

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERS AGRÒNOMS DE LLEIDA

MICROPROPAGACIO DE *Cynara scolymus* CV. "BLANCA DE TUDELA":

Condicionants del procés i aproximació a la  
caracterització anatòmico-fisiològica en les diferents  
fases de cultiu.

Tesi presentada per Núria Cañameras i Riba per optar al grau de Doctor Enginyer Agrònom. Dirigida pel Dr. Angel Mingo Castel.

Lleida, Juliol del 1990

**MATERIAL I**  
**METODES**

### 3. MATERIAL I METODES

#### 3.1. Consideracions generals

Atesa la complexitat i diversitat dels temes experimentals que s'aborden en aquesta Memòria, i per tal de fer més comprensible la metodologia emprada, s'ha decidit presentar separatament aquells trets metodològics que són d'aplicació comuna en la major part dels assaigs i descriure per a cadascun dels ítems tractats la metodologia particular.

##### 3.1.1. Material vegetal

El material vegetal de partida per a la realització d'aquesta Tesi procedia d'una plantació de carxofera, del cultivar "Blanca de Tudela", clon 711, ubicada en el terme municipal de Molins de Rei (Baix Llobregat) i realitzada a partir de fragments de soca a mitjans d'agost del 1986. L'esmentat clon havia estat seleccionat i facilitat per l'"Instituto Tecnológico y de Gestión del Cereal" (I.T.G.C) de Navarra.

Per a la fase d'iniciació de la micropropagació s'utilitzà com explant el material més comunament recomanat a la bibliografia (apartat 1.3.3.2), és a dir, àpexs caulinars, extrets de cardets d'una llargada entre 5 i 15 cm (Moncousin, 1980; Harbaoui i Debergh, 1981; Ancora et al. 1981). La grandària dels explants fou inferior a 1 mm d'alçada. Es decidí aquesta grandària de teixit meristèmic atenent els resultats obtinguts per Harbaoui et al. (1982) que aconseguiren amb material d'aquesta grandària una implantació força exitosa dels explants, així com un grau de sanejament molt elevat, tot i no ser l'obtenció de material lliure de virus un objectiu d'aquesta tesi.

### 3.1.2. Desinfecció del material vegetal

Tot i emprant àpexs caulinars de reduïdes dimensions per iniciar tots els cultius, es creié oportú realitzar una desinfecció prèvia, amb l'objectiu d'aconseguir una explantació més exitosa. En la introducció d'aquest treball s'ha vist que pràcticament tots els equips que treballen amb *Cynara scolymus* L. segueixen alguna determinada pauta de desinfecció.

Prèviament a la desinfecció s'eliminaren les fulles externes dels cardets, quedant aquests sols amb les 4 ó 5 primeres fulles, aproximadament, amb una llargada de 3 a 4 cm.

La pauta emprada havia estat prèviament contrastada, exitosament, amb les que cita la bibliografia en assaigs previs, per a la desinfecció de gemes i de meristems + 2 primordis foliars, que s'havien portat a terme abans d'iniciar-se els assaigs definitius d'aquesta Tesi (Martinez i Cañameras, no publicat).

La desinfecció compregué una primera immersió del material vegetal en una solució de clorur de mercuri al 0.2%, durant 5 minuts, seguida d'un rentat també de 5 minuts amb aigua esterilitzada. A continuació, l'esmentat material es someté a un segon bany amb una altra solució desinfectant, que contenia hipoclorit sòdic, al 2% de clor actiu i 0.1% de Tween 20, durant 15 minuts, seguit de 3 rentats amb aigua estèril adicionada amb  $100 \text{ mg l}^{-1}$  d'àcid ascòrbic, per evitar o reduir al màxim els fenòmens d'oxidació (Harbaoui i Debergh, 1980; Harbaoui et al., 1982; Ancora et al., 1981a,b; Suelzu et al., 1989). Els primers dos rentats foren ràpids (30 s), agitant manualment el pot que contenia el material vegetal amb la solució acuosa, i el tercer rentat

fou de 5 minuts sobre agitador magnètic. El material vegetal es deixà en aquesta solució d'àcid ascòrbic fins al moment de la seva explantació.

La desinfecció es realitzà en condicions d'asepsia, sota flux laminar, en una cambra Telstar. La resta de manipulacions que es portaren a terme en totes les proves que descriurem a continuació, es realitzaren també sota condicions asèptiques en règim de flux laminar.

### 3.1.3. Composició dels medis base de cultiu

Els medis base per a la fase d'iniciació (MBi), per a la fase de multiplicació (MBm), per a la fase d'allargament (MBal) i per a la fase d'arrelament (MBar) contenien tots els macro i microelements considerats essencials per al desenvolupament vegetal, algunes vitamines, mio-inositol i sacarosa (Taula 10). Les solucions macrominerals emprades en totes les fases foren les de Murashige i Skoog (1962), mentre que les solucions microminerals foren per als medis d'iniciació i arrelament també les de Murashige i Skoog (1962), per als medis de multiplicació i allargament s'empraren les de Nitsch i Nitsch (1969).

S'utilitzà Difco-agar com agent gelificador dels medis sòlids. El pH dels medis fou ajustat, prèviament a la incorporació de l'agar, amb un pHmetre Crison-501. L'addició del agar es realitzà quan els medis de cultiu s'havien pre-escalfat fins a 40°C. La distribució del medi, amb l'agar ja incorporat en els corresponents tubs de cultiu, es realitzà quan la temperatura del mateix era propera als 91°C, per assegurar una distribució homogènia de l'agar. Per a la dosificació del medi en els tubs de cultiu s'emprà una Dispenssette-Brand. Els tubs d'assaig utilitzats (150 x

21 mm) eren de pyrex i els taps corresponents d'alumini (Sero-taps). La quantitat de medi incorporat per tub fou de 15 ml.

Els medis emprats en totes les proves foren esterilitzats a l'autoclau (Selecta Autester 437-G), amb una sobrepressió de  $1 \text{ kgcm}^{-2}$  de vapor d'aigua durant 20 minuts. En l'assaig d'iniciació que contempla en alguns tractaments l'adició d'àcid giberèlic no autoclavat, aquest s'incorporà als medis de cultiu sota flux laminar, quan aquests havien estat autoclavats, i quan la seva temperatura era inferior a  $60^{\circ}\text{C}$ , mitjançant la utilització de filtres bacterians esterilitzats.

Taula 10 - Composició basal en  $\text{mg l}^{-1}$  dels medis d'iniciació (MBi), multiplicació (MBm), allargament (MBal) i arrelament (MBar) (\* variable segons assaig).

Elements	MBi	MBm	MBal	MBar
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	1650	1650	1650
$\text{KNO}_3$	1900	1900	1900	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	440	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170	170	170
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3	37.3	37.3	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8	27.8	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	25	25	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	10	10	8.6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	3	3	6.2
KI	0.83	-	-	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	-	0.025
Tiamina	0.4	0.4	0.4	0.4
IAA	0.1	1	-	-
Mio-inositol	100	100	100	100
Sacarosa	20	20	20	20
Difco-Agar	8	11	*	*
pH	5.6	5.8	5.8	5.8

#### 3.1.4. Condicions de la cambra d'incubació

El material corresponent als diferents assaigs s'incubà en la "Cambra del Laboratori de Cultiu *in vitro* de l'Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Agrícola de Barcelona". La il.luminació artificial de l'esmentada cambra s'aconsegueix amb fluorescents Grolux de 18 i 58 W de la marca Silvania. Els tubs d'assaig amb el corresponent material vegetal es colacaven dintre de gradetes de forma alternada, és a dir, en una gradeta de 24 alveols, s'hi ubicaven 12 tubs, fer facilitar una irradiació més homogènia per a tots els tubs. La separació entre la base del tps que tapaven els tubs i els fluorescents era de 23.5 cm.

Els nivells de densitat de flux fotònic (PPFD) emprats foren variables atenent l'assaig i es descriuran en els apartats corresponents.

La radiació fotosintèticament activa (PAR) es mesurà amb un sensor quàntic LI-COR (LI-190 SB).

La temperatura mitjana de la cambra es mantingué constant dia i nit i fou de  $24 \pm 1$ °C. El registre diari de la mateixa al llarg de tots els assaigs es realitzà amb un termohigrograf Lambrecht. Setmanalment es contrastava el sensor tèrmic front un termòmetre de mercuri de precisió.

El fotoperíode emprat per a tots els assaigs realitzats en les fases de *in vitro* fou de 16 hores de llum i 8 h de foscor.

#### 3.1.5. Paràmetres controlats

Els paràmetres controlats són variables atenent

a l'assaig programat. En els següents apartats es descriuen aquells més comuns a la majoria d'assaigs.

### 3.1.5.1. Pes fresc, pes sec i contingut hídric del material vegetal

Totes les pesades que comprenen els diferents assaigs es realitzaren en una balança de precisió amb lectura fins a deumilèsima de gram.

Per a determinar el pes fresc de les diferents fraccions del material vegetal, primerament es determinà el pes fresc total (pft), seguidament es separaven les fraccions cal.lus i arrel, quan n'hi havia, de les fulles i es pesaven, obtenint-se així directament el pes fresc del cal.lus (pfc) i el pes fresc de les arrels (pfa), la fracció corresponent a fulles es determinava per diferència (pff).

$$pft = pff + pfc + pfa$$

La fracció fulles conté de fet també els nusos i entrenusos, que són impossibles de separar atès el seu baix grau de desenvolupament. Els seccionaments i les gavi-metries es realitzaren tofa a tofa i de forma ràpida per evitar perdues d'aigua.

Les diferents fraccions del material vegetal foren desecades fins a pes constant, en una estufa d'aire forçat a 80°C (Selecta mod. 374A). En aquest cas el pes sec total (pst) s'obtenia per sumatori de les corresponents fraccions: pes sec de les fulles (psf), pes sec del cal.lus (psc) i pes sec de les arrels (psa).

$$pst = psf + psc + psa$$



Es determinà també el contingut hídric de cada una de les parts esmentades i del total de les tofes, brots o plantetes (microesqueixos arrelats *in vitro*).

$$\text{Contingut Hídric} = (1 - \text{Pes sec/Pes fresc}) \times 100$$

### 3.1.5.2. Taxes de multiplicació

La taxa de multiplicació es controlà en els assaigs d'iniciació i en els de multiplicació.

S'avaluaren les següents taxes:

-Taxa de multiplicació total (tt):

$$\frac{\text{Nombre de microbrots o gemes formats}}{\text{Nombre de propàguls}}$$

Aquest paràmetre ens indica la capacitat de rebrotació del medi assajat.

-Taxa de multiplicació viable (tv):

$$\frac{\text{Nombre de microbrots viables}}{\text{Nombre de propàguls}}$$

Microbrot viable: brot que pot emprar-se amb èxit com a nou propàgul en un proper subcultiu. Atenent la nostra experiència prèvia assoleixen aquesta característica els microbrots de grandària superior a 0.5 cm. Microbrots més petits normalment tenen una baixa supervivència en el proper subcultiu.

Aquest paràmetre normalment és inferior a l'anterior i indica la taxa de multiplicació útil, és a dir, la d'ampliació real de l'stock.

-Taxa de brotació no viable (tnv):

$$\frac{\text{Nombre de mbr.no viab. o gemes no suf. desenvolupades}}{\text{Nombre de propàguls}}$$

Gemes no suficientment desenvolupades són gemes o microbrots de grandària inferior a 0.5 cm. Els microbrots no viables comprenen tots aquells que presenten anomalies fisiològiques i es classifiquen en els següents 4 grups:

.Taxa de vitrificació (tvit):

$$\frac{\text{Nombre de microbrots vitrificats}}{\text{Nombre de propàguls}}$$

.Taxa de clorotització (tc):

$$\frac{\text{Nombre de microbrots cloròtics}}{\text{Nombre de propàguls}}$$

.Taxa de necrosi (tn):

$$\frac{\text{Nombre de microbrots necrosats}}{\text{Nombre de propàguls}}$$

.Taxa de brots poc allargats i gemes no desenvolupades (tp):

$$\frac{\text{Nombre de microbrots i gemes no desenvolupats}}{\text{Nombre de propàguls}}$$

i sempre caldrà que es compleixi:

$$tt = tv + tnv$$

$$tnv = tvit + tc + tn + tp$$

### 3.1.5.3. Longitud i tipus de marge de les fulles dels brots viables obtinguts en els assaigs d'iniciació i de multiplicació

La longitud dels brots viables es mesurà atenent la fulla més llarga del microbrot des de la base del mateix. Segons la llargada assolida es classificaren en 6 grups:

- 1 - 0.5 a 1 cm
- 2 - 1 a 1.5 cm
- 3 - 1.5 a 2 cm
- 4 - 2 a 2.5 cm
- 5 - 2.5 a 3 cm
- 6 - > 3 cm

Per a avaluar el marge de les fulles s'establiren quatre grups:

- 0 - Inapreciable (fulles no desenvolupades)
- 1 - Fulla sencera
- 2 - Fulla poc retallada (pinnatifida)
- 3 - Fulla força retallada (pinnatipartida)

### 3.1.6. Tractament estadístic de les dades i graficació

Les anàlisis estadístiques s'han realitzat en el "Centre de Càlcul de l'E.U.E.T.A.B.", amb el paquet de programes SPSSX en un ordinador microVAX-Digital.

Per a la majoria de variables: taxes de multiplicació totals i viables, pesos secs i frescos, continguts hídrics, llargada microbrots, nombre de fulles, nombre d'arrels, data d'arrelament, s'ha realitzat l'anàlisi de la variança i la separació de mitjanes per Student-Newman-Keuls.

Altres paràmetres (percentatges d'arrelament, percentatges de vitrificació) s'han estimat amb intervals de confiança i per a l'avaluació de l'aclimatització s'han realitzat taules de contingència.

Per tal de normalitzar i homogenitzar algunes variables s'han realitzat les següents transformacions:

Poblacions Poisson:  $(1+k)^{\frac{1}{2}}$

Poblacions Binomials:  $\arcsin(k)^{\frac{1}{2}}$

Sempre s'ha treballat amb un nivell de significació del 5%, i les lletres diferents que acompanyen als resultats a les taules en una mateixa fila i/o columna indiquen diferències significatives.

Els paràmetres anatòmics han estat avaluats trobant el seu valor mig  $\pm$  l'error estandar.

Per a la gràficació s'ha emprat el programa Sigma-plot versió 3.

### 3.2. Assaig d'iniciació del cultiu

Els cardets escollits com a font d'iniciació del cultiu foren extrets de la planta mare a finals d'estiu (inicis del mes de setembre del 1988), coincidint amb la primera formació de cardets després del repòs estival de les plantes mares en el camp.

A partir del medi base abans esmentat (Mbi) (apartat 3.1.3., Taula 10) es formularen 6 tractaments amb 2ip i GA<sub>3</sub> (Taula 11). S'escolliren aquestes dues dosis de citoquinines (1 i 5 mg l<sup>-1</sup>) per ser les dues concentracions alhora extremes i més citades a la bibliografia (Moncousin, 1980, 1981; Harbaoui i Debergh, 1980; Debergh et al., 1981). Es formularen també dues dosis de GA<sub>3</sub> (0 i 0.1 mg l<sup>-1</sup>). En aquest cas es decidí avaluar l'efecte de la presència del esmentat regulador del creixement i la incidència del seu autoclavatge.

Taula 11 - Composició hormonal dels medis d'iniciació (a: autoclavat; na: no autoclavat)

Medis	Concentracions hormonals (mg l <sup>-1</sup> )		
	2ip	GA <sub>3</sub> a	GA <sub>3</sub> na
I1	1	0	0
I2	1	0.1	0
I3	1	0	0.1
I4	5	0	0
I5	5	0.1	0
I6	5	0	0.1

El material vegetal explantat es mantingué en les condicions ambientals reflectides en l'apartat 3.1.4., en la cambra d'incubació. Tanmateix durant la primera setmana de cultiu, els explants es mantingueren en condicions de fos-

cor, per tal de reduir i/o eliminar els fenòmens d'oxidació (Moncousin, 1980). La irradiància que reberen els explants a partir del vuitè dia i fins a la fi de l'assaig fou de  $90 \mu\text{EPARm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

L'assaig durà 12 setmanes. Es subcultivà tres vegades consecutives (sembra + 2 subcultius), amb una cadència de 21 dies, amb els medis d'iniciació indicats i es realitzà un darrer repicat en un medi de multiplicació únic per a qualsevol de les procedències. El medi de multiplicació emprat va ser el descrit per Harbaoui et al. (1982) (Taula 7). Setmanalment es mesurà i/o controlà: tipus i nombre de fulles desenvolupades, brotació, vitrificació, formació de cal·lus, aparició de substàncies fenòliques, mortalitat i percentatge de contaminacions bacterianes i fúngiques.

Es mantingué el propàgul inicial per als següents subcultius, quan l'esmentat explant havia donat com a mínim una taxa de multiplicació viable superior a 2. S'utilitzaren 10-12 explants per tractament.

### 3.3. Assaigs de multiplicació

#### 3.3.1. Assaig I: Comportament de la taxa de multiplicació al llarg de successius subcultius, segons època d'explantació

S'utilitzaren microbrots procedents del final de la fase d'iniciació, de grandària compresa entre 2 i 3 cm, amb un mínim de 3 fulles desenvolupades, i que havien entrat a explantació en 5 èpoques diferents de l'any:

- setembre/1988
- novembre/1988
- gener/1989
- març/1989
- maig/1989

El medi d'iniciació de procedència era el MBI amb  $5\text{mg l}^{-1}$  de Zip (medi I4, apartat 3.2).

En aquest assaig es pretenia estudiar l'evolució de les taxes segons l'època de sembra (5 èpoques) i el nombre de subcultius (7). A partir dels subcultius obtinguts es pretèn esbrinar:

1) l'època més aconsellable per entrar material, del cultivar "Blanca de Tudela", en les nostres condicions de cultiu (Baix Llobregat).

2) si les taxes de multiplicació vénen afectades per l'època de l'explotació i/o el nombre de subcultius.

Per tant es considerà oportú emprar un únic medi de multiplicació. El medi escollit fou el proposat per Harbaoui et al. (1982) (Taula 7), perquè en assaigs previs a aquesta Tesi, fou d'entre els medis que descriu la bibliografia aquell que manifestà sempre menys problemes de vitri-



ficació.

L'esmentat material es subcultivà cada 21 dies durant 7 vegades consecutives. El nombre de propàguls emprats en cada subcultiu fou de 50 i escollits completament a l'atzar, d'entre el material que assolís les característiques de microbrot viable descrites (apartat 3.1.5.2). Les taxes de multiplicació total, viable i tipus de no viabilitat s'avaluaren coincidint amb el moment de la realització del subcultiu.

Durant tot l'assaig la irradiància fou de  $90 \mu\text{E-PARm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 3.3.2. Assaig II: Efecte de les variacions en la composició citoquinínica dels medis

D'acord amb els estudis realitzats per Debergh et al. (1981), en el cultivar tunisenc "Violet d'Hyères" i els resultats obtinguts per Cervera (1989) en Blanca de Tudela, es formulà aquest assaig de multiplicació per intentar trobar la formulació de citoquinines (KIN i 2 ip) que resultes més idònia per aconseguir alhora una bona taxa de multiplicació i una brotació al més homogènia possible.

Per a la realització de la prova es seleccionaren microbrots de 2 a 3 cm de llargada i que havien estat subcultivats set vegades en el medi de proliferació de Harbaoui et al. (1982) (Taula 7), procedents de la sembra del mes de setembre.

Es formularen 30 medis de multiplicació diferents en la seva composició i/o concentració citoquinínica (Taula 12).

El nombre de propàguls per tractament fou de 20. La duració d'aquest assaig abarcà 3 setmanes, a la fi de les quals s'avaluà: pes fresc i sec i contingut hídric de les diferents fraccions de les tofes, taxes de multiplicació, longitud dels brots viables, i tipus de marge de les fulles dels brots viables.

Taula - 12 Formulació citoquinínica dels medis de multiplicació.

Medis	Composició citoquinínica (mg l <sup>-1</sup> )	
	Zip	KIN
M0	0	0
M1	0	0.1
M2	0	0.2
M3	0	0.4
M4	0	0.6
M5	0	0.8
M6	5	0
M7	5	0.1
M8	5	0.2
M9	5	0.4
M10	5	0.6
M11	5	0.8
M12	10	0
M13	10	0.1
M14	10	0.2
M15	10	0.4
M16	10	0.6
M17	10	0.8
M18	15	0
M19	15	0.1
M20	15	0.2
M21	15	0.4
M22	15	0.6
M23	15	0.8
M24	20	0
M25	20	0.1
M26	20	0.2
M27	20	0.4
M28	20	0.6
M29	20	0.8

### 3.3.3. Assaig III: Efecte de la concentració d'agar i de la irradiància

La bibliografia especialitzada mostra variació notable segons la concentració d'agar del medi i del règim d'irradiància a què està sotmés el cultiu en la fase de multiplicació, i que cal suposar que ambdós factors influeixen en la dinàmica de la fase de multiplicació. En aquest context es programà una prova de multiplicació on s'assajaren diferents nivells de cadascun dels factors anteriors.

S'utilitzaren propàguls subcultivats 8 vegades en el medi de multiplicació de Harbaoui et al. (1982) (Taula 7), de 2 a 3 cm de llargada i amb un mínim de 3 fulles desenvolupades, i procedents de l'explantació de finals d'estiu (mes de setembre).

El disseny d'aquesta prova comportà la formulació de 12 tractaments amb les tres intensitats lumíniques següents:

- 20  $\mu\text{EPARM}^{-2}\text{s}^{-1}$
- 60  $\mu\text{EPARM}^{-2}\text{s}^{-1}$
- 90  $\mu\text{EPARM}^{-2}\text{s}^{-1}$

i 4 concentracions de Difco-agar (0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%) (Taula 13). S'empraren 20 propàguls/tractament.

El medi de cultiu emprat fou el medi base de multiplicació (MBm) suplementat amb  $15\text{ mg l}^{-1}$  de Zip. Aquesta concentració citoquinínica fou una de les que donà millors resultats en l'assaig de multiplicació de la prova anterior (en valors absoluts resultà la concentració que exhibí la taxa viable de multiplicació més elevada).

L'assaig finalitzà també als 21 dies de cultiu i els paràmetres que s'avaluaren per a tots els tractaments foren els mateixos que en l'assaig de multiplicació anterior (3.3.2.), i a més es determinà el nombre de fulles dels brots viables obtinguts.

Taula - 13 Concentració d'agar i irradiància dels medis de multiplicació.

Medi	Agar ( $g l^{-1}$ )	Irradiància $\mu E P A R m^{-2} s^{-1}$
X1	8	20
X2	8	60
X3	8	90
X4	9	20
X5	9	60
X6	9	90
X7	10	20
X8	10	60
X9	10	90
X10	11	20
X11	11	60
X12	11	90

### 3.4. Assaig d'allargament

La formulació d'un medi d'allargament que comporti un creixement ràpid dels microbrots és important per assegurar, posteriorment, un elevat percentatge de microesqueixos que estiguin en les condicions òptimes de desenvolupament en el moment d'iniciar el procés d'arrelament *in vitro*. La bibliografia consultada està sempre d'acord en que és necessari superar la barrera dels 3-4 cm de llargada per obtenir un arrelament exitós (apartat 1.3.3.4). Atès que la majoria dels microbrots obtinguts en la fase de multiplicació no assolien normalment aquesta llargada, es creié adient programar un assaig d'allargament.

S'escolliren microbrots individualitzats d'uns 2 cm de llargada, i amb un mínim de 3 fulles desenvolupades, procedents de 8 subcultius en medi de multiplicació de Harbaoui et al. (1982) (Taula 7). En aquest assaig s'analitzà la resposta d'allargament a dos factors, que l'experiència prèvia ens havia fet pensar que tenien un paper rellevant en la inducció de l'allargament, temàtica molt difícil i controvertida a la bibliografia: disponibilitat hídrica (medis sòlids i líquids) i profunditat de sembra en els medis sòlids, resultant un total de sis tractaments.

El material suport dels medis líquids fou 15 ml de perlita (Decalite gra hortícola) o 0.75 g de cotó per tub. El medi emprat fou el base (Mbal) (Taula 10).

El nombre de microbrots utilitzats per tractament fou de 30. Durant l'assaig, que durà 21 dies, es mesurà cada 2 dies la longitud dels microbrots. A la fi del mateix s'avaluaren els pesos frescos i secs, el contingut hídric i la longitud.

La irradiància fou de  $90 \mu\text{EPARm}^{-2}\text{s}^{-1}$  durant tot l'assaig.

Taula 14 - Caracterització dels medis d'allargament  
 (Profunditat de sembra: superficial = 3 - 4 mm  
 profunda = 10 - 12 mm)

Medi	Sòlid (agar ‰)	Líquid (suport)	Sembra (tipus)
Al 1	0.8	-	Superficial
Al 2	0.8	-	Profunda
Al 3	1.1	-	Superficial
Al 4	1.1	-	Profunda
Al 5	-	Perlita	Superficial
Al 6	-	Cotó	Superficial

### 3.5. Assaigs d'arrelament

#### 3.5.1. Assaig I: Efecte de la composició del medi d'arrelament

D'acord amb quasi totes les referències bibliogràfiques el regulador del creixement més emprat per aconseguir la inducció rizogènica *in vitro* en la majoria de cultivars de *Cynara scolymus* L. és l'àcid naftalen acètic (NAA). D'aquestes referències les corresponents a l'equip de Moncousin (Moncousin, 1981; Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984) són les que plantegen, al nostre entendre, els estudis d'arrelament més complets, i per la qual cosa els seus medis es van escollir com a controls de la nostra experiència. Tanmateix i prèviament a aquest assaig definitiu es provaren diferents tipus i concentracions de reguladors de la rizogènesi, veient que l'hormona que millor estimulava la formació d'arrels en els cultivars de carxofera "Blanca de Tudela" i "Blanca de Aranjuez" era l'àcid indolbutíric (IBA) a una concentració de  $8 \text{ mgl}^{-1}$  (Martinez i Cañameras, no publicat).

Els medis de Moncousin tenen en comú la presència de NAA ( $1 \text{ mgl}^{-1}$ ) i de la vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol ( $10 \text{ mgl}^{-1}$ ). Entre ells es diferencien en el contingut de macro i/o microelements, en el contingut de bor i en la concentració d'agar (Taula 9, apartat 1.3.3.4).

Són moltes les fonts de variació en els assaigs d'arrelament derivats de la investigació del equip de Moncousin. Un disseny exhaustiu que contingués tots els medis de Moncousin i a més els proposats per nosaltres d'acord amb la nostra experiència prèvia era inabordable. Per aquest motiu es decidí realitzar un assaig previ contrastant el medi de major eficiència en l'arrelament d'entre els proposats

per Moncousin amb un medi original amb una composició mineral i de aditius orgànics idèntics, però substituint el NAA que utilitza Moncousin (Taula 10) per l'IBA a  $8 \text{ mg l}^{-1}$  de concentració que havia denotat una gran eficàcia en els assaigs previs citats (Taula 15).

Taula - 15 Composició dels medis d'arrelament

Medi	Solucions minerals i aditius orgànics	Sac <sub>1</sub> gl <sup>-1</sup>	VitD <sub>2</sub> mg l <sup>-1</sup>	Agar <sub>1</sub> gl <sup>-1</sup>	IBA mg l <sup>-1</sup>	NAA mg l <sup>-1</sup>
Moncousin i Gaspar (1983)	MS (1962)	20	10	8	-	1
Propi	MS (1962)	20	10	8	8	-

Atenent els resultats obtinguts amb aquets dos tractaments es testaren seguidament 11 medis d'arrelament (Taula 16), 8 dels quals contenien IBA ( $8 \text{ mg l}^{-1}$ ) i que alhora contemplaven certs aspectes nutricionals dels medis de l'equip de Moncousin, i els 3 restants corresponien als formulats per l'esmentat equip (Taula 9). El medis emprats anteriorment es corresponen amb els medis A10 i A4 respectivament.

Per a les dues proves s'utilitzaren microbrots individualitzats de més de 3 cm de longitud i amb un mínim de 3 fulles desenvolupades, procedents de material en fase de multiplicació (7 subcultius). Es comprovà que la longitud inicial dels brots emprats en els 11 medis d'arrelament no presentés diferències significatives entre tractaments, per



Taula - 16 Composició dels medis d'arrelament (\* MS + 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de tetraborat sòdic . Moncousin (1981); .. Moncousin i Gaspar (1983); ... Moncousin i Ducreux (1984)

Medi	Macro	Micro	Ad org	Sac <sub>gl</sub> <sup>-1</sup>	VitD <sub>1</sub> <sup>-1</sup> mg <sup>l</sup>	Agar <sub>gl</sub> <sup>-1</sup>	IBA mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	ANA mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
A1	MS	MS	MS	20	0	11	8	-
A2	MS	MS	MS	20	0	8	8	-
A3	MS	MS	MS	20	10	11	8	-
A4	MS	MS	MS	20	10	8	8	-
A5	½MS	MS	MS	20	0	11	8	-
A6	½MS	MS	MS	20	0	8	8	-
A7	½MS	MS	MS	20	10	11	8	-
A8	½MS	MS	MS	20	10	8	8	-
A9*	½MS	MS*	MS	20	10	8	-	1
A10**	MS	MS	MS	20	10	8	-	1
A11***	½LS	½LS	½LS	18	10	8	-	1

tal de garantir la homogeneïtat inicial de la població de microbrots en arrelament. La duració de l'assaig fou de 21 dies. Durant el període d'incubació es controlà cada 3 dies la llargada dels microbrots (20 microesqueixos/tractament) i el nombre d'arrels visibles (50 microesqueixos/tractament). En finalitzar el mateix s'avaluà a més a més el pes fresc i sec i el contingut hídric dels microesqueixos (20 microesqueixos/tractament).

### 3.5.2. Assaig II: Efecte de l'estat físic del medi

Els resultats de l'assaig d'allargament mostraren que els brots cultivats en medi líquid amb suport de perlita s'allargaven més ràpidament i amb major percentatge.

Atenent els resultats de l'assaig d'arrelament anterior (assaig II) es seleccionà el medi d'arrelament que havia originat el percentatge final de microesqueixos arrelats més elevat. L'esmentat medi era el A5 (Taula 16).

Analitzant els resultats d'ambdues proves es cregué convenient assajar l'efecte del medi líquid en la fase d'arrelament. Per aquests motius es contrastà el medi d'arrelament considerat oportú (A5) front el mateix medi eliminant l'agent gelificant per suport de perlita (medi líquid) i la incidència de l'efecte del medi d'allargament en els medis d'arrelament sòlids (Taula 17).

En aquesta prova s'utilitzà com a material vegetal microbrots procedents directament del medi de multiplicació de Harbaoui et al. (1982), i microbrots cultivats durant 10 dies en un medi d'allargament líquid amb suport de perlita, la composició del qual correspon al que obtení millors resultats d'allargament. Transcorreguts aquests 10 dies es seleccionaren microbrots de 3 cm de longitud, amb un mínim de 3 fulles ben desenvolupades i es procedí a l'assaig d'arrelament. Es comprovà que la llargada inicial dels microesqueixos emprats no presentés diferències significatives entre tractaments.

El nombre de microbrots utilitzats per a dur a terme aquest assaig fou de 235/tractament.

Taula 17 - Característiques del medi físic i de la procedència del material en la fase d'arrelament

Medi	Procència microbot	Agar (%)	Perlita (ml)
Ar1	Fase allargament	1.1	-
Ar2	Fase allargament	-	15
Ar3	Fase multiplicació	1.1	-

La duració màxima de la fase d'arrelament fou de 21 dies. Es considerà que als 3 dies després d'haver-se

visualitzat la formació d'arrels en la base dels microesqueixos, aquests ja serien aptes per a passar a ser aclimatitzats. Es prené aquesta decisió d'acord amb els resultats obtinguts en el primer assaig d'aclimatització.

Al llarg de l'experiència es comptabilitzava cada tres dies el nombre de microesqueixos arrelats. Al finalitzar la mateixa es determinà: la llargada final dels microbrots (235 brots/tractament), els pesos de les diferents fraccions del material vegetal (fulles, cal·lus i arrel) (30 microbrots/tractament) i els fenòmens de vitrificació (235 brots/tractament).

### 3.5.3. Assaig III: Activitat peroxidàsica en la rizogènesi

Per tal d'estudiar l'activitat peroxidàsica en la fase d'arrelament *in vitro* del cultivar "Blanca de Tudela" s'utilitzaren dos medis ben diferenciats en la seva composició hormonal. Els medis rizogènics escollits foren aquell que donà el millor percentatge d'arrelament en el primer assaig rizogènic (A5) i el medi de Moncousin i Gaspar formulat l'any 1983 (A10), que s'utilitzà com a testimoni, atès que els esmentats autors estudiaren detalladament en aquest medi la dinàmica de l'activitat peroxidàsica.

S'empraren trenta microesqueixos amb una longitud superior als 3 cm i amb un mínim de 4 fulles desenvolupades, procedents de 8 subcultius en el medi de multiplicació de Harbaoui et al. (1982).

L'activitat peroxidàsica s'estudià diàriament durant els 12 primers dies. Per a la seva determinació es trituraven 200 mg de fulles fresques, mitjançant l'ajuda d'un Polytron, amb 2 ml de tampó fosfat (pH 6.1, 0.06M) i

es centrifugava a 10.000 g durant 10 minuts. La fracció sobrenadant es tornava a centrifugar novament uns altres 10 minuts. Aquesta darrera fracció sobrenadant constituí l'extracte enzimàtic. L'activitat peroxidàsica per aquest assaig fou determinada a 420 nm (Quorin et al., 1974; Van Hoff i Gaspar, 1976; Moncousin i Gaspar, 1982; Moncousin i Ducreux, 1984) després de 45 segons d'incubació en una solució que contenia 7.9 ml de tampó fosfat Na-K (pH 6.1, 0.06M), 1 ml de guaiacol (1%), 1 ml d'aigua oxigenada (0.2 vol) i 0.1 ml d'extracte enzimàtic (Moncousin i Gaspar, 1983).

L'activitat peroxidàsica específica és expressada per a la majoria d'autors en µg d'equivalents de peroxidasa de rave picant per mil·ligram de proteïna soluble. La curva estàndar es determinà diàriament, per tant, amb extracte comercial de peroxidases liofilitzades de rave picant (ref. 128066 Boehringer Mannheim).

S'afegiren 0.25 ml d'àcid triclor-acètic (60%) en 1 ml de l'extracte enzimàtic per a la determinació de les proteïnes. El precipitat es centrifugà a 10.000 g durant 10 minuts. Una vegada eliminada la fracció sobrenadant es procedí a rentar el precipitat amb 1 ml d'una solució de clorur sòdic saturada d'acetona. Es tornà a centrifugar de nou i després d'eliminar la fracció líquida es deixà reposar durant uns minuts el precipitat fins que s'hagués evaporat l'acetona. Per a solubilitzar novament les proteïnes s'afegí 1 ml de NaOH (0.1N) i s'escalfà al bany maria (100°C) (Pilet i Braun, 1967).

La proteïna es determinà per fotocolorimetria segons el mètode de Lowry et al. (1951) a una longitud d'ona de 660 nm i un temps d'incubació de 20 minuts. La corba estàndar es realitzà cada dia de mesura emprant com a substrat sèrum d'albúmina bovina (ref. 7-4002 bioMérieux).

### 3.6. Assaigs d'aclimatització

#### 3.6.1. Assaig d'aclimatització I

En aquest assaig s'analitza l'efecte del medi d'arrelament de procedència en el procés d'aclimatització. Per aquest motiu la pauta d'aclimatització és única. El protocol d'aclimatització utilitzat deriva de múltiples assaigs realitzats, amb carxofera procedent de *in vitro*, a l'hivernacle de propagació de l'Escola Universitaria d'Enginyeria Tècnica Agrícola de Barcelona, que es descriu posteriorment.

El material vegetal que s'aclimatitzà en aquest primer assaig estava constituït pels microesqueixos arrelats i no arrelats al cap de 21 dies, obtinguts en el primer assaig d'arrelament *in vitro* (apartat 3.5.1).

El substrat escollit era una barreja de torba i perlita Decalite de gra hortícola (2:1 vol). En tractar-se d'una torba clarament acidòfila (pH = 3.5), 48 hores abans de la seva utilització s'esmenà amb  $2 \text{ gl}^{-1}$  de carbonat de càlci químicament pur, per tal d'aconseguir un pH més adequat per el posterior desenvolupament de les plantetes de carxofera.

Els microesqueixos, arrelats o no, es transplantaren en safates amb alveols individuals que contenien la barreja abans indicada. Les safates es col.locaren sobre una banqueta forrada amb una manta de reg i sota doble túnel de plàstic transparent. Prèviament a la col.locació del material vegetal sota el túnel petit, s'hi traslladaren les safates alveolades ja amb el substrat, per aconseguir que sota l'esmentat tunelet s'obtingués una humitat relativa propera a la de saturació, per tal que en el moment que es

fes la transferència del material vegetal de *in vitro* a *ex vitro*, aquest no suportés un stress hídric excessiu per manca d'humitat relativa en el nou ambient. L'hivernacle on es realitzà l'aclimatització està situat en el terrat de l'Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Agrícola. L'esmentat hivernacle és d'estructura metàl·lica i de vidre, dotat amb sistema automàtic de calefacció per aigua calenta que circula pels baixos de les parets laterals i per sota de les banquetes i dotat també d'obertura automàtica de les finestres cenitals.

Prèviament a realitzar l'aclimatització els vidres del hivernacle foren emblanquinats externament per a disminuir la irradiància. La calefacció es connectava quan la temperatura interior de l'hivernacle arribava a 18°C i les finestres s'obrien quan s'assolien 25°C.

Les plantetes de carxofera es mantingueren sota el doble túnel 15 dies. Quan finalitzà aquest període i durant 3 dies, a partir de les 20 h del vespre i fins les 9 h del dia següent s'eliminava el túnel petit. A partir del dia 19 el material estigué sota el túnel gran durant cinc dies. A partir del dia 24 i fins el dia 27 el túnel gran era retirat també dintre de l'horari abans esmentat. A partir del 28è dia i fins que s'acabà l'experiència (31 dies) el material estigué sols sota la cobertura de l'hivernacle.

Durant els 31 dies que durà l'assaig es pulveritzaven les plantetes diàriament amb una combinació d'aigua destil·lada (4vol) amb aigua corrent (1vol). Setmanalment es realitzà un tractament fungicida amb Captan ( $2.5 \text{ g l}^{-1}$ ).

La temperatura i la humitat relativa es registren en un termohigrògraf Lambrecht (Taula 18).

Taula - 14 Condicions ambientals durant els assaigs d'aclimatització I i II.

Període (dies)	Tmàx °C	Tmin °C	Tmit °C	HRmax %	HRmin %	HRmit %
<u>Aclimatització I</u>						
Doble túnel	27.8	18.6	23.2	100	96	98
Túnel senzill	25.3	18.3	21.8	100	75	87
Hivernacle	25.1	17.8	21.4	90	60	75
<u>Aclimatització II</u>						
Doble túnel	21.0	16.8	18.9	100	96	98
Túnel senzill	20.4	15.7	18.1	97	63	80
Hivernacle	19.7	15.4	17.6	86	60	73

Durant l'assaig s'avaluà periòdicament cada 3 dies el percentatge de mortalitat. En finalitzar el mateix es determinà l'exit de l'aclimatització i el pes sec de la part aèria i de l'aparell radicular del material considerat aclimatat.

### 3.6.2. Assaig d'aclimatització II

En l'assaig anterior s'observà que el material procedent del medi on s'havien obtingut els millors resultats d'arrelament mostraren una aclimatització deficient. Aquest tractament als 21 dies d'arrelament (final de la fase) era on s'observà el major desenvolupament radicular alhora que presentava fulles envellides. En cultiu *in vitro* és aconsellable finalitzar la fase d'arrelament poc després d'observar-se la protussió radicular atès que la perl.longació en el medi comporta disminució de la viabilitat. Per aquest motiu es programà un segon assaig per tal d'aclimatitzar les plantetes a les 48 hores d'haver-se observat l'aparició d'arrels. Amb aquesta pauta s'elimina l'efecte

envelliment del material vegetal en el medi i es constitueix un lot homogeni pel que fa a l'estat de desenvolupament radicular sigui quin sigui el medi emprat. El material utilitzat foren els microbrots prèviament allargats, dels tractaments amb medi líquid ó sòlid de l'assaig d'arrelament II (apartat 3.5.2). La pauta d'aclimatització fou la mateixa que la seguida en l'assaig d'aclimatització I, excepció feta de la freqüència de pulverització que en aquests cas es realitzà cada dos dies.



### 3.7. Estudis anatòmics i de composició foliars en les diferents fases de micropropagació en l'aclimatització

S'estudiaren els canvis en els paràmetres de composició i anatòmics que experimentà el material micropropagat en les diferents fases de micropropagació (multiplicació, allargament, arrelament i aclimatització) i del material post-aclimatat (2.5 mesos).

Els esmentats canvis foren estudiats en la darrera fulla formada completament expandida en cada una de les fases abans esmentada.

El material analitzat en les diferents fases provenia dels següents assaigs:

- Fase de multiplicació: Assaig III.  
S'empraren els brots desenvolupats en els medis que contenien  $11 \text{ gl}^{-1}$  d'agar, sota els tres règims d'irradiància imposats (Apartat 3.3.3.).
- Fase d'allargament: Formava part del lot de material obtingut per a realitzar el segon assaig d'arrelament (Apartat 3.5.2).
- Fase d'arrelament: Assaig II. S'analitzà sols en el material arrelat amb medi solidificat (agar 1.1%), que havia estat prèviament allargat (Apartat 3.5.2).

Fase d'aclimatització: Assaig II. S'analitzà sols en plantetes aclimatades, prèviament arrelades amb medi solidificat (Apartat 3.6.2.).

Fase post aclimatització: Formava part del lot de material aclimatat en el segon assaig d'aclimatització, i cultivat durant 2.5 mesos en hivernacle.

Excepció feta de les determinacions del pes específic foliar, del contingut en pigments fotosintètics i del contingut en nitrogen orgànic, per a la resta de determinacions es seleccionaren tres microbrots, microesqueixos, plantetes o plantes (segons fase) que representessin el més fidedignement possible la seva població.

### 3.7.1. Pes específic foliar (PEF)

Aquest índex ens informa de la quantitat de matèria seca respecte l'àrea foliar desenvolupada. Per a la seva determinació i atès la variació en el pes unitari s'emprà un nombre de fulles variable per a cada fase:

Fase de multiplicació:	80
Fase d'allargament:	30
Fase d'arrelament:	30
Fase d'aclimatització:	30
Fase de post-aclimatització:	10

L'àrea foliar es mesurà a partir de fotocopiar

el material i deduir posteriorment la seva superfície a partir del pes sec de les fraccions del paper.

### 3.7.2. Contingut de nitrogen

Es determinà el nitrogen orgànic i amoniacal pel mètode del micro-Kjeldhal (Chapman i Pratt, 1961), aprofitant la matèria seca obtinguda en les mostres de PEF, prèviament triturades i homogenitzades.

### 3.7.3. Pigments fotosintètics

Es determinaren els continguts de clorofil·la a, b i carotenoids espectofotomètricament a partir d'una extracció amb acetona (Lichtenthaler, 1987).

Per a cadascuna de les fases es realitzaren 5 rèpliques, amb un pes frec de mostra de 50 a 60 mg. El nombre de fulles emprades per aconseguir el pes de la mostra fou variable segons la fase, atenent el pes unitari de la fulla.

Els pigments fotosintètics s'extraïeren mitjançant homogenitzadors manuals de vidre Pobel, emprant com a dissolvent acetona del 80%. L'extracció dels pigments es realitzà a temperatura de 4-5°C i en condicions de mínima il·luminació. L'extracte obtingut s'enrasà a 10 ml en matraus aforats forrats amb paper d'alumini i s'homogenitzà. Es realitzà una centrifugació de l'extracte a 2000 g i a 4°C durant 20 minuts. Les lectures de la solució sobrenadant es realitzaren en un espectrofotòmetre Shimadzu UV-160, llegint l'absorbància de l'extracte a 470, 646.8, 663.2 i 750 nm.

La concentració dels pigments que expressarem en l'apartat de resultats per unitats d'àrea foliar ( $\text{gm}^{-2}$ ) es calculà a partir de les següents fórmules:

$$\text{clorofil.1a a (Cla)}: 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$\text{clorofil.1a b (Clb)}: 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$$

$$\text{clorofil.1a ab (Clab)}: 7.15 A_{663.2} + 18.71 A_{648.8}$$

$$\text{carotenoids (Cxc)}: (1000 A_{470} - 1.91 \text{ Cla} - 95.15 \text{ Clb})/225$$

També s'avaluà la relació de Cla/Clb, Clab/Ccx i Clab/Nitrògen.

#### 3.7.4. Caracterització estomàtica

S'intentà determinar la densitat estomàtica i la seva grandària a partir de lectura directa sota microscopi òptic Leitz en seccions de fulles ( $9 \text{ mm}^2$  de superfície) transparentades amb hidrat de cloral. Les seccions de les fulles seleccionades procedien de les mateixes fulles que s'utilitzaran per a les determinacions anatòmiques. Per a la transparentació es va preparar una solució amb hidrat de cloral i aigua en una proporció 25:10 (pes/pes). Les mostres es van col·locar en una estufa d'aire forçat a  $30^{\circ}\text{C}$  durant 48 hores. Les porcions de fulla foren subseqüentment rentades i muntades en aigua destil·lada. S'observaren els estomes tant de la part adaxial com de l'abaxial, mitjançant microscopia òptica. Determinar la densitat estomàtica resultà impossible degut a l'elevada presència de tricomes.

La projecció dels negatius de les fotografies obtingudes amb microscopia òptica s'utilitzà per a mesurar les diagonals màximes i mínimes dels estomes que eren visibles i determinar així la seva àrea per la fórmula de l'elipse. També es mesurà la llargada del porus.

Es realitzaren observacions en microscopia d'escombrat.

### 3.7.5. Anatomia foliar

Es tallaren seccions transversals de 1 mm d'amplada de la part central de la superfície de les fulles escolliades.

.Fixació: S'efectuà segons el mètode convencional de doble fixació:

- Immersió del material en glutaraldehyd al 2.5%, tamponat amb fosfat sòdic 0.1 M (pH 7.2-7.4) durant 24 hores a 4°C. Algunes vegades s'utilitzà com solució tampó cacodilat sòdic (Milloring, 1976).
- Tres rentats de 15 minuts amb el mateix tampó fosfat sòdic a 4°C, o bé tampó de cacodilat sòdic.
- Post-fixació amb tetròxid d'osmi (0.18M) en tampó fosfat sòdic 0.1 M durant 2-3 h a 4°C.
- Tres rentats de 15 minuts amb tampó fosfat sòdic 0.1 M (pH 7.4) a temperatura ambient.

.Deshidratació: S'introduïren les mostres en una sèrie progressiva d'acetona (50%, 70%, 80%, 90%, 96% i 100%) durant un període de temps entre 20 i 30 minuts a temperatura ambient.

.Inclusió: Es realitzà en una reïna plàstica tipus Spurr (Spurr, 1969):

- Immersió del material en una mescla d'acetona/reïna Spurr completa en proporció 3:1, durant 6 h (realitzant un canvi cada dues hores) i a temperatura ambient.

- Introducció del material en la mateixa mescla en proporció 1:1, durant 16-24 h, realitzant varis canvis, i a temperatura ambient.

- Immersió del material en la mateixa mescla en proporció 1:3, durant 16-24 h efectuant varis canvis i a temperatura ambient.

- Finalment el material s'infiltrà amb reïna pura durant 24-48 h, fent varis canvis, el darrer dels quals es realitzà 24 h abans de procedir a l'obtenció dels blocs.

.Obtenció dels talls: S'obtingueren seccions semifines, de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de gruix, amb un ultramicroscòpi Reichert-Jung mod OmU2 dotat d'un tall de vidre. Les piràmides dels blocs es realitzaren mitjançant un piramitom Reichert mod. TM60.

.Tinció de les seccions semifines: Les seccions semifines es recolliren en medi aquós, s'adheriren a un porta-objectes per calor (sobre una

platina calefactora a 90 °C i es tenyiren amb blau de metilè (10.5%) tamponant amb bòrax (0.5%, pH: 10-11). Seguidament es procedí a la seva observació després d'un rentat amb gran quantitat d'aigua destil.lada.

Es fotografiaren els semifins preparats en un microscopi òptic Leitz.

Les seccions transversals foren analitzades emprant un "Interactive Image Analyzer System" (IBAS) per a mesurar:

- gruix de la fulla
- gruix de cada teixit:
  - .epidèrmic
  - .mesòfil en palissada
  - .mesòfil lacunar
  - .espais intercel.lulars (espais intercel.lulars + vasos)

Per a cadascun dels parènquimes s'ha determinat:

$$\frac{\text{Àrea mesòfil}}{\text{Àrea foliar}} = \frac{\text{Nombre de cel.lules x perímetre mig}}{\text{Longitud del tall}}$$

$$\frac{\text{Volum del mesòfil}}{\text{Àrea foliar}} = \frac{\text{Nombre de cel.lules x àrea mitjana}}{\text{Longitud del tall}}$$

Es determinarà l'índex de circularitat (i.c.) segons Jagels i Dyer (1983):

$$i.c. = \frac{4 A}{p^2}$$

essent A l'àrea i p perímetre cel.lular.

El nombre de cloroplasts s'expressaran per mm de longitud de l'epidermis abaxial (Araus et al., 1986). També s'avaluà la densitat de cloroplasts, així com la relació entre el nombre total de cloroplasts i el valor total del perímetre de les parets cel.lulars del mesòfil (Araus et al., 1986).

Nombre de seccions cloroplàstiques

mm tall

Densitat cloroplàstica =  $\frac{\text{Nº seccions cloroplàstiques}}{\text{Àrea mesòfil/Àrea foliar}}$