessa *et al.*, 2014). Los mejores resultados se han logrado en sustratos de vermiculita y perlita (1:1) que tienen buena aireación y permiten una adecuada retención de humedad, evitando daños (podredumbres) a nivel basal de los materiales en proceso de enraizamiento (Contessa *et al.*, 2014; Ellena, 1998).

En ensayos recientes, realizados por la Plataforma Frutícola de INIA Carillanca con diversos cultivares, empleando estacas semi-leñosas de un año y tratadas con 1.000 y 2.000 ppm de IBA y 1.600 ppm de putrescina, no se encontraron efectos positivos sobre el porcentaje de enraizamiento (promedio 17%), en contraste con trabajos realizados en el extranjero con porcentajes de enraizamiento que varían entre 43,8 y 76,9%, dependiendo de las variedades utilizadas. Sin embargo, en este experimento, las variedades utilizadas fueron diferentes a aquellas consideradas en experimentos del extranjero. Los estudios continúan, con el fin de ajustar los protocolos para los diferentes cultivares y mejorar la tasa de enraizamiento y sobrevivencia sucesiva de los materiales.

Al parecer, en función de los resultados obtenidos por el grupo de trabajo de INIA y de otros realizados en el extranjero, el porcentaje de enraizamiento es genotípicamente dependiente, de manera particular en variedades híbridas con capacidad rizogénica baja como también su posterior tasa de sobrevivencia. La capacidad rizogénica estaría asociada principalmente a equilibrios hormonales internos, diferentes sistemas enzimáticos y numerosos compuestos metabólicos (Bhattacharya, 1988; Fabbri *et al.*, 1992). En relación a la influencia de las hormonas sobre la rizogénesis adventicia existe abundante referencia bibliográfica. Sin embargo, las diversas hipótesis no han sido suficientemente verificadas. A modo de ejemplo, una disminución de la actividad IAA oxidasa promovería la multiplicación de células meristemáticas y aumentaría el transporte basípeto de compuestos antioxidantes (Mato y Vieitez, 1986), estos últimos inhibirían la oxidación del IAA y otros procesos de tipo oxidativo colegados con el metabolismo del IAA. Las hormonas que parecen desarrollar un rol

importante en la rizogénesis son: ácido indol-3-acético (IAA), las citoquininas y el etileno durante la fase de inducción radicular (Ellena, 1998; Ellena *et al.*, 2014). A nivel de enzimas las moléculas mayormente asociadas son IAA oxidasas (IAAox), peroxidasas (POD) y las polifenoloxidasas (PPO) (Hartmann *et al.*, 1981, Ellena, 1998).

9.2.7. Micropropagación

La micropropagación es una técnica *in vitro* para la cual se emplean porciones apicales de brotes o meristemas de ápices de yemas, estos últimos cuando el objetivo es la obtención de plántulas libres de virus. En relación a las técnicas de propagación tradicionales (injerto, estacas, acodo), la principal ventaja es la obtención de plantas (portainjertos, variedades auto-enraizadas), a partir de un número reducido de plantas madres, en breve tiempo y en un espacio reducido con la posibilidad de producir un elevado número de plantas. Adicionalmente, mediante la micropropagación es posible obtener material libre de patógenos como hongos y virus (De Paoli *et al.*, 1994; Ellena, 1998).

Dicha técnica permite la producción de plantas auto-radicadas de especies y variedades difícilmente multiplicables con los métodos tradicionales. Otra importante ventaja es la posibilidad de propagar material vegetativo independiente de las estaciones del año. Este tipo de multiplicación se realiza bajo condiciones ambientales totalmente controladas, que permite programar los ciclos de producción en función de la demanda del mercado. Además, con esta técnica se puede manejar gran cantidad de material en espacios reducidos y mantenerlo a bajas temperaturas, incluso por períodos prolongados hasta su utilización. A nivel comercial, la micropropagación permite la difusión de nuevos cultivares en corto tiempo. En relación a las desventajas, ocasionalmente pueden encontrarse plantas con variaciones genéticas respecto a la planta madre. Este fenómeno es causado principalmente por las elevadas tasas de proliferación que inducen también la multiplicación de posibles genotipos variantes y modificaciones epigenéticas, temporáneas con efectos colaterales negativos como el rejuvenecimiento (Swartz, 1991), no siempre evidenciable durante las diferentes fases de la micropropagación. Un segundo aspecto es la imposibilidad de emplear dicha técnica en especies recalcitrantes a la micropropagación *in vitro* (De Paoli *et al.*, 1994). El empleo de esta herramienta presenta costos iniciales altos, debido a la necesidad de contar con infraestructura y equipos de elevado valor. Adicionalmente, se requiere de personal especializado con fuerte incidencia en el costo final de la planta (George, 1993; De Paoli *et al.*, 1994; Ellena 1998).

9.2.7.1. Micropropagación del avellano

El empleo de la técnica de micropropagación en avellano presenta aún algunos problemas no resueltos (Chevre *et al.*, 1983; San José *et al.*, 1984; Vieitez *et al.*, 1984; Qiguang *et al.*, 1986; Strullu *et al.*, 1986; Mullins, 1987; Chauvin y Salesses, 1988; Ballester *et al.*, 1989; Cinelli y Pasqualetto, 1993; Ellena 1998), ya sea por dificultad en la esterilización de los explantes, o emisión de compuestos fenólicos al medio de cultivo, con la consiguiente acción tóxica en los tejidos de los explantes (Vieitez y Vieitez, 1980; Vieitez *et al.*, 1984; Piagnani y Eccher, 1986; Cinelli y Pascualetto, 1993; Yu, 1993). La eliminación del etanol para la esterilización de superficie ha permitido disminuir la formación de fenoles y por consiguiente la oxidación de los tejidos (Bassil y Rebhuhn, 1991). De manera adicional, en avellano europeo se han presentado bajas tasas de multiplicación con tendencia de alargamientos de los brotes (Zuccherelli, 1990).



Foto 8. Establecimiento de material *in vitro* de avellano europeo (izquierda) con elongación de brote (derecha). Laboratorio de Fruticultura INIA Carillanca.

9.2.7.2. Medios de cultivo

Diversos investigadores han estudiado diferentes medios de cultivo en avellano, con el fin de evaluar su influencia sobre la proliferación y elongación de los brotes, a objeto de definir un protocolo válido para la fase

de multiplicación de esta especie (Pérez *et al.*, 1983, 1987; Al Kai *et al.*, 1984; Bassil *et al.*, 1991; Yu, 1993). En avellano europeo se han utilizado preferentemente medios de cultivo con la composición salina de Murashige y Skoog (1962), Driver (1984), Cheng (1975), Yang *et al.* (1986). Buenos resultados se han logrado con el medio MS, modificado con un elevado contenido en Ca, similar a aquel empleado por Yang *et al.* (1986); los brotes cultivados sobre este medio han presentado un mejor crecimiento que aquellos cultivados sobre un medio MS (Bassil y Rebhuhn, 1991). Por otra parte, sustituyendo el Fe-EDTA con Fe-sequestrene ha sido posible mejorar el aspecto del material vegetal, particularmente el color de los brotes, con un verde más intenso (Bassil y Rebhuhn, 1991; Al Kai *et al.*, 1984).

Yu (1993) y Ellena (1998 y 2014) han reportado que mediante el empleo del medio de cultivo de Driver y Kuniyuki (1984) DKW, modificado y adicionado con BA (1,0-3 mg/L⁻¹) e IBA (0,01 mg/L⁻¹) se han obtenido las mejores tasas de multiplicación inicial y durante los sub-cultivos sucesivos para el mantenimiento del material vegetal. Adicionalmente, el uso de glucosa y fructosa en sustitución de sacarosa han permitido obtener una mejor proliferación y elongación de los brotes. El crecimiento de los brotes ha sido superior al utilizar glucosa como fuente de carbohidrato, que al considerar fructosa.

El medio de cultivo puede ser sólido o líquido y debe asegurar una buena aireación a los tejidos vegetales. Generalmente, el medio de cultivo es solidificado mediante la adición de agar, un polisacárido de origen vegetal que se disuelve en agua a temperaturas de 90-100°C y solidifica con temperatura inferior a 45°C. Las dosis empleadas (0,5-0,8%) varían en relación a la densidad y al pH del sustrato de cultivo. Se ha determinado que este agente solidificante es capaz de influir sobre la proliferación de los explantes *in vitro*, controlando la absorción de compuestos nutritivos y agua y adicionalmente al pH del medio de cultivo, que normalmente tiende a acidificar con el autoclavado (Singha, 1982). Otros productos utilizados como agentes para solidificar los medios de cultivo son la pectina, de origen vegetal obtenida de sub-productos de la elaboración de la fruta, que ha sido empleada en mezcla con agar, principalmente por menor costo a nivel comercial (De Paoli *et al.*, 1994). Como producto alternativo se puede utilizar Gelrite, que es un heteropolisacarido muy puro y activo a dosis inferiores que el agar (0,2%). Para gelificar requiere de una fusión obtenida por calentamiento de la suspensión en presencia de sales de Mg y Ca en solución. En general, los agentes gelificantes difieren entre sí en su composición mineral, por lo tanto pueden alterar la composición química del medio de cultivo y también de aquella de los explantes.

9.2.7.3. Selección del material vegetal

Para el avellano se ha determinado que el mejor material para establecer *in vitro* son brotes o inter nudos con yemas axilares individuales recolectadas al inicio de la estación vegetativa (septiembre-octubre), particularmente de material injertado y mantenido bajo condiciones controladas en invernadero. Estos han presentado un menor grado de oxidación y contaminación (Yu, 1993). Trabajos recientes iniciados por la Plataforma Frutícola de INIA Carillanca han permitido mejorar la calidad y condición del material vegetal de avellano para establecer *in vitro*, mediante el empleo de explantes provenientes de plantas madres manejadas bajo condiciones controladas en invernaderos climatizados y con programas fitosanitarios permanentes. El objetivo es disminuir la carga de patógenos presentes en estos materiales, especialmente bacterias y hongos alojados exógena y endógenamente.



Foto 9. Planta madre de avellano (izquierda) y bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento (derecha) para extracción de explantes.

Fuente: INIA Carillanca

9.2.7.4. Preparación y establecimiento de explantes

El material vegetal (brotes), recolectado en campo o de plantas madres bajo invernadero; se lava con soluciones esterilizantes (hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio), con el fin de eliminar patógenos eventualmente

presentes sobre la superficie de los brotes. Luego es cortado para disponer de micro-estaquillas o ápices meristemáticos, establecidos en un medio de cultivo con agar enriquecido con macro y micro minerales, vitaminas, carbohidratos y bioreguladores. Estas labores se realizan bajo condiciones estériles en cámara de flujo laminar. Se ha determinado que la edad de la planta madre y el origen del explante ejercen una notable influencia sobre la capacidad de regeneración (Rosati y Togoni, 1979; George, 1993; De Paoli *et al.*, 1994).

La fuente de los explantes tiene un importante efecto sobre el éxito del establecimiento del cultivo. Estudios realizados con plántulas provenientes de semillas y material juvenil han determinado una mayor facilidad de establecimiento respecto a materiales de origen adulto (Thorpe y Hang, 1990). Se ha evidenciado que la contaminación y oxidación son problemas habituales en los cultivos *in vitro* del avellano, que difiere significativamente de acuerdo a la fuente de los explantes (Rodríguez *et al.*, 1989).

Para la multiplicación de esta especie se han utilizado brotes provenientes de plántulas de semilla, material juvenil y adulto. La propagación de explantes provenientes de semilla ha permitido un buen establecimiento y proliferación del material (Anderson, 1984; Al Kai *et al.*, 1984; Pérez *et al.*, 1985). En este tipo de material no se han observado problemas serios de contaminación por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos alojados endógenamente en las semillas. La esterilización de los explantes provenientes de semillas se ha realizado con éxito utilizando etanol al 85 %, por períodos de 5 minutos e hipoclorito de sodio (1-5%) con unas gotas de Tween 20 por 20 minutos y enjuague posterior con agua destilada y estéril por 3-4 veces (Rodríguez *et al.*, 1989).

En relación a material juvenil y adulto, se ha evidenciado contaminación y efectos de toxicidad en los tejidos de los explantes por los agentes de esterilización (Rodríguez *et al.*, 1989). Cabe señalar que Messeguer y Mele (1983 y 1987), Pérez *et al.* (1987), Díaz-Sala *et al.* (1990) realizaron estudios para reducir la contaminación y oxidación de material adulto de avellano. Al respecto, Messeguer y Mele (1983) obtuvieron rangos de contaminación del 50% en brotes del año del cv. español Negret manejado bajo condiciones controladas y desinfección de los materiales (brotes de 2 cm de longitud), en una solución de quinolina (100 mg l⁻¹) por 4 horas y con enjuague repetido con agua estéril y posteriormente desinfección con hipoclorito de sodio 5% por un período de 20 minutos y enjuague con agua esterilizada por 2-3 veces. Estos autores han evidenciado que los materiales recolectados en otoño, con brotes de mayor diámetro, han logrado los mejores resultados durante la fase de establecimiento de los explantes en el medio de cultivo. Resultados similares fueron obtenidos con brotes (>4mm) de material adulto (Díaz-Sala *et al.*, 1990, Pérez *et al.*, 1987; Bassil y Rebhuhn, 1991) alcanzando un 70% de explantes estériles

libres de contaminación, durante la fase de establecimiento, con brotes vegetativos de 12 meses de plantas madres del cv. Negret, manejadas bajo condiciones controladas en invernadero. Por otra parte, diferentes autores han reportado que brotes colectados en receso vegetativo, con el comienzo del período lluvioso han presentado una mayor formación de compuestos fenólicos y oxidación de yemas, particularmente con la utilización de etanol para la esterilización superficial de los tejidos (Bassil y Rebhuhn, 1991). La omisión de etanol durante el proceso de esterilización superficial ha permitido disminuir la formación de fenoles y oxidación de tejidos (Bassil y Rebhuhn, 1991). Por otro lado, tratamientos de esterilización realizados en brotes de material adulto de campo, provenientes de crecimiento forzado en cámaras de crecimiento, han evidenciado una mejor capacidad morfogénica de los explantes y menor contaminación y oxidación de los tejidos (Díaz-Sala *et al.*, 1990).

En el Laboratorio de Fruticultura de INIA Carillanca se ha puesto a punto un protocolo para la desinfección superficial de explantes de avellano europeo, que ha permitido evitar en gran parte la oxidación de los tejidos, particularmente de yemas axilares (Ellena *et al.*, 2016 en prensa). Este protocolo incluye en la solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 5%) la adición de compuestos antioxidantes, como ácido ascórbico o ácido cítrico (200 mg/l), logrando disminuir significativamente el grado de contaminación en materiales adultos de brotes de 6 meses de crecimiento, provenientes de plantas madres del cv. Barcelona, manejada bajo condiciones controladas en invernadero climatizado y sometidas a podas de renovación. Ello con el fin de contar con material más reactivo o menos recalcitrante al ser establecido en medios de cultivo asépticos.



Foto 10. Desinfección superficial con lavado del material en laboratorio.

Fuente: INIA Carillanca



Foto 11. Establecimiento de material *in vitro* bajo cámara de flujo laminar.
Fuente: INIA Carillanca



Foto 12. Fase de establecimiento de embriones *in vitro*.
Fuente: INIA Carillanca



Foto 13. Fase de establecimiento de brotes adultos de avellano europeo cv.
Tonda di Giffoni.
Fuente: INIA Carillanca

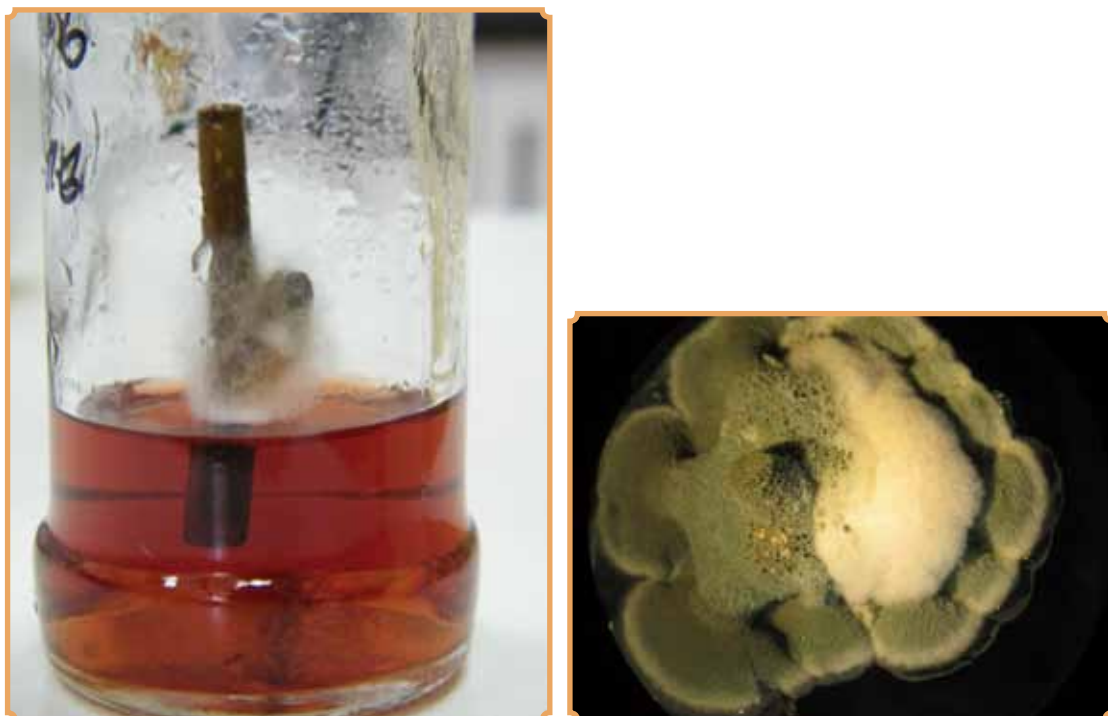


Foto 14. Contaminación por hongos durante la fase de establecimiento.

Fuente: INIA Carillanca

9.2.7.6. Multiplicación de los explantes

El material proveniente de la fase anterior (preparación de explantes) es desarrollado en cámaras de crecimiento con temperaturas entre 20 y 25°C; y con iluminación de 4.000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. El medio de cultivo de la fase de multiplicación contiene particularmente citoquinina (por lo general benzilaminopurina), esencial en la fase de proliferación de los brotes. Tal compuesto ha mostrado tener capacidad de estimular la división y la diferenciación celular, desarrollo de yemas axilares con reducción de la dominancia apical de los brotes; eventualmente estos medios contienen también bajas dosis de ácido giberélico y auxinas (ejemplo IBA) con respectivos minerales y carbohidrato. En alrededor de 20-25 días los explantes (individuales) proliferan y producen entre 2-3 brotes adventicios axilares que pueden ser separados y trasplantados en nuevos vasos con medio de cultivo fresco para sucesivos ciclos de multiplicación o proliferación. Investigaciones realizadas en avellano europeo han determinado una buena tasa de multiplicación en medios de cultivo DKW modificado (Ellena, 1998; Ellena *et al.*, 2014), con el medio NRM (Nas y Read, 2004) con altas dosis de cobre (5,1 mg/L⁻¹ de CuSO₄ * 5H₂O) de myo-inositol (800 mg/L⁻¹) con obtención de explantes de buena calidad para las sucesivas fases de proliferación y enraizamiento del material. Además, a través del medio de cultivo NCGR-COR, sustrato de

cultivo DKW modificado por sustitución de glucosa por sucrosa (30 g/L), y de la fuente de hierro (Sequestrene) 138 Fe/L por FeEDTA y 5g/L de agar por Gelrite, BA (5 mg/L), también se ha observado un efecto positivo de NH_4NO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y elementos menores en las tasas de proliferación y buena calidad del material vegetal (Hand *et al.*, 2014; Hand y Reed, 2014).

En relación al calcio, se ha evidenciado un mejor comportamiento de los explantes a concentraciones bajas (Hand *et al.*, 2014). La utilización de citoquininas (BA) es esencial durante la fase de proliferación, porque tienen la capacidad de estimular la división y diferenciación celular, desarrollo de yemas axilares, estimular la formación de yemas adventicias directamente de tejidos somáticos y reducción de la dominancia apical de los explantes. Además, presentan la capacidad de bloquear el enraizamiento, particularmente en dosis elevadas (Ellena, 1998).



Foto 15. Cámara de crecimiento climatizada con material de avellano en proliferación (Laboratorio de Fruticultura INIA Carillanca).

Diferentes autores han encontrado que la tasa de multiplicación del avellano está influenciada por múltiples factores: genotipo, orientación de los explantes en el medio de cultivo y concentración de citoquininas (Bassil y Rebhuhn, 1991; Pérez *et al.*, 1985). Ha sido determinado que los explantes colocados horizontalmente en el medio de cultivo han presentado desarrollo de yemas axilares y brotes sin formación de callo en la parte basal del explante, en contraste con aquellos brotes establecidos verticalmente que

presentan formación de callo en su base. Con la utilización de material sin callo la multiplicación de éste puede ser empleada para el mantenimiento de la uniformidad genética. En el caso de formación de callo, puede aumentar la variabilidad somaclonal (Bassil y Rebhuhn, 1991). Por ello, es preferible utilizar el primer método de multiplicación (explantes horizontales). Estudios recientemente iniciados en el laboratorio de Fruticultura de INIA Carillanca indican una mejor respuesta de los materiales establecidos horizontalmente (Ellena *et al.*, 2016 en prensa).

Por otra parte, los explantes cultivados en medios líquidos mediante la técnica de la inmersión temporal (SIP), han evidenciado una mayor tasa de proliferación, longitud de brotes, mayor número de nodos y obtención de brotes no hiperhidratados, en comparación con medios sólidos de proliferación (Caboni *et al.*, 2009; Garrison *et al.*, 2013; Latawa *et al.*, 2016).

La semi automatización de los sistemas de propagación *in vitro* del avellano europeo es un factor fundamental para la reducción de costos. El cultivo en medio líquido representa una alternativa para la reducción de costos operativos en la micropropagación. Además, el empleo de la inmersión temporal en medio líquido (SIP) permite evitar efectos colaterales que ocurren en medios permanentes o estáticos. En Chile no existen antecedentes bibliográficos y experiencias en la aplicación del SIP en la multiplicación *in vitro* del avellano europeo. Recientemente, el Laboratorio de Fruticultura de la Plataforma Frutícola de INIA Carillanca ha iniciado un programa de multiplicación *in vitro* en un sistema SIP para la proliferación *in vitro* de selecciones de portainjertos RS T1 y RS T2 y variedades comerciales de avellano europeo con fines de investigación.



Foto 16. Explante de avellano en fase de proliferación establecido horizontalmente (Laboratorio de Fruticultura de INIA Carillanca).



Foto 17. Multiplicación de Avellano Europeo en bioreactor bajo un sistema de inmersión temporal de los explantes.

Fuente: INIA Carillanca

9.2.7.7. Elongación de brotes

Son escasas las investigaciones relativas a la utilización de medios de cultivo específicos para estimular la elongación de los brotes, previo a traspasar los materiales a un medio de enraizamiento. Los trabajos realizados por Zuccherelli (1990) han evidenciado la formación de brotes con características apropiadas (robustos y dotados de pequeñas hojas largas y bien extendidas), utilizando un medio de cultivo similar al empleado para la fase de multiplicación con macro y microelementos, vitaminas MS, pero con la citoquinina reducida a $0,1 \text{ mg/L}^{-1}$, y (mg/L^{-1} : GA_3 $0,5$; NAA $0,1$) por 20 días, para ser trasplantados posteriormente a un medio de cultivo para la inducción radicular.

Otros autores han demostrado el efecto positivo del uso de GA_3 ($30\mu\text{m}$) sobre el crecimiento de yemas desarrolladas en los brotes y elongación de estos. Sin embargo, una dosis excesiva de GA_3 ($150, 300 \mu\text{m}$), ha causado diversas anomalías, como brotes débiles y disminución posterior del porcentaje de enraizamiento (Perez *et al.*, 1985). Estudios realizados en esta fase por un período de 15 días disminuyendo las dosis de BA de $1-2 \text{ mg/L}^{-1}$ a $0,2 \text{ mg/L}^{-1}$ en un medio de cultivo DKW modificado, han permitido seleccionar micro-estaquillas con brote alargado ($20-25 \text{ mm}$) y láminas foliares extendidas, de excelente calidad para la fase sucesiva de enraizamiento (Ellena, 1998).



Foto 18. Avellano europeo en fase de elongación *in vitro*.

Fuente: INIA Carillanca

9.2.7.8. Enraizamiento de micro-estaquillas

Las micro-estaquillas destinadas para la fase de enraizamiento son transplantadas a un nuevo medio (medio de enraizamiento), en el cual la componente hormonal del sustrato de cultivo corresponde a una auxina (generalmente ácido indol-butírico) y en ausencia de citoquininas (Ellena, 1998; Ellena *et al.*, 2014).

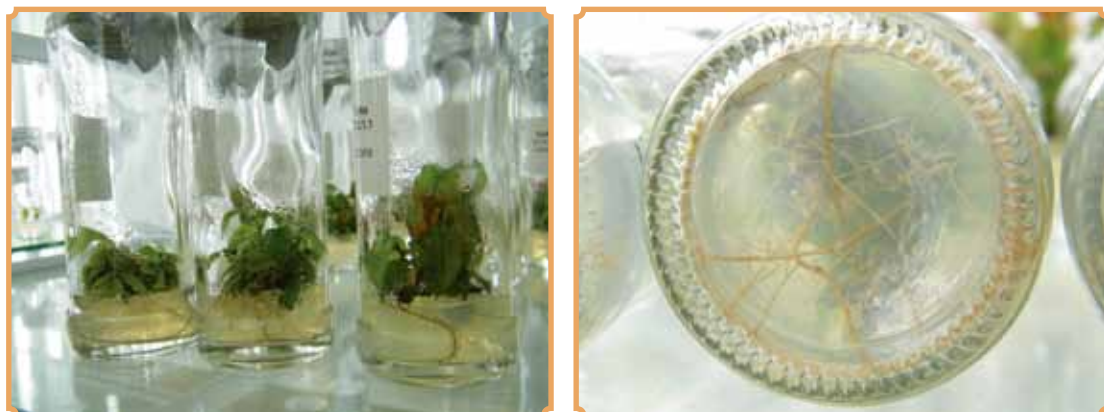


Foto 19. Micro-estaquillas de avellano en fase de enraizamiento y enraizadas *in vitro*.

Fuente: INIA Carillanca

En relación al avellano europeo, la inducción radicular se ha logrado usando principalmente IBA como principal hormona y empleando dos medios de cultivo en fase sucesiva. El primero con función inductiva y en presencia de auxina y ausencia de luz (primeros 10 días) y el segundo, libre de auxinas en presencia de luz (Ellena, 1998; Ellena *et al.*, 2014). El empleo de la oscuridad ha determinado un efecto favorable sobre el porcentaje de enraizamiento, calidad y longitud de las raíces y desarrollo posterior de las plántulas obtenidas (Ellena, 1998).

Además, se ha evidenciado que durante el proceso de enraizamiento han ocurrido dos fases. La primera inductiva, con una elevada producción de etileno y actividad enzimática (IAAox, POD, PPO) con el grado de determinar una elevada inducción radicular y, una segunda fase de tipo expresiva, caracterizada por una menor producción de etileno y baja actividad enzimática, permitiendo un mayor enraizamiento de los brotes (Ellena 1998; Ellena *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en diferentes especies leñosas (Gaspar y Coumans, 1987; Berthon *et al.*, 1987, 1990; Ripetti *et al.*, 1994).

Anderson (1984), reporta un porcentaje de enraizamiento *in vitro* del 65% a través del cultivo de las micro-estaquillas por cinco semanas en presencia de IBA ($0,5 \text{ mg/L}^{-1}$) en un medio de cultivo de enraizamiento de Anderson (1984), con macro y micronutrientes y compuestos orgánicos reducidos a la mitad, al cual se le adicionado sacarosa (30 g/l), inositol (100 g/l^{-1}), tiamina HCL ($0,4 \text{ mg/L}^{-1}$) y agar (6 g/l^{-1}). Al Kai *et al.* (1984) señalan que el empleo de bajas dosis de auxina (IAA, NAA, IBA, $0,1 \text{ mg/L}^{-1}$) ha permitido aumentar el enraizamiento, mientras que elevadas concentraciones de éstas (1 mg/L^{-1}) han promovido una mayor formación de callo en la base de las micro-estaquillas. No obstante, diversos investigadores han señalado que las concentraciones óptimas para el enraizamiento del avellano fluctúan entre $1\text{-}3 \text{ mg/L}^{-1}$ (Mena *et al.*, 1985; Ellena 1998). Las diferencias encontradas entre los distintos autores podrían ser atribuibles a múltiples factores tales como: cultivar, longitud de la micro-estaquilla, presencia de hojas. Se ha encontrado que el empleo de dosis altas de auxinas ha permitido efectivamente aumentar el enraizamiento, pero al mismo tiempo, se ha evidenciado un aumento de la necrosis apical de los brotes, provocando una elevada pérdida de material vegetal, que se traduce en un gran problema a nivel de viveros especializados.

La necrosis apical es un proceso degenerativo presente en muchas especies arbóreas multiplicadas *in vitro*, particularmente durante la fase de enraizamiento. Esta alteración provoca un desecamiento del ápice vegetativo del brote central y en algunos casos de aquellos laterales (De Paoli *et al.*, 1994; Ellena, 1998). Las causas principales de la necrosis apical se han atribuido a diversos factores: vitrificación de brotes, insuficiente intercambio gaseoso con el medio externo al vaso de cultivo y el consiguiente aumento en la acumulación de etileno al interior del contenedor, provocando un efecto tóxico para los brotes, existencia de brotes etiolados y por tanto, más sensibles a la luz durante su permanencia en la cámara de crecimiento,

dosis elevadas de auxinas que terminan por bloquear el desarrollo de los brotes.

Por otra parte, se ha determinado que la deficiencia de calcio a nivel de ápices ha acrecentado este proceso degenerativo. Ello se debería a una inadecuada absorción de este ion desde el medio de cultivo o por una falta de transporte de iones y metabolitos en los vasos xilemáticos, luego de una excesiva humedad al interior de los vasos de cultivo (George, 1996). En cultivos *in vitro* de manzano y camelia se ha observado un elevado porcentaje de brotes con síntomas de necrosis apical, luego de tres sub-cultivos en un medio con citoquininas y sucesivos 2-3 sub-cultivos en ausencia de citoquininas con el fin de promover el enrizamiento (Kataeva *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha observado que la amarillez y la necrosis aumentan cuando los brotes no son repicados en forma periódica. El uso de repicados continuos y cercanos ha reducido el problema de la necrosis apical y ha mejorado la tasa de proliferación de los brotes (Ghashghaie *et al.*, 1992). La duración de los sub-cultivos debe modificarse en función de las diferentes especies y cultivares, con el fin de lograr una adecuada tasa de proliferación.

Por otro lado, se ha determinado que el uso de alcohol y de mecheros tipo bunsen, que funcionan con gas (para la esterilización), en un ambiente con poca ventilación, conducen a la acumulación de una elevada cantidad de gases como: metano, butano, etano, propano, etileno, metanol y etanol. Cuando la concentración de gases es muy elevada, bajo la cámara de flujo laminar y en los vasos de cultivo durante el proceso de transplante de material, puede producir toxicidad en los tejidos (George, 1996). La eliminación del mechero y su reemplazo por esterilizadores eléctricos han permitido bajar toxicidad en los cultivos *in vitro* (George, 1996).



Foto 20. Esterilizador eléctrico (Laboratorio Fruticultura INIA Carillanca).

Estudios realizados con el establecimiento horizontal de los explantes sobre el sustrato (DKW) del cv Tonda Romana, han permitido alcanzar un mayor porcentaje de enraizamiento (100%) mediante el empleo de brotes apicales. Adicionalmente, se ha observado que al día 12 todos los explantes han mostrado presencia de raíces en comparación con el método tradicional de establecimiento de los brotes (vertical), donde el enraizamiento se ha evidenciado después de 2 semanas. Con este método, se ha logrado un mayor número de raíces por micro-estaquilla y presencia de pequeñas raíces que han permitido una mayor supervivencia del material en la fase sucesiva de ambientación. Este sistema ha permitido modificar el transporte polar de la auxina para inducir el enraizamiento y la formación de un sistema radicular más eficiente, con evidente formación de raíces laterales, debido probablemente al transporte acrópeto de la auxina (Ellena, 1998).

9.2.7.9. Ambientación y transplante de las plántulas enraizadas

Las microestaquillas enraizadas se transfieren a vasos o contenedores en "micro túneles" y luego de un cierto período (12-15 días) de adaptación a un nuevo sustrato (inerte), son transferidas a invernadero. En estas condiciones las plantas pasan de una condición heterotrófica, propia del cultivo *in vitro*, a una autotrófica que es posible por la presencia de hojas y raicillas funcionales.

Durante la fase de ambientación las plantas desarrollan de manera adecuada, ya sea el sistema radicular cómo sus funciones estomáticas, además gradualmente alcanzan su independencia trófica. Trabajos realizados en avellano europeo cv. Tonda Romana se ha determinado una sobrevivencia del 63,3 y 70% para las micro-estaquillas tratadas con 1 y 2 mg/L⁻¹ de IBA respectivamente, durante la fase previa de enraizamiento. Además, se ha observado que el material proveniente de porciones apicales de los brotes ha presentado una menor producción de callo a la base de las plántulas y una mayor producción de raíces respecto al material de origen basal. Las plántulas obtenidas de material basal han evidenciado una sobrevivencia inferior (20y 26,6% para las dosis de IBA, 1 y 2 mg/L⁻¹ respectivamente (Ellena, 1998).



Foto 21. Plántulas micropropagadas en vía de ambientación, en contenedores plásticos ubicados en cámaras de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas (Laboratorio Fruticultura INIA Carillanca).



Foto 22. Plántulas ambientadas y en etapa de cría en invernadero, con condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luminosidad).

Fuente: INIA Carillanca

Referencias Bibliográficas

- Al Kai, H., Salesses, G., and A. Mouras. 1984. Multiplication *in vitro* du noisetier (*Corylus avellana* L.). Agronomie 4: 399-402.
- Alpi, A., Pupillo, P., e C. Riganó. 1992. Fisiologia delle piante. Seconda edizione 1992 EdiSeS. Napoli, pp. 1-610.
- Alvarez Requejo, S. 1965. El avellano. Editorial Ministerio de Agricultura. Madrid. p 190.
- Anderson, W.C. 1984. Micropropagation of filberts, *Corylus avellana* L. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 33: 132-137.
- Avanzato, D; Preka, P. 1999. In vivo grafting by using scion and rootstocks *ex vitro*. Book of Proceedings of International Symposium of Modelling Cropping System. Lerida, June 21-23, 139-140.
- Baldini, E. 1992. Arboricultura General, ed. Mundi-Prensa. 381p.
- Ballester, A., Sánchez, M.C., and A.M. Vieitez. 1989. Etiolation as a pretreatment for *in vitro* establishment and multiplication of mature chesnut. Physiol. Plant. 77: 395-400.
- Bassil, N., Rebhuhn, D.W.S., and M.C.Mor. 1991. Micropropagazione of the hazelnut, *Corylus avellana* L. Acta. Horticulturae 300: 137-140.
- Bergamini, A. e Cristofori G. 1968. Confronto tra due tecniche di propagazione del nocciuolo: margotta di ceppaia e propaggine di trincea. Frutticoltura 30: 93-95.
- Berthon, J.Y., Boyer, N., and Th. Gaspar. 1987. Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Peroxidase activity as a marker. Plant Cell Reports 6: 341-344.
- Berthon, J.Y., Ben Tahar, S., Gaspar, T., and N.Boyer. 1990. Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum in vitro* and their requirements. Plant Physiol. Biochem. 28: 631-638.
- Beyer, Jr.E. 1976a. Silver ion: a potent antiethylene agent in cucumber and tomato. HortScience 11: 195-196.
- Beyer, Jr. E. 1976b. A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol. 58: 268-271.

Beyer, E. and Blomstrom, D.C. 1980. Ethylene metabolism and its possible physiological role in plants. pp. 208-218. In Skoog F. (eds.). 1980.

Bhattacharya, N.C. 1988. Enzyme activities during adventitious rooting. In. Adventitious root formation in cuttings. Davis T.D; Hassig B.E. and synthesis in tobaSankhla N. (eds.). Advances in plant science series. Vol. 2, Dudley T.D; General ed.

Bignami, C., De Salvador, R., e G. Stramboli.1999. Aspetti agronomici e prospettive di valorizzazione della coltura italiana. Frutticoltura N° 11. p. 16-27.

Caboni, E., Frattarelli, A., Giorgioni, M., Meneghini, M., and C. Damiano. 2009. Improving micropropagation of hazelnut Italian cultivars through temporary immersion system. VII International Congress on Hazelnut 845: 255-260.

Contessa, C., Valentini, N., Caviglione, M., and R.Botta. 2011. Propagation of *Corylus avellana* L. by means of semi-hardwood cutting: rooting and bud retention in four italian cultivars. E.J.H.S. 76 (5/6): 170-175.

Contessa, C., Valentini, R., Botta, R., and M. Corte. 2014. Investigation on effects of IBA treatments and ethylene inhibitors on the rooting and bud retention of semi-hardwood cuttings from "Tonda Gentile delle Langhe" hazelnut cultivar. Proc. VIIIth Int. Congress on Hazelnut, march 19-22, 2012, Temuco, Chile. p. 151-156.

Chauvin, J.E., and G.Salesses. 1988. Advances in chestnut micropropagation (*Castanea sativa* sp). Acta Hort. 227: 340-345.

Chevre, A.-M., Gill, S.S., Mouras, A., and G.Salesses. 1983. *In vitro* vegetative multiplication of chesnut. J. Hort. Sci. 58 (1): 23-29.

Cinelli, F. e Pasqualetto, P.L. 1993. Chesnut *in vitro* clonal propagation development to obtain a large scale production. International Congress on Chesnut.Spoleto. Italy October 20-23, 1993.

Crecioli, P. Leva, A.R. C; Mariotti, P.L. Nicese, F.P. and Torcia, P. 1998. Conoscenze e line di ricerca sulla moltiplicazione del Castagno. Atti Convegno Nazionale sulla Castanicoltura da frutto, Avellino 21-22 ottobre 1988. P.p. 113-118.

Cristofori, V. Carelli, P. and Rugini, E. 2009. Effects of auxine and putrescine treatments on rooting of leafy cuttings of three hazelnut cultivars. Proc. VIIth Int. Congress on Hazelnut. Acta Hort. 845: 267-272.

Cristofori, V., Roupshael, Y., and E. Rugini. 2010. Collection time, cutting age, IBA and putrescine effects on root formation in *Corylus avellana* L. cuttings. *Sci. Hortic.* 124:189-194.

De Paoli, G., Rossi, V., e A. Scozzoli. 1994. Micropropagazione delle piante ortoflorofrutticole (Eds-Edagricole, Bologna, Italia). 258 p.

Díaz-Sala, C., Rey, M., and R. Rodríguez. 1990. *In vitro* establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 23 (3): 151-157.

Driver, J.A., and A.H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507-509.

Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-674.

Ellena, M. 1998. Aspetti fisiologici e biochimici associate al processo rizogenetico del Castagno da frutto e nocciolo. Dottorato di Ricerca in Colture Arboree (X Ciclo), Università degli Studi di Bologna, Italia. 157 p.

Ellena, M., Masia, A., and G. Marino. 2014. Physiological and biochemical aspect associated with the rizogenetics of hazelnut (*Corylus avellana* L). *Proc. VIIIth International Congress on Hazelnut. Acta Hort.* 1052: 157-161.

Ercisli, S., and P.E. Read. 2001. Propagation of hazelnut by softwood and semi-hardwood cuttings under Nebrasska conditions. *Acta Hort.* 556: 275-279.

Fabbri, A. Ferrini, F. Masia, A. and Pisani, P.L. 1992. Enzyme activity during adventitious rooting of stoolbed propagated chesnut. *Proc. Int. Chesnut Conf; Morgantown, West Virginia.* p.89-92.

Fregoni, M., e E. Zioni. 1968. Prove di confront fra i metodi di propagazione del nocciolo per pollone propaggine semplice e di trincea. *Atti. Conv. Naz. Stud. Noc.* 371-378.

Garrison, W., Dale, A., and P.K. Saxena. 2013. Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2 hydroxy-phenylacetic acid (Fe-EDDHA). *Can.J. Plant Sci.* 93: 511-521.

Gaspar, T. and Coumans, M. 1987. Root formation. In *Cell and Tissue Culture in forestry.* Bonga JM, Durtzan D.J. (eds). Martinus Nijhoff, Dordrecht, Vol. 2: 202-217.

Germain, E., Leglise, P., et G. Froidefond. 1974. Le bouturage du noisetier (*Corylus avellana* L.) CTIFL-Doc 43: 1-8.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part I. The technology. 574 p. Exegetics, Ltd. Edington, England.

George, E.P. 1996. Plant propagation by tissue culture part 2. In Practice. Exegetics. Ltd. Edington, Wesbury, UK. P. 799

Ghashghaie, J., Brenckmann, F., and B. Saugier. 1992. Water relations and growth of rose plants cultured *in vitro* under various relative humidities. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 30:51-57.

Hand, C. Maki, S., and B.M. Reed. 2014. Modeling optimal mineral nutrition for hazelnut micropropagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 119(2): 411-425.

Hand, C. and B.M. Reed. 2014. Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* L. shoot cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 119(2): 427-439.

Hartman, H. T., y D.E.Kester. 1964. Propagación de plantas. Editorial CECSA, México. 693 p.

Hartman, H.T. y D.E.Kester. 1981. Propagación de plantas: principios y prácticas. Editorial Continental, p. 814. México.

Howard, B.H. 1968. Hazel propagation by hardwood cuttings. Rep. Exp. Mallng. Stn. 93-95.

Howard, B.H., Harrison-Murray, R.S., and S.B Arjyal. 1985. Response of apple summer cuttings to severity of stock plants pruning and stem blanching. J. Hort. Sci. 60 (2): 145-152.

Kantarci, M., and M. Ayfer. 1994. Propagation of some important turkish hazelnut varieties by cuttings. Acta Hort. 351: 353-360.

Kataeva, N. V., Alexandrova, L.G., Butenko, R.G.,and E.V. Dragavtceca. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. Plant cell Tiss. Organ Cult. 27: 149-154.

Lagerstedt, H.B. 1970. Filbert propagation techniques. *In Proc. Annu. Rep. Northern Nut Grower´s Assoc. Oregon.* p. 61-67.

- Lagerstedt, H.B. 1982. Three promising hazelnut propagation techniques. Proc. Nut Growers Soc. 67:58-66.
- Lagerstedt, H.B. 1987. A review on chestnut propagation. p. 56-61 In Proc. II Pacific Northwest Chesnut Congress, 22-23 august, 1987.
- Latawa, J., Shukla, M.R., and P.K.Saxena. 2016. An efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. Botany 94(1): 1-8.
- Manzo, P. Nicostra, A., e C. Damiano. 1974. Prove di propagazione del nocciolo per proppaggine semplice o proppaggine di trincea. Ann. Ist. Sper Fruit. Roma V. 1. 51-61.
- Mato, M.C. and A.M. Vieitez. 1986. Changes in auxin protector during the rooting of chestnut shoots *in vitro*. Physiol. Plant. 66:491-496.
- Mena, J., Messeguer, J., y E.Mele. 1985. Avances e investigaciones en curso sobre propagación y viverismo en avellano. In Proc 1. Congreso especial frutos secos. Ponencias y comunicaciones. p. 117-135.
- Messeguer, J. and E. Mele. 1983. Clonal propagation of *Corylus avellana* L. *in vitro*. In: Proc. Convegno Int. Nocciuolo, Avellino, It.p. 293-295.
- Messeguer, J. and E. Mele. 1987. *In vitro* propagation of adult material and seedlings of *Corylus avellana* L. Acta. Hort. 212: 499-503.
- Mullins, V.V. 1987. Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill). Acta Horticulturae 212: 525-529.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nas, M., and P.E. Read. 2004. Improved rooting and acclimatization of micropropagated hazelnut shoots. Hort. Science 39 (7): 1668-1690.
- Pérez, C., Rodríguez, R. and R.S.Tames. 1985. *In vitro* filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. Plant Cell Rep. 4: 137-139.
- Pérez, C., Rodríguez, A., Revilla, A., Rodríguez, R., and R.Sánchez-Tames. 1987. Filbert plantlet formation through *in vitro* culture. Acta Horticulturae. 212: 505-510.
- Piagnani, C., and T. Eccher. 1986. La coltura del Castagno. Giornate di studio sul Castagno, Caprarola (VT) 6-7 Nov. 1986.p. 135-142.

Piskornik, Z., Piskornik, M., and F. Goc. 1982. The influence of indolbutyric acid, sample-date and juvenility on the rooting of filbert (*Corylus sp.*) cuttings. *Acta Agrobot.* 35(2): 167-174.

Qiguang, Y., Read, P., Felmann, C.D. and M.A. Hosier. 1986. Effect of Cytokinin, IBA and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. *Hort. Sci.* 21 (1): 133-134.

Ripetti, V., Kevers, C. and T. Gaspar. 1994. Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Adv. Hort. Sci.* 8: 29-32.

Rodríguez, A. 1983. Estudio de la rizogénesis y sustancias reguladoras del crecimiento en *Corylus avellana* L. Ph.D. Thesis, Fac. Biol, Univ. Oviedo.

Rodríguez, R., Rodríguez, A., González, A. and C. Pérez 1989. Biotechnology in agriculture and forestry, vol 5, Trees II (eds. By Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. 127-157.

Rosati, P. e F.Tognoni. 1979. Propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole: tecnica di coltura ed organizzazione del laboratorio. *In: Incontro su "Tecniche di coltura in vitro per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole"* Pistoia, 6/10/ 1979: 19-47

Roversi, A. 1969. Propagazione per talea del nocciolo con il riscaldamento basale e con la forzatura in sacchetti di polietilene. *Inf. Agr. Verona.* p. 45.

Roversi, A. 1972. Effetti dell IBA e dell NAA e del DMSO sulla rizogenesi delle tale di nocciolo. *Ann. Fac. Agr. I-III:* 365-376.

Roversi, A., e G.C. Mozzone. 1998. Tecniche di forzatura per margotte di ceppaia di nocciolo. *Informatore Agrario* 24: 71-75.

San José, M.C., Vieitez, A.M. and E. Vieitez. 1984. *In vitro* plantle regeneration from adventitious buds of chestnut. *J. Hort. Sci.* 59 (3): 359-365.

Serek, M., Woltering, E.J., Sisler, E.C., Frello, S., and S. Sriskandarajah. 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnol Adv.* 24: 368-381.

Singha, S. 1982. *Amer Soc. Hort. Sci.* 107: 657-660.

Solar, A., Smole, J. and F. Stampar. 1994. Investigations of different methods of propagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Acta Hort.* 351: 381-386.

Strullu, D.G., Grellier, B., Marciniak, D., and R. Letouzé. 1986. Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal syntheses *in vitro*. *New Phytol.* 102: 95-101.

Swartz, H.J. 1991. Post culture behavior genetic and epigenetic effects and related problems. In. *Micropropagation*: 95-121.

Tombesi, A. 1967. Alcuni fattori che influenzano il successo della radicazione di tale semilegnose di nocciuolo con la tecnica della nebulizzazione. *Riv. Ortoflorofrutt. It.* 51: 517-526.

Thorpe, T.A. and Harry, T.S. 1990. Special problems and prospects in the propagation of woody species. P. 67-74. In: R. Rodríguez, R. Sánchez Tames, R. and D.Durzan (eds) *Plant aging: Basic and applied approaches*. Pleum, Press, New York

Tombesi, A. 1985. Il nocciuolo. REDA (Ed. Agric), *Frutticoltura Speciale*. p. 614-630.

Vieitez, A.M., and M.L.Vieitez. 1980. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 50: 127-130.

Vieitez, A.M. Vieitez, M.L. and E. Vieitez. 1984. Chestnut *In "Biotechnology in Agriculture and Forestry" I. Trees I.* (Y.P.S.Bajay eds.) Springer Verlag. Berlin. p. 393-414.

Yang, S.F. and N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35: 155-189.

Yang, Q., Read, P.E., Felman, C.D. and M.A. Hosier. 1986. Effect of cytokinin, IBA and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. *Hort. Science.* 21: 133-134.

Yu, X. 1993. Micropropagation and regeneration of hazelnut (*Corylus species* L). Thesis of Doctor of Philosophy in Horticulture, Oregon, State University, Corvallis. USDA/ARS.108 p.

Yu, X. and B.M. Reed. 1995. A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus species*). *HortScience* 30(1): 120-123.

Zuccherelli, G. 1990. Moltiplicazione *in vitro* di 5 varietà di nocciuolo e loro micorrizzazione con *Tuber melanosporum*. *L'Informatore Agrario* N° 41: 51-55.

