

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

DISCUSSIO

5. DISCUSSIO

5.1. Assaig d'iniciació

La bibliografia referent a l'explantació d'àpexs caulinars inferiors a 1 mm de grandària evidencia la necessitat de realitzar un procés de desinfecció del material vegetal. La present Tesi, com ja s'indicà en l'apartat de material i mètodes, no inclou un assaig concret de desinfecció, però si més no i atenent als assaigs previs a aquest treball on es compararen diferents tipus de desinfecció, es creié oportú emprar la pauta descrita en l'apartat abans esmentat.

La pauta utilitzada resulta molt eficaç, tant des de la vessant pròpiament dita de la desinfecció del material vegetal, en no manifestar-se cap tipus de contaminació aparent, com des de l'òptica de la problemàtica de la formació de substàncies fenòliques, en no denotar-se en cap cas fenòmens d'embruniment en el medi.

L'absència del fenomen anterior possiblement està relacionada amb el fet de rentar el material vegetal amb aigua amb antioxidants i de realitzar la incubació dels àpexs caulinars durant una setmana en condicions de foscor. Moncousin (1980, 1981) cregué adient ubicà el material recent sembrat a les fosques, però la seva pauta de desinfecció no contempla antioxidants; la resta d'autors que han treballat amb l'espècie no fan cap al·lusió a la conveniència o no de posar els explants a les fosques, i sols l'equip de Harbaoui (Harbaoui i Debergh, 1980; Harbaoui et al., 1982) i d'Ancora (Ancora et al., 1981a,b) aconsellen emprar antioxidants en la pauta desinfectant. Els bons resultats obtinguts en la nostra pauta poden derivar, per tant, d'incloure ambdós tractaments preventius.

La desinfecció realitzada en l'assaig no implica pèrdua de material vegetal per problemes de necrosi, tot i que certs autors (Ancora et al., 1981a) insisteixen que l'èxit de la desinfecció va lligat a la pèrdua de material per fenòmens principalment d'aquesta mena. Possiblement el fet de no necrosar-se els àpexs caulinars en el nostre assaig es deu principalment al fet que la pauta emprada no contempla cap immersió del material amb etanol i a les combinacions i concentracions de matèries actives emprades. La majoria d'autors utilitzen alcohol etílic en les seves desinfeccions (Moncousin, 1980; Harbaoui i Debergh, 1980; Ancora et al., 1981a,b; Pécaut, 1983; Suelzu et al., 1989), mentre que Martínez i Cañameras (1988) associaren la necrosi a la presència d'etanol en els protocols de desinfecció. El percentatge de clor actiu utilitzat fou sensiblement inferior al citat per Moncousin (1980), però una mica més concentrat al descrit per Ancora et al. (1981a,b) i Suelzu et al. (1989). La bibliografia existent tampoc contempla la utilització en una mateixa pauta de desinfecció la combinació de clorur de mercuri i hipoclorit de sodi, llevat de la recomanada per l'equip de Harbaoui (Harbaoui i Debergh, 1980; Harbaoui et al., 1982) que utilitzen alhora dosis més baixes que les nostres de les dues matèries actives.

Altres autors (Suelzu et al. 1989) senyalen que la supervivència dels explants també està relacionada amb la concentració citoquinínica del medi, i que s'obté una millor implantació quan s'utilitzen dosis baixes. Tanmateix els nostres medis contemplaven els dos extrems de 2ip (1 i 5 mg l^{-1}) que més cita la bibliografia, i en cap cas, com ja hem esmentat, s'observà pèrdua de material vegetal. Contràriament el grau de desenvolupament és superior amb la dosi citoquinínica més elevada.

Durant la fase d'iniciació s'observa un comportament ben diferenciat entre el material sembrat en els medis amb les dues concentracions citoquiníniques estudiades. Els tractaments que presenten la dosi més elevada de Zip, a més d'iniciar abans la brotació, manifesten taxes de multiplicació totals i viables superiors, propàguls amb major nombre de fulles, un desenvolupament foliar i de cal·lus més ràpid, i més incidència de vitrificació foliar. Tanmateix la llargària del propàgul és bastant homogènia entre ambdós tipus de tractaments.

La major resposta morfogènètica detectada amb els tractaments amb 5 mg l^{-1} de Zip front els que tenien 1 mg l^{-1} de Zip demostra que el nivell mínim assajat no satura la resposta; de l'assaig no se'n pot despendre que 5 mg l^{-1} sigui la dosi òptima atès que no s'han assajat concentracions intermèdies ni superiors. En qualsevol cas i pel nostre material és més aconsellable dotar el medi d'iniciació amb 5 mg l^{-1} de Zip. La composició citoquinínica per a la iniciació de meristems de carxofera és un tema poc tractat a la bibliografia, s'aconsellen diverses formulacions sense presentar resultats comparatius atenent a la dosi, tipus i combinació. En general es destaca la major aptitud de la Zip. Alguns autors (Moncousin, 1980; Harbaoui i Debergh, 1980; Harbaoui et al., 1982) la utilitzen a dosis baixes (1 mg l^{-1}) i altres (Moncousin, 1982) a dosis més altes.

Harbaoui i Debergh (1980) indiquen que no és possible aconseguir la brotació del material inicial fins que aquest no sobrepassa els 2-3 cm de longitud. En el nostre assaig aquest fet es posa de manifest, però tanmateix s'observa que el grau de desenvolupament expressat en nombre de fulles és un indicador més cert de la capacitat de rebrotació que la llargària del propàgul. En aquest sentit cal remarcar que el tractament que exhibeix major nombre de fu-

lles és el que mostra la taxa de multiplicació viable més elevada, mentre que aquell que manifestà la menor formació de fulles esdevingué amb la taxa de multiplicació més baixa; això estaria d'acord amb la pauta de micropropagació de Moncousin (1981) que no considera adient transferir el material inicial al medi de multiplicació fins que aquest no hagi desenvolupat de 4 a 5 fulles.

Cal incidir en el fet que un major desenvolupament, va lligat a l'obtenció de material amb fulles amb més tendència a la vitrificació i més retallades, tot i que com ja hem vist anteriorment en l'apartat de resultats, no són quantitativament importats ambdós fenòmens. En ambdós tractaments, i ja en aquesta fase, s'observa una formació de cal.lus basal, el grau de desenvolupament del qual està estretament relacionat amb el de la part aèria; és a dir, la fracció cal.lus és major en els tractaments amb 5mg l^{-1} de Zip. Tanmateix en cap cas s'observa diferenciació caulinar a partir d'aquest cal.lus, el brot inicial i en el seu cas les gemes i els brots formats provenen del meristem inicial i dels primordis gemolars derivats d'aquest. La brotació és, per tant, sempre d'origen axilar, fet també citat per altres grups investigadors (Harbaoui i Debergh, 1980; Moncousin, 1980, 1981; Ancora et al., 1981a,b; Morone, 1985; Ancora, 1986; Martinez i Cañameras, 1988; Hueto, 1988; Suelzu et al., 1989; Cervera, 1989).

Harbaoui i Debergh (1980) per a la varietat "Violet d'Hyères" trobaren aconsellable la incorporació de baixes dosis de GA_3 per estimular la brotació axilar, sense explicitar l'època de l'any en la qual iniciaren la posta en cultiu. Moncousin (1981) senyala que el requeriment de GA_3 en els medis d'iniciació varia segons l'època de l'any: necessitats màximes a l'hivern, mínimes a la tardor, nul·les a la primavera. Els nostres resultats sobre la presència de

GA₃ en el medi d'inciació no manifesten cap efecte quant a la taxa de multiplicació assolida, ni tampoc incideixen en la longitud del propàgul, ni en el nombre de fulles. Els nostres resultats presenten una certa coherència amb els de Moncousin atès que l'explantació la realitzàrem a mitjans de setembre. La duració del fotoperíode de l'esmentat mes a la nostra latitud és lleugerament superior al de Suïssa, per la qual cosa és presumible que els nivells de giberel·lina endògena de les nostres plantes mares, en el mes de setembre, fos suficient per no precisar un requeriment suplementari, el qual sí que sembla necessari en les condicions de Suïssa. Fins i tot en el cas dels tractaments amb dosis altes de citoquinines, la seva presència (autoclavat o no) implica obtenir un percentatge més elevat de microbrots amb algunes fulles vitrificades, tot i que com ja hem citat anteriorment, aquest fenomen és poc important. Thimann (1977) ja hipotetitzà que el GA₃ endogen podia induir aquest fenomen.

En el nostre assaig d'inciació, com ja s'ha indicat en l'apartat de resultats mai s'hagueren de rebutjar microbrots vitrificats, tot i que certs autors (Harbaoui i Debergh, 1980) insisteixen en que en aquesta fase s'obté un elevat percentatge de microbrots vitrificats. Possiblement les diferències entre els nostres resultats i els dels esmentats autors es deguin principalment a la concentració d'agar del medi que en el nostre cas fou de 8 g l⁻¹ i en el seu de 6 g l⁻¹, d'acord amb els que estableixen Debergh et al. (1981) posteriorment.

El grau de desenvolupament assolit pels propàguls cultivats en els medis amb 5 mg l⁻¹ de 2ip a la sisena setmana (2 subcultius) és altament satisfactori. Per aquest motiu semblaria coherent finalitzar el període d'inciació en aquest moment i procedir al repicat en el medi de multi-

plicació. Amb aquesta modificació a igualtat de temps s'obtindria probablement una major descendència.

5.2. Assaigs de multiplicació

Els resultats obtinguts en l'estudi del comportament de les taxes de multiplicació al llarg de successius subcultius, atenent a l'època d'explantació, manifesten una clara resposta segons l'origen estacional del material utilitzat com a propàgul. Les millors taxes de multiplicació viables i totals es corresponen amb l'entrada d'àpexs caulinars realitzada el mes de setembre, mentre que la més desfavorable és la del mes de gener. Aquest comportament estaria força d'acord amb els resultats de Moncousin (1981), encara que en aquest cas per la fase d'iniciació, l'autor també observà que l'època més desfavorable era l'hivern. Barnés i Quintanilla (no publicat) en analitzar l'efecte època d'explantació en la fase d'iniciació i primer subcultiu en multiplicació en "Blanca de Tudela", i en el mateix clon que el nostre, detectaren taxes de multiplicació màximes i mínimes a setembre i març respectivament. Les nostres dades contrastades amb aquests resultats suggereixen que la capacitat organogènica ve força condicionada per l'estat fisiològic en el moment de l'explantació i que aquestes característiques diferencials es mantenen generalment com a mínim al llarg de set subcultius. Tanmateix, en altres espècies, com per exemple *Lantana sellowiana* no s'han trobat diferències en el comportament del material explantat en les diverses estacions de l'any (Scaramuzzi i d'Itolio, 1985). En analitzar l'efecte subcultiu per a cadascuna de les èpoques d'explantació s'observa en general que les taxes no són estables, fet que significa que hi ha un efecte subcultiu detectable. Aquesta inestabilitat provocada pels subcultius també ha estat citada en altres espècies com en *Actinidia chinensi*

(Standardi, 1982), *Manihot esculenta* (Roca, 1984), *Chaenomeles japonica*, *Crataegus brachyachantha*, *Potentilla fructicosa*, *Prunus cerasifera*, *Prunus tormentosa* (Norton i Norton, 1986), *Prunus*, *Malus* i *Pyrus* (Druart, 1987, 1988), en *Rhododendron* (Economou i Read, 1986), així com en *carxofera* per Moncousin (1980), Morone et al. (1979) i Cervera (1989); mentre que Ancora et al. (1981b) obtenen una elevada estabilitat. Generalment es pot considerar que les taxes de multiplicació s'estabilitzen després d'un determinat nombre de subcultius, però aquest comportament és variable segons el material micropropagat (Paul i Feucht, 1985; Lê, 1985) i els medis de cultiu (Druart, 1988). Moncousin (1980) aconseguix disminuir aquest fenomen afegint GA₃ en el medi de multiplicació, Morone et al. (1979) obtenen taxes de multiplicació estables a dosis altes de citoquinina (10 mg l⁻¹ de BAP), mentre que a dosis inferiors sembla ser necessaria la incorporació de GA₃ en els medis. En el nostre assaig tot i mantenint concentracions relativament altes de 2ip (20 mg l⁻¹) el fenomen es manifesta, per la qual cosa no sembla que vingui determinat per la concentració de citoquinina, caldria comprovar si l'adició de GA₃ en el medi fóra capaç de minimitzar el fenomen en el nostre material.

Les taxes de multiplicació en *carxofera* per a un cultivar o clon determinat són força variables atenent principalment el tipus i la concentració hormonal utilitzada (Harbaoui i Debergh, 1980; Moncousin, 1980, Ancora et al. 1981a,b; Cervera, 1989), a la qualitat de la llum (Suelzu et al., 1989) i concentració d'agar (Debergh et al., 1982; Ancora, 1986). En els nostres assaigs la utilització de la 2ip manifesta taxes de multiplicació superiors a les aconseguides amb tractaments que solament contenien KIN. Les combinacions d'ambdues citoquinines sols resulten adequades quan les concentracions de 2ip són inferiors a 15 mg l⁻¹, però mai arribaren a superar els resultats aconseguits amb

aquesta darrera concentració. El règim d'alta irradiància ($90 \mu\text{EPARM}^{-2}\text{s}^{-1}$) en general implica major taxa de multiplicació a concentracions d'agar baixes o altes, mentre que a concentracions intermitges semblava no influir.

La bibliografia existent en carxofera és poc explícita pel que fa referència al comportament del material vegetal en front diferents concentracions i combinacions hormonals. La majoria d'autors utilitzen la 2ip (Moncousin, 1980, 1981; Pécaut et al., 1983; Moncousin i Ducruex, 1984), però els únics que han presentat resultats, considerant diferents formulacions citoquiníniques (tipus i concentracions) són Debergh et al. (1981) i Cervera (1989). Aquests dos equips han estudiat varis medis amb diferents concentracions i combinacions de 2ip i KIN. Els nostres resultats, pel que respecte als tractaments formulats sols amb 2ip, són força coherents amb els dels esmentats autors, els quals obtenien les màximes taxes de multiplicació total i viable a 20 mg l^{-1} , però sense haver assajat concentracions intermitges entre 10 i 20 mg l^{-1} . La problemàtica principal derivada dels tractaments que contenien 2ip ha estat el fenomen de la dominància apical. Aquesta problemàtica en el nostre cas es manifesta per una rebrotació elevada (taxa total) i un allargament diferencial de 2.50 a 3.80 brots per tofa que constituïren el que anomenarem taxa viable; per tant sembla que l'allargament d'aquests brots restringeixi el desenvolupament continuat de la resta de microbrots de la tofa, és en aquest sentit que empren el terme de dominància apical. Aquest fet també ha estat remarcat pels autors abans senyalats. Els tractaments formulats sols amb KIN, com ja hem indicat anteriorment presentaren taxes totals i viables inferiors a les obtingudes amb 2ip. No obstant, Debergh et al. (1981) obtingueren taxes totals superiors emprant aquesta citoquinina que quan utilitzaven la 2ip. Aquest diferent comportament en front els nostres resultats, el podem atri-

buir al fet que les concentracions emprades per l'esmentat equip (2.5, 5, 10 i 20 mg l^{-1}) són més elevades que les nostres (0.1, 0.2, 0.4, 0.6 i 0.8 mg l^{-1}). Tanmateix la utilització sols de medis amb KIN els comportà la obtenció de tofes amb microbrots excessivament nans. Els resultats obtinguts per Cervera (1989) amb concentracions de KIN intermitges (0.5, 1, 2.5 i 5 mg l^{-1}) entre les analitzades per l'equip de Debergh i les que contempla aquest treball, tampoc implicaren taxes de multiplicació més elevades, ni l'obtenció de tofes amb un bon desenvolupament de tots els brots. Debergh et al. (1981) varen observar que el fenomen de la dominància apical abans descrit es podia minimitzar emprant combinacions de 2ip i KIN. La utilització conjunta d'ambdues citoquinines comportà als dos equips esmentats millors taxes de multiplicació, tanmateix Debergh et al., (1981) senyalaren les combinacions de 2.5 mg l^{-1} de KIN i de 2 a 10 mg l^{-1} de 2ip com les més adequades per a l'obtenció de tofes amb brots desenvolupats i homogènis, mentre que els resultats de Cervera (1989) destaquen les combinacions de 0.5 a 1 mg l^{-1} de KIN i 10 mg l^{-1} de 2ip, per obtenir taxes de multiplicació més elevades, però sense poder eliminar completament la problemàtica de la dominància apical. Cal destacar que el treball presentat per Debergh et al. (1981) sembla donar a entendre que no es presentaren combinacions amb concentracions més baixes de KIN. Els tractaments amb combinacions d'ambdues hormones no impliquen en els nostres assaigs obtenir millors taxes de multiplicació que les aconseguides amb 15 mg l^{-1} de 2ip, així com tampoc presenten tofes més homogènies. Les diferències observades en el nostre clon en relació a les respostes detectades per Debergh i Cervera, suggereixen que la major eficiència de les combinacions 2ip i KIN no són universals, sinó que presenten una dependència clonal manifesta.

La comparació de les taxes obtingudes en els nos-

tres assaigs amb les presentades per la resta d'autors és força difícil, atenent al fet que la majoria no discerneix entre el concepte de taxa total i taxa viable, llevat de Debergh et al. (1981) i Cervera (1989). Respecte aquests darrers autors, les millors taxes presentades en aquest treball són sensiblement superiors a les referides pels esmentats autors. Tanmateix cal remarcar que possiblement la resposta dels propàguls de carxofera a un medi i condicions ambientals determinades estarà relacionat amb les característiques internes pròpies del cultivar i/o clon emprat, amb el nombre de subcultius en el qual s'han realitzat les experiències i amb el tipus d'incisió que es realitza en el moment de la subdivisió del material (Harbaoui i Debergh, 1980).

En els nostres assaigs de multiplicació els percentatges de vitrificació han estat poc importants. Debergh et al. (1981) denotaren en carxofera que a partir d'una concentració d'agar del 1.1%, la vitrificació no es produïa en el cultivar "Violet d'Hyères", però a aquesta concentració s'observava una davallada important de la taxa total de multiplicació (1.5), i es potenciava el fenomen de la dominància apical. En medi líquid la taxa total de multiplicació que obtingueren era molt superior (3.75) a l'assolida en medi agaritzat (1.5), però el percentatge de vitrificació també ho era molt (40-80% de les tofes). En els nostres assaigs emprant les mateixes concentracions d'agar i de 2ip (20 mg l^{-1}) o fins i tot concentracions inferiors (0.8% d'agar i/o 15 mg l^{-1} de 2ip), s'obtenen taxes mitjanes de multiplicació total molt superiors (2.90-4.70) a la dels esmentats autors. Els percentatges de vitrificació observats en el nostre assaig, generalment, no presenten variació sensible en relació a les concentracions d'agar emprades (8, 9, 10 i 11 g l^{-1}) i es mantenen amb valors baixos (15% respecte el total de brots no viables). Aquest comportament

sembla contradir els resultats de Debergh et al. (1981) i no es corrobora en assaigs realitzats en el nostre Laboratori (no publicats); en aquest darrer cas s'observà que l'efecte negatiu, increment de la vitrificació, en disminuir l'agar era imperceptible en el primer subcultiu, i que incrementava a mesura que es subcultivava en medis amb baixes concentracions d'agar. Aquest fet explicaria l'aparent contradicció dels nostres resultats, atès que l'assaig implica un únic subcultiu. La disminució de la concentració citoquinínica mostra, com ja hem indicat anteriorment, un enlantiament del creixement i en conseqüència una disminució de la taxa de brotació, però sense detectar-se sensiblement una reducció del percentatge de microbrots vitrificats/tofa, la qual cosa estaria d'acord amb els resultats de l'equip de Debergh (Harbaoui i Debergh, 1980; Debergh et al., 1981).

Els nivells d'irradància a què són sotmesos els propàguls durant la multiplicació sembla indicar que la morfogènesi no es deu únicament a l'equilibri hormonal del medi, sinó que és veu afectada per la densitat de flux fotònic. El nombre de brots amb desenvolupament suficient per considerar-se viables augmenta generalment amb el PPF; al mateix temps s'observa que disminueixen els components de clorosi i vitrificació en l'establiment de la taxa de brots no viables. Aquest fet és el que condiciona que el percentatge de brots petits augmenti amb la llum, per tant sembla clar que la morfogènesi i la qualitat dels propàguls milloren a irradiàncies de $90 \mu\text{EPARm}^{-2}\text{s}^{-1}$ front a l'obtinguda a $20 \mu\text{EPARm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Els valors absoluts obtinguts en la fracció cal·lus en la fase de multiplicació en tractaments que sols contenen KIN, són més baixos que els assolits en material multiplicat amb 2ip o amb les combinacions d'ambdues citoquinines; en carxofera, sols Ancora et al. (1981b) i Suelzu

et al. (1989) fan referència a la no aparició de cal·lus en cultivars italians en medis formulats amb KIN. Com en la fase d'iniciació, el grau de desenvolupament del cal·lus en la fase de multiplicació està directament relacionat amb el grau de desenvolupament del propàgul, i com en aquella el tipus de brotació obtinguda és axilar (Harbaoui i Debergh, 1980; Moncousin, 1980, 1981; Ancora et al., 1981 a,b; Ancora, 1986; Martinez i Cañameras, 1988; Suelzu et al., 1989; Cervera, 1989).

Les tofes que manifesten en el present treball microbrots més allargats són aquelles desenvolupades sota tractaments que impliquen baixes taxes viables de multiplicació a una baixa o nul·la concentració citoquinina del medi i/o sota un baix nivell d'irradiància. El major allargament a baixa irradiància cal atribuir-lo a una resposta modulativa al règim de PFD, idèntic al descrit en els fenòmens d'aclimatació lumínica *in vivo* que permeten diferenciar morfològicament i fisiològica el fenotip de plantes crescudes a baixa i alta irradiància (aclimatació a sol i a ombra). Idèntics genotips a baixa irradiància permeten àrees foliars majors i entrenusos més allargats, que quan es sotmeten a altes irradiàncies (Björkman, O., 1981). En el cas concret de la carxofera l'increment en la longitud ve determinat principalment per un major allargament o per un increment en l'eix longitudinal foliar. La biomassa dels brots, expressada en pes sec o fresc no sembla dependre de la dotació hormonal del medi. En existir diferències notables quant a la taxa de multiplicació total i viable, aquest comportament cal atribuir-lo a un efecte clarament organogènic de les citoquinines. La utilització de matèria i energia del propàgul deriva, en el cas de dotacions hormonals baixes, principalment cap al creixement del propàgul, mentre que en incrementar les concentracions de citoquinina una major part del flux material i energètic s'aplica a la neoformació de

brots. L'augment de la concentració de l'agar en el medi no influencia sensiblement la biomassa del brot, mentre que el creixement es veu restringit a la menor irradiància assajada. La millora detectada a irradiàncies superiors a $20 \mu\text{EPARM}^{-2}\text{s}^{-1}$ es podria atribuir a una estimulació de la fotosíntesi que generaria una disponibilitat addicional de carboni i energia altre que el provinent del medi de cultiu.

El tipus de marge de les fulles no es veu clarament influenciat durant la fase de multiplicació per la concentració hormonal. El percentatge de fulles retallades és en general, molt baix (<10%). Sembla detectar-se que les combinacions hormonals que comportaren menors taxes (KIN de 0.1 a 0.8 mg l^{-1} i medi sense citoquinines) presenten quasi exclusivament, marge sencer; pel que fa a la Zip sola o amb combinació amb KIN, en el rangue de 5 a 20 mg l^{-1} no s'observa efecte diferencial. Els resultats observats en la fase d'iniciació per aquest paràmetre indiquen que l'augment de la concentració de la Zip (de 1 a 5 mg l^{-1}) comporta a més d'una taxa de multiplicació superior, un increment en el percentatge de fulles retallades. En multiplicació sembla que aquest efecte progressiu s'atura a 5 mg l^{-1} , no essent la resposta proporcional. En tractar-se de fases distintes amb història prèvia diferenciada, tant pel que fa als medis de cultiu com el temps transcorregut, sembla arriscat considerar de forma general que la divisió del marge és no dependent de la dosi de Zip a partir de 5 mg l^{-1} . El règim d'irradiància i la concentració d'agar tampoc afecten sensiblement a l'esmentat paràmetre.

5.3. Assaig d'allargament

La introducció d'una fase d'allargament, posterior a la multiplicació i prèvia a la rizogènesi, es mostra molt

interessant en diverses espècies vegetals, tant pel que fa a la pròpia activitat rizogènica, com en la posterior aclimatització (Aitken et al., 1981; Maene i Debergh, 1985; He-reu, 1987; Claveria et al., 1988; Martinez et al., 1988), així com perquè algunes vegades l'elongació del brot en la fase de multiplicació és inhibida per un nivell alt de citoquinina. Respecte la micropropagació de carxofera la major part de la bibliografia no esmenta directament la necessitat de passar els microbrots per aquesta fase, però sí que remarca la importància de fer arrelar *in vitro* sols aquells microbrots que hagin assolit un determinat desenvolupament, és a dir, una bona llargària (superior a 3 cm) i un adequat nombre de fulles (4-5 fulles) (Harbaoui i Debergh, 1980; Moncousin, 1981; Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984).

L'equip de Harbaoui (Harbaoui et al., 1982), en intentar arrelar microbrots directament *in vivo*, cregué adient sotmetre'ls prèviament a una fase d'allargament força llarga. Moncousin i Ducreux (1984) consideren escaient, també prèviament a l'arrelament, posar durant una setmana els microbrots en un medi sense contingut hormonal. Aquest subcultiu en medi sense contingut hormonal comporta una disminució del efecte residual citoquinínic, que generalment és negatiu en la fase d'arrelament, i alhora, encara que amb resultats variables, resulta eficaç per incrementar la llargada dels brots.

Els nostres resultats mostren que és possible allargar els microbrots en medis exents de citoquinines, amb un període molt més curt que el descrit per Harbaoui et al. (1982), variable entre 1 i 3 setmanes segons el medi emprat. La utilització de medis líquids en front de medis agaritzats implica obtenir microbrots més allargats i més ràpidament. El medi líquid amb suport de perlita és el tractament que

permet que els microbrots assoleixin la major llargada. Aquest comportament una mica diferent entre els dos medis líquids assajats (suport de perlita i suport de cotó) podria ser atribuïble a diferents raons. El potencial hídric d'ambdós tractaments, no estudiat en aquesta Tesi, podria ser diferent, i per tant contribuir a que en el medi amb suport de perlita existís una major difusió, tanmateix atenent a la metodologia emprada en l'assaig d'allargament resulta força difícil atribuir aquest diferent desenvolupament al potencial hídric, ja que sempre durant tot l'assaig el microesqueix estigué en contacte amb una fina capa de medi, és a dir, el contacte entre el microesqueix i el medi era directe, i per tant la difusió no era per capilaritat a través de la superfície dels suports. Un aspecte que sí que analitzàrem fou el pH assolit pels medis d'allargament 24 h després del seu autoclavatge, resultant el tractament amb suport de perlita amb un pH superior (6.11) al del suport de cotó (5.33). La perlita és a més a més un material ric en alumini, el qual podria ser alliberat al medi amb certa facilitat, resultant una altra font de variació possible entre ambdós medis líquids. No obstant, per poder assegurar que el diferent desenvolupament obtingut amb els dos tipus de tractament es degui a l'efecte del pH o la conjunció d'altres efectes, seria imprescindible realitzar altres assaigs molt més específics que abracessin aquests dos aspectes (potencial hídric i presència de Al en els medis).

D'entre els medis sòlids formulats amb dues concentracions d'agar (0.8 i 1.1%), els microbrots més allargats s'obtenen amb els tractaments que contempnen les concentracions més baixes. En aquest cas tot i no haver estudiar directament el potencial hídric dels medis, podem afirmar que a concentracions baixes d'agar li correspon un menor potencial hídric que a altes, i per tant existeix una millor difusió dels elements nutritius i una major

disponibilitat d'aigua, envers el microesqueix. L'equip de Thorpe (Brown et al., 1979; Thorpe i Brown, 1980) senyalaren que el potencial hídric del sistema de cultiu era un factor determinant en la diferenciació.

Atenent als dos tipus de sembra (profunda i superficial) que s'estudia per a qualsevol de les concentracions d'agar abans esmentades, els tractaments amb sembra profunda manifesten sempre un allargament del microbrot superior. Aquest comportament és presumiblement atribuïble a l'increment de la superfície de contacte entre el medi i el material vegetal.

D'aquest assaig es dedueix que els factors que incrementen la difusibilitat comporten un major allargament dels brots, això fa pensar que el subministrament de components del medi cap al brot, és un factor limitant del seu creixement en longitud. Atès que cal esperar una humitat relativa equilibrant superior en els medis líquids o a baixa concentració d'agar no es pot desestimar que aquest paràmetre climàtic atmosfèric sigui també limitant per l'allargament cel.lular tal com es demostra per a plantes cultivades en el camp o en cabines d'ambient controlat a humitats relatives distintes (Schulze i Hall, 1982).

5.4. Assaigs d'arrelament

A la introducció del present treball describirem la fase d'arrelament com una de les principals problemàtiques a superar en la metodologia de micropropagació de carxofera, i per a quasi bé tots els cultivars i/o clons estudiats.

Els autors que han treballat amb el cultivar

"Blanca de Tudela" (Peña i Ayuso, 1974, 1983; Hueto, 1988; Martínez i Cañameras, 1988; Arce et al., 1988), senyalen aquesta etapa com bastant problemàtica en assolir la majoria d'ells uns percentatges d'arrelament no del tot satisfactoris.

Els assaigs d'arrelament desenvolupats mostren una rizogènesi (dies visualització arrels, percentatge d'arrelament i nombre d'arrels) i una activitat peroxidàsica clarament distinta entre els dos tipus bàsics de medis estudiats, denotant-se un major percentatge d'arrelament i més homogeni en els brots cultivats amb els medis que contenien IBA en front d'aquells formulats amb NAA. La majoria d'autors (Moncousin, 1981; Ancora et al., 1981 a,b; Peña i Ayuso, 1983; Pécaut, 1983; Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984; Bigot i Foury, 1984; Arce et al., 1988) recomanen, no obstant, la utilització del NAA en els medis d'arrelament i a baixes concentracions (1 a 2 mg l⁻¹). Tanmateix Martínez i Cañameras (1988) indicaren que era possible obtenir uns bons percentatges d'arrelament (superiors al 70%) emprant IBA, i Hueto (1988) també senyalà que utilitzant IBA obtenia millors respostes d'arrelament que emprant NAA, si més no els seus percentatges d'arrelament no semblaven superar el 40%. En d'altres espècies com per exemple en *Pirus malus* (Nemeth, 1981), en *Prunus sp.* (Filiti et al., 1987) i en *Castanea sativa* (Ivanová et al., 1989) l'IBA també ha resultat l'auxina més adient per a l'arrelament.

Els percentatges d'arrelament obtinguts en els nostres assaigs són superiors als obtinguts per Hueto (1988). La causa d'aquesta diferència cal atribuir-la principalment a la concentració d'IBA emprada, 8 mg l⁻¹ d'IBA en els nostres assaigs en front dels 2 mg l⁻¹ utilitzats per Hueto, que era la mateixa dosi que la formulada per Harbaoui et al. (1982) en l'arrelament *in vivo* dels microesqueixos.

Tanmateix i considerant les experiències presentades per Moncousin i Ducreux (1984) el nombre de subcultius realitzats prèviament durant la fase de multiplicació incideix notòriament també en l'arrelament. En el nostre cas, l'arrelament es realitza amb microbrots subcultivats 8 vegades en medi de multiplicació, mentre que Hueto no ho indica.

La utilització de les solucions macrominerals de Murashigue i Skoog a la meitat de concentració manifesta un efecte estimulador de l'arrelament, fet que també han observat altres autors (Moncousin, 1981; Ancora et al., 1981 a,b; Peña i Ayuso, 1983; Pécaut et al., 1983; Bigot i Foury, 1984; Moncousin i Ducreux, 1984). Freqüentment les arrels veuen inhibit el seu desenvolupament tant *in vitro* com *ex vitro* quan el medi (medi de cultiu o substrat) presenta una concentració de sals elevada. Les solucions macrominerals de Murashigue i Skoog (1962) presenten un elevat contingut en nitrogen, fósfor i potasi, principalment, i per això és lògic aconseguir, generalment, millors arrelaments quan disminueix la seva concentració.

La presència de la vitamina D₂ en els nostres medis rizogènics no incrementa el percentatge d'arrelament. Per a la varietat "Vert de Laon", l'equip de Moncousin (Moncousin, 1981; Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984) notaren un efecte activador de la rizogènesi causat per l'esmentada vitamina, mentre que en el cultivar "Blanca de Tudela", Hueto (1988) tampoc observà cap efecte estimulant de l'arrelament en els tractaments amb vitamina D₂, per tant cal suposar que la resposta a l'esmentada vitamina depèn bàsicament del cultivar micropropagat.

La quantificació de l'evolució de la llargària dels microesqueixos en la fase d'arrelament mostra que els tractaments amb una concentració d'agar del 1.1% mani-

festen un menor augment de la seva longitud, que aquells cultivats amb 0.8% d'agar, tal com ja havíem vist en l'assaig d'allargament. La presència de la vitamina D₂ no sembla afectar sensiblement a la llargària, mentre que els tractaments formulats amb les solucions macrominerals de Murashige i Skoog a la meitat de concentració sí que exhibeixen un allargament superior dels brots. El medi que implica un major allargament dels brots fou el formulat per Moncousin (1981) en el qual confluien alhora nivell baix d'agar, macroelements a la meitat i presència de tetraborat sòdic; com ja esmentàrem en l'apartat de resultats possiblement aquest desenvolupament superior podria ser atribuït a la presència de l'esmentada sal. Tanmateix en el nostre assaig aquest medi resultà poc afavoridor de la rizogènesi. Hueto (1988) tampoc obtingué cap efecte estimulador de la rizogènesi quan va utilitzar aquest medi proposat per Moncousin.

Una important diferència, qualitativa i quantitativa, es detecta en les arrels adventícies formades, entre els microbrots cultivats en medis amb NAA, que exhibiren un menor nombre d'arrels, però molt més allargades, més fines i més ramificades que els ubicats en medis amb IBA, que presentaren un nombre d'arrels molt superior, però molt més curtes i pràcticament sense ramificar. Els tipus d'arrels formades en els medis amb NAA dificulta l'extracció del microesqueix del tub, fet també destacat per Arce et al. (1988), ja que pràcticament sempre gran part de l'aparell radicular no podia ser directament extret formant part del microesqueix arrelat, atès que es trencaven. Els assaigs de Moncousin (Moncousin, 1981; Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984), també han mostrat microbrots amb arrels llargues i ramificades, per la qual cosa recomanen un ràpid trasllat del material arrelat a la fase d'aclimatització, per tal d'evitar un posterior trencament del sistema radicular. Normalment, per a una determinada espècie, el ti-

pus d'auxina emprada incideix més directament en el tipus del sistema radicular, que la pròpia dosi formulada.

La vitamina D₂ en els nostres assaigs tampoc té un efecte afavoridor quan al nombre d'arrels, sinó al contrari, els tractaments que la contempnen manifesten una menor formació d'arrels. Els tractaments que alhora es formulen amb IBA i amb les solucions macromineral de Murashigue i Skoog a la meitat presenten a la fi de la fase d'arrelament un major nombre d'arrels que la resta de medis assajats.

Quan les concentracions auxíniques són molt altes es forma cal.lus en la base del propàgul, el qual podria inhibir el desenvolupament normal de les arrels (Lane, 1979). En els nostres assaigs on s'empraren dosis hormonals no gaire elevades, la quantitat de cal.lus format és baix, i és la mateixa per a tots els tractaments estudiats, en no presentar-se diferències significatives en l'avaluació del pes sec. Tot i no realitzar estudis histològics sobre la formació del sistema radicular, podem assegurar que aquest sempre s'origina a partir de la base del microesqueix i que mai es neoformà a partir del cal.lus.

Haver sotmès els microesqueixos a una fase d'allargament prèvia, no implica obtenir percentatges d'arrelament superiors al del material provinent directament de la fase de multiplicació, no obstant, cal recordar que tot el material presentava la mateixa llargària a l'inici de la fase d'arrelament, i per tant d'aquests resultats sols podem considerar que per a una mateixa grandària de microesqueix, el fet d'haver passat per un medi sense contingut hormonal no incrementa el percentatge d'arrelament. Els resultats obtinguts en medi líquid (amb fase d'allargament prèvia), així com el nombre d'arrels, esdevingueren signifi-

cativament inferiors en front dels resultats aconseguits amb els tractaments amb medi sòlid amb o sense fase d'allargament prèvia. Una gran quantitat de brots cultivats en medi líquid presenten aspecte de "plantes suculentes", i amb signes evidents de vitrificació. La utilització de medi líquid ha resultat estimuladora de la rizogènesi en cultiu de síndria amb suport de vermiculita (Barnes, 1979), en el cultiu de *Liquidambar styraciflua* amb suport de paper (Lee et al., 1986), mentre que en l'espècie *Camellia japonica* emprar medi líquid amb suport de paper front un medi agaritzat no presentà diferències significatives (Vieitez et al., 1989).

Les corbes corresponents a l'activitat peroxidàsica obtinguda segueixen el mateix model presentat per Gaspar (1981), és a dir, la representació gràfica de la variació de l'activitat peroxidàsica en la fase d'arrelament ens marca les dues etapes rizogèniques: una fase d'inducció evidenciada per un increment del total de l'activitat peroxidàsica, seguida d'una fase d'iniciació que comença a continuació d'haver-se assolit aquest màxim d'activitat, on es produeix un decrement de les peroxidases bàsiques.

En el nostre assaig el comportament de l'activitat peroxidàsica en ambdós tipus de tractaments estudiats, on la principal variació és la component hormonal (IBA: 8 mg l^{-1} ; NAA: 1 mg l^{-1}), ha estat diferent. En el medi amb IBA els màxims d'activitat s'assoliren ràpidament (3 dies), mentre que en el tractament amb NAA s'aconseguien amb més retard (7 dies).

Moncousin i Gaspar (1983) senyalaren com a corba "ideal" de l'activitat peroxidàsica lligada a rizogènesi en carxofera, aquella que mostra un increment ràpid de la mateixa (fase d'inducció), seguit d'una davallada pronuncia-

da de l'esmentada activitat (fase d'iniciació). Tanmateix els medis estudiats pels esmentats autors, tots ells formulats amb NAA, presentaren una evolució inicial de l'activitat peroxidàsica poc pronunciada, és a dir, els màxims d'activitat s'assolien en torn els dies 5è i 6è, mentre que pressuposen que obtindrien un millor arrelament si el màxim d'activitat s'obtingués abans. Els millors tractaments assajats per l'esmentat equip implicaren una davallada ràpida de l'activitat peroxidàsica a la fi de la fase inductiva.

L'evolució de l'activitat peroxidàsica en el nostre assaig corresponent al material vegetal procedent del medi amb IBA presenta una corba bastant similar a la denominada "ideal" per a la fase d'inducció, tanmateix la pendent de la corba després d'assolir el màxim d'activitat fou més suau que la teoritzada pels autors abans senyalats. El material en medi d'arrelament amb NAA manifesta una corba molt diferent a l'acabada de comentar; fins el 6è dia després de l'inici del tractament no s'observa increment de l'activitat peroxidàsica, mentre que en el tractament amb IBA a les 24 hores ja es comprova l'augment, aquest fet indica que la resposta al NAA té un període de retard (lag-phase) molt superior al del IBA. Tanmateix en el cas del tractament amb NAA, la davallada de l'activitat és més pronunciada (major pendent) que en el cas amb IBA. En aquest assaig es comença a veure l'aparició d'arrels en la base del microesqueix, en ambdós tractaments, el dia vuitè. No obstant això, el tractament amb IBA (major activitat peroxidàsica) presenta als pocs dies (11 dies) prop d'un 60% de microesqueixos arrelats, en front del tractament amb NAA (menor activitat peroxidàsica) que a la fi de l'assaig (21 dies) sols han arrelat un 40%.

Moncousin i Ducreux (1984) obtingueren una evolució de l'activitat peroxidàsica més propera a la teoritzada

i un major percentatge d'arrelament quan el material cultivat *in vitro* procedia de llavor o bé quan aquest havia estat repicat en medi de multiplicació durant diversos subcultius, 12 o 15 (màxima activitat peroxidàsica als 4 dies). No obstant això, en els nostres assaigs d'arrelament el nombre de subcultius durant la fase de multiplicació havia estat inferior (8). Amb 8 subcultius els esmentats autors obtenien una corba força similar a la nostra però amb més retard en el temps (el màxim d'activitat peroxidàsica l'obtingueren als 5 dies).

Atenent els nostres resultats podem considerar l'evolució de l'activitat peroxidàsica (temps i intensitat) en la fase d'arrelmant com un marcador bioquímic de la rizogènesi, fet ja comentat per altres autors en l'esmentada espècie (Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984) i en d'altres espècies vegetals com per exemple: en *Prunus* (Quorin et al., 1974), en *Asparagus* (Van Hoof i Gaspar, 1976), en *Malus domestica* (Druart et al., 1982) i en *Sequoiadendron giganteum* (Berthon et al., 1987).

L'increment ràpid de l'activitat peroxidàsica i l'alt nivell d'activitat assolit semblen ser determinants, en el nostre cas del bon percentatge d'arrelament obtingut. El pendent en la fase d'iniciació no sembla tenir una importància decisiva, atès el fet que en tractaments amb IBA el pendent és menor que l'obtingut amb NAA.

5.5. Assaigs d'aclimatització

Els canvis ambientals (règim d'irradiància, humitat relativa, temperatura, etc.) que es produeixen quan es passa de condicions *in vitro* a *ex vitro* poden causar diferents tipus d'stress: stress hídric, marciment foliar, des-

secació i moltes vegades la mort de les plantetes (Sutter i Langhans, 1979).

Els resultats obtinguts en ambdós assaigs d'aclimatització han demostrat la importància del tractament establert durant la fase prèvia d'arrelament. En el primer assaig on s'aclimatitza material arrelat amb medis que contenen IBA o NAA, després de 21 dies de cultiu, s'observa, en general, que el material que mostra una pitjor aclimatització és el que havia manifestat major aptitud rizogènica (tots ells formulats amb IBA). No obstant, els millors resultats d'aclimatització per aquest assaig s'obtenen amb microesqueixos procedents de medis d'arrelament formulats també amb IBA, mentre que els procedents de medis que contenen NAA presenten valors intermitjos i han estat els que exhibeixen menors percentatges d'arrelament. Per tant no podem atribuir al tipus d'hormona utilitzada en els medis d'arrelament un efecte clar en els resultats de la fase d'aclimatització. El fet d'haver cultivat tot el material posat a aclimatitzar durant 21 dies en els medis d'arrelament implica que a la fi de l'esmentada fase s'observin diferències qualitatives entre els microesqueixos. Els tractaments que implicaren un major percentatge d'arrelament exterioritzaren abans el sistema radicular. Una vegada format, les arrels s'allarguen i paral·lelament s'observà un deteriorament progressiu de la part aèria (esgrogueïment, assecament, etc.), això vol dir que els 21 dies de permanència en el medi d'arrelament, els tractaments amb major percentatge d'arrelament exhibeixen una qualitat de brots força inferior a la dels tractaments en els quals la rizogènesi fou menor i més lenta. Aquesta debilitat observada en les fulles dels microbrots podria suggerir un excès d'etilè en el tub de cultiu, provocat pel contingut auxínic del medi. Possiblement aquesta és la principal causa que implica una aclimatització diferent entre els microbrots en aquest assaig. Els resul-

tats corresponents al segon assaig d'aclimatització, on el material es posa a aclimatitzar als 2-3 dies de visualitzar-se les arrels, confirmen aquest supòsit, ja que s'obtenen uns elevats percentatges de supervivència, tot i provenir els microesqueixos emprats d'un dels medis d'arrelament que en l'assaig anterior havia donat un percentatge de supervivència molt baix.

Les condicions ambientals (humitat relativa i temperatura) esdevingudes durant la fase d'aclimatització, en ambdós assaigs, podem considerar-les adients atenent els percentatges de supervivència aconseguits. Probablement els elevats percentatges de supervivència obtinguts en varis tractaments poden anar lligats amb l'exposició progressiva a humitats relatives més baixes, des d'una humitat relativa propera al 100% quan el material està dintre el tub d'assaig fins assolir l'existent en la banqueta de l'hivernacle (lloc on es realitzà l'aclimatització). Marín i Gella (1988) obtingueren millors percentatges de supervivència en l'aclimatització de *Prunus cerasus* quan realitzaven també una exposició progressiva cap a humitats relatives més baixes, que quan feien tot l'aclimatament a humitats relatives properes a saturació.

Per a la majoria de tractaments d'arrelament s'observa la conveniència de posar a aclimatitzar material amb arrels visibles. Aquells microesqueixos que no mostren arrels en finalitzar la fase d'arrelament i que alguns autors consideren induïts, generalment, presenten una aclimatització deficient. La majoria d'autors que han treballat amb carxofa recomanen posar a aclimatitzar sols el material arrelat (Moncousin, 1980; M.Fortunato, 1985; Ancora, 1986; Arce et al., 1988)) i la resta tornar-los a subcultivar una altra vegada en medi d'arrelament essent possible amb aquesta pauta incrementar el nombre de microbrots arrelats (Anco-

ra et al., 1981b).

Els nostres resultats mostren clarament la no conveniència de passar a aclimatitzar material vitrificat, ja que la pèrdua d'aquest tipus de material és total, i a més de fer davallar consegüentment el percentatge d'aclimatització, podria suposar un cau de futures infeccions (fúngiques o bacterianes) per a la resta de material, atès que mostrem símptomes ràpids de podridura, segurament fisiològica, que no obstant, pot permetre secundàriament la colonització per diferents agents fiopatològics no saprofítics.

Possiblement de l'estudi de bescanvi de gasos (fotosíntesi neta i transpiració) al llarg de la fase d'aclimatització se'n podrien derivar trets importants, el coneixement dels quals permetria introduir modificacions, sobre tot medi-ambientals (adobat CO_2 , variacions de la humitat relativa i de la temperatura, etc.) que possibilitarien millorar l'èxit de l'aclimatització.

Els resultats de tots els assaigs en el present treball mostren la possibilitat de poder micropropagar amb certa facilitat i rapidesa, a partir d'apexs caulinars inferiors a 1 mm de grandària, el clon 711 del cultivar "Blanca de Tudela". No obstant, volem incidir que el comportament d'altres clons del mateix cultivar podrien haver donat resultats una mica o molt diferents.

5.6. Estudis anatòmics i de composició foliar en la micropropagació i en l'aclimatització

5.6.1. Fase de multiplicació

Els estudis anatòmics i de composició foliar en la fase de multiplicació han posat de relleu diferents comportaments del material vegetal segons el règim d'irradiància aplicat.

Els pesos específics foliars obtinguts en la fase de multiplicació a diferents règims lumínics mostren que el material vegetal *in vitro* es comporta com el de camp quan aquest creix sota diferents règims lumínics, i per tant els resultats obtinguts són coherents en observar-se a altes irradiàncies els majors PEF en valors absoluts. Donnelly i Vidaver (1984b) en *Rubus idaeus* també observaren que el pes sec de les fulles depèn de la intensitat de la llum aplicada durant el creixement.

La quantitat de radiació aplicada té efectes importants en el creixement de la fulla. En moltes espècies, l'expansió foliar és mínima a intensitats lumíniques molt baixes o molt altes, o és màxima a irradiàncies intermitges (en Gaba i Black, 1983). L'àrea foliar i el PEF també poden variar amb el fotoperíode, i poden decreixer linearament amb un increment del mateix (Dale, 1965) i del flux fòtonic rebut (Friend et al., 1962).

Els estomes, que s'observen al microscopi òptic tant en l'epidermis superior com en la inferior, presenten formes arrodonides, la qual cosa fa suposar que tinguin una baixa o nul·la funcionalitat durant aquesta etapa de multiplicació (Brainerd i Fuchigami, 1982; Wetzstein i Sommer, 1983; Marín i Gella, 1988, Marín et al., 1988). Les fotogra-

fies obtingudes per microscopia d'escombrat ens indiquen que en aquesta fase els estomes, i principalment els del revers no presenten un porus ben format, i en molts casos soldat. Tanmateix els resultats obtinguts per Schakel et al. (1990) al estudiar la funció estomàtica i la conductància cuticular en brots *in vitro* de *Malus pumila* indiquen que els estomes eren funcionals i tancaven en resposta les condicions ambientals en augmentar les demandes evaporatives.

L'anatomia foliar depèn àmpliament de les condicions climàtiques, especialment de la llum i de la temperatura (Chabot i Chabot, 1977; Kemp i Cunningham, 1981). El gruix total de les fulles analitzades, així com el dels diferents teixits (epidermis i mesòfil) i el quocient entre parènquima en palissada i parènquima lacunar augmenten en incrementar el PPFD aplicat. Per tant es confirma de nou el comportament paral·lel entre el material multiplicat *in vitro* i el de camp aclimatat a diferents nivells d'irradiància, ja que plantes aclimatades a diferents PPFD presenten un major desenvolupament del parènquima en palissada respecte el lacunar, quan més elevada és la radiació. Les plantes de camp aclimatades a alta irradiància mostren també un increment en el gruix foliar i en la importància relativa del parènquima en palissada (Nobel, 1976, 1977; Chabot et al., 1979; Araus et al., 1986). Aquest augment del gruix es degut principalment a un increment de la grandària corresponent al parènquima en palissada (Nobel, 1976, 1977), incluint el nombre de capes de cel·lules del mesòfil (Cutter, 1971; Dale, 1976).

La grandària cel·lular per als dos parènquimes (en palissada i lacunar) incrementa també atenent el flux fotònic aplicat, la qual cosa és coherent amb l'increment de la grandària dels teixits i consegüentment de gruix total. Araus et al. (1989) en estudiar els canvis anatòmics en

Fatsia japonica en relació als diferents canvis estacionals quantificaren àrees cel·lulars superiors durant la primavera i la tardor que a l'hivern, on a més d'haver-hi unes temperatures més baixes i un menor fotoperíode, també calia considerar la menor incidència de flux fotònic.

La relació Àrea del mesòfil/Àrea foliar en el parènquima en palissada augmenta amb la radiació, mentre que l'esmentada relació en el parènquima lacunar es manté més estable per a tots els nivells lumínics aplicats. Les plantes *ex vitro* crescudes a alt PPFD presenten també una relació Àrea del mesòfil/Àrea foliar superior que les aclimatades a nivells lumínics inferiors (Nobel, 1976, 1977; Araus et al., 1989). Aquest increment es deu a un augment de la grandària cel·lular i a un canvi en la forma cel·lular durant la fase de multiplicació; així durant la fase de multiplicació s'obtenen especialment per al parènquima en palissada cel·lules més prismàtiques quan més irradiància s'havia aplicat. Aquest efecte és menys clar en el parènquima lacunar.

La relació entre el volum del mesòfil i l'àrea foliar també incrementa en ambdós parènquimes a mesura que s'apliquen nivells lumínics superiors.

El règim d'irradiància aplicat durant la fase de multiplicació influeix notòriament en el contingut de pigments fotosintètics i en el contingut de nitrogen orgànic/superfície foliar. En incrementar el flux fotònic es produeix un augment de la relació Cl_a/Cl_b i un decrement de les relacions de Cl_b/N i Cl_b/C_{xc} . Donnelly i Vidaver (1984b) per a l'espècie *Rubus idaeus* observaren també majors quantitats de clorofil·la a règims d'irradiància baixos. Aquest comportament ha estat observat en plantes d'espècies superiors quan són aclimatades a diferents nivells lumínics

(Boardman, 1977; Björkman, O., 1981), o en diferents èpoques estacionals (Araus et al., 1989). Lee et al. (1985) en aclimatitzar microbrots arrelats procedents d'*in vitro* de *Liquidambar styraciflua* a diferents règims d'irradiància també observaren quantitats més elevades de Cla i de Clb a intensitats baixes. Altres autors, en plantes *ex vitro*, no han observat diferències en la relació Cla/Clb al llarg de les distintes estacions de l'any (Koch, 1976), o bé segons el règim d'irradiància aplicat (Oberbaner i Strain, 1986).

El nombre de seccions cloroplàstiques/unitat de longitud del tall augmenta en el parènquima en palissada, de baixa ($20 \mu\text{EParm}^{-2}\text{s}^{-1}$) a mitjana ($60 \mu\text{EParm}^{-2}\text{s}^{-1}$) irradiància, mentre que aquest comportament no és evident en el parènquima lacunar. No hi ha diferències en la densitat cloroplàstica, en relació al nivell lumínic rebut, ni en el parènquima en palissada ni el lacunar. La densitat cloroplàstica en el parènquima lacunar és superior a la del parènquima en palissada degut possiblement a la menor grandària de les cèl.lules del parènquima lacunar. Aquesta major densitat en el parènquima lacunar és contrària als resultats obtinguts per Araus et al. (1986, 1989), per cal destacar que aquests autors treballen amb material *ex vitro*.

5.6.2. Fases post-multiplicació

Els estudis anatòmics i de composició foliar en la resta de fases exhibeixen certes variacions, especialment durant la fase d'acclimatització.

L'àrea foliar incrementa al llarg de les successives fases, tanmateix el PEF no varia significativament. Durant la fase d'acclimatització es produeix un lleuger decrement del PEF, encara que no es significatiu. Aquesta dis-

minució podria estar lligada amb l'increment de la grandària i canvi de forma cel.lular, especialment la del parènquima en palissada que presenta formes més arrodonides. Martinez et al. (1988) en *Philodendron tuxla* també quantificaren un PEF lleugerament més baix en la fase d'aclimatització, així com un augment de l'àrea foliar. Smith et al. (1986) en *Betula platyphylla* i Donnelly et al. (1986) en *Rubus idaeus* comprovaren que l'àrea foliar incrementava al llarg de la micropropagació (d'*in vitro* a *ex vitro*).

Com ja detallàrem en la introducció, la forma de les cèl.lules estomàtiques corresponents al material micropropagat és variable segons les espècies i/o la fase de desenvolupament, podent variar de formes arrodonides a elíptiques. L'estudi al microscopi òptic de les característiques estomàtiques al llarg de les diferents fases de la micropropagació, inclosa la fase d'aclimatització, del cultivar "Blanca de Tudela" ens mostra formes cel.lulars distintes segons la fase de desenvolupament. Les formes més arrodonides s'observen en la fase de multiplicació, i les més elíptiques en la resta de fases; conseqüentment cal suposar que es produeix una transformació progressiva d'estomes inactius o no funcionals a estomes més capaços de realitzar obertura i tancament estomàtic. S'han observat al microscopi d'escombrat les superfícies adaxials i abaxials de les fulles al estadi d'aclimatització. En la cara abaxial els estomes són aparentment més oberts i més desenvolupats que en la cara adaxial, on l'ostiol es força prominent i les cèl.lules guarda poc diferenciades. Donat la seva estructura els estomes de la cara adaxial semblen restar permanentment oberts, és a dir sense capacitat de controlar la pèrdua d'aigua. Brainerd i Fuchigami (1982) i Blanke i Belcher (1989) atribueixen les pèrdues ràpides d'aigua durant l'aclimatització a aquesta manca de regulació estomàtica. La capacitat de regulació sembla, no obstant, augmentar sensiblement durant la

fase d'aclimatització. Els estomes observats per Donnelly i Daver (1984a) durant la micropropagació de *Rubus idaeus* presentaren formes força circulars, mentre que en *Philodendron tuxla* la forma dels estomes és de tipus elíptic (Martinez et al., 1988). En d'altres espècies, com per exemple en *Liquidambar styraciflua* (Wetzstein i Sommer, 1983), en *Prunus cerasus* (Marín i Gella, 1988; Marín et al., 1988) i en *Malus domestica* (Brainerd i Fuchigami, 1982) també s'han observat fulles amb estomes no funcionals en la fase de multiplicació *in vitro*.

Donnelly et al. (1986) visualitzaren en *Rubus idaeus* majors llargàries del porus de l'estoma en material provinent de la fase d'arrelament que el de la fase de multiplicació, mentre que els nostres resultats no fan visible aquestes diferències.

L'increment de la relació entre ambdós parènquimes al llarg de les diferents fases estudiades (de 0.69 a 0.89) implicaria una tendència progressiva del material micropropagat a presentar fulles més del tipus de "sol" (parènquima en palissada ben desenvolupat).

Durant la fase d'aclimatització es produeix un important augment de l'àrea mitjana cel.lular d'ambdós parènquimes, així com unes formes més arrodonides, la qual cosa unida amb un gruix total estable explicaria el resultat obtingut del PEF (decrement) en aquesta etapa.

La relació Àrea del mesòfil/Àrea foliar per a la fase d'aclimatització disminueix en ambdós parènquimes, però especialment en el lacunar. Aquesta davallada és coherent amb l'augment ja comentat de la grandària cel.lular d'ambdós parènquimes, i amb les formes cel.lulars més arrodonides obtingudes en aquesta fase per ambdós teixits, juntament amb

una estabilitat de la grandària dels mateixos.

La composició del contingut pigmentari de les fulles analitzades mostra algunes diferències al llarg de les successives etapes de la micropropagació realitzada. Durant la fase d'allargament i possiblement en relació a un efecte de dilució (desenvolupament foliar important en pocs dies) es produeix un descens de les clorofil·les totals, dels carotenoids totals i de les relacions Cla/Clb i Clab/N. L'avaluació del contingut pigmentari indica que la fase d'arrelament podem considerar-la força estable. No obstant, es manifesta una devallada (encara que no significativa) de la relació Clab/Cxc. En la fase d'aclimatització el material pateix un stress important, perquè s'ha d'adaptar a unes noves condicions ambientals (variacions d'humitat relativa, fotoperíode més curt, oscil·lacions de temperatura, distinta qualitat de llum, etc.). Generalment canvis ràpids de les condicions ambientals tenen un efecte negatiu important en la capacitat fotosintètica, en l'anatomia i en la ultraestructura dels cloroplasts, més dràstics que quan els canvis són per exemple de tipus estacionals, on existeix una adaptació progressiva a les noves condicions ambientals (Ballantine i Forde, 1970). L'stress observat ve marcat per un fort descens de les clorofil·les a i b, dels carotenoids i de la relació Clab/N, acompanyat per una devallada important del nombre total de seccions cloroplàstiques/unitat de longitud de tall i de la densitat de seccions cloroplàstiques, tant en el parènquima en palissada com en el lacunar. Martinez et al. (1988) estudiant els pigments fotosintètics de la darrera fulla desenvolupada en les diferents fases de la micropropagació de *Philodendron tuxla*, obtingueren resultats similars, en observar també en la fase d'aclimatització un decrement del contingut en clorofil·les totals i en carotenoids, però no de les relacions Clab/N i Cla/Clb.

Marín (1986) per a l'espècie *Prunus cerasus* trobà més quantitat de clorofil·les i carotenoids en les fulles de plantes aclimatitzades que durant la micropropagació. No obstant, l'avaluació de les clorofil·les i carotenoids per a fulles de la mateixa espècie però cultivades en el camp li donaren valors més baixos que el corresponent a les aclimatitzades. Donnelly i Vidaver (1984b) obtingueren una relació Cla/C1b més elevada en plantes aclimatitzades que en les fases *in vitro*. Tanmateix, en estar els càlculs d'aquests darrers autors realitzats en base al pes sec o al pes fresc, no són directament comparables amb els nostres resultats referits a superfície foliar, ja que els seus valors podrien dependre més de les variacions del pes específic foliar (fresc i sec) que de les variacions de clorofil·la. Grout i Millan (1985) que també expressen la quantitat de clorofil·la respecte pes, sí que troben una disminució important de la concentració de clorofil·la total en la fase d'aclimatització. També Syvertsen i Smith (1984) obtingueren una disminució de la concentració de clorofil·les al passar plantes de *Citrus* cultivades a l'ombra a condicions de més alta intensitat lumínica.

Cal destacar el decrement del nombre de seccions cloroplàstiques/unitat de longitud de tall en la fase d'aclimatització. Aquest comportament pot ser degut a dos factors relacionats, a un increment de la grandària de les cel·lules parenquimàtiques (disposició cel·lular més baixa), així com a un descens de la densitat cloroplàstica.

Basant-nos en tot el conjunt de característiques anatòmiques i paràmetres relacionats estudiats podem afirmar que en la fase d'aclimatització es produeix un fort stress que es caracteritza per alteracions foliars.

Whatley i Whatley (1984) i Marín i Gella (1988) caracteritzaren les fulles d'*in vitro* com fulles d'ombra, perquè contenen menys capes cel·lulars, en estar les cèl·lules del parènquima en palissada menys compactades i ser menys prismàtiques, per presentar uns grans espais intercel·lulars en el parènquima lacunar, i també per presentar un sistema vascular menys extens i unes parets cel·lulars més primes que les fulles de sol. Aquesta estructura similar a la de les plantes d'ombra ha estat descrita també per altres autors (Grout i Aston, 1978a; Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein i Sommer, 1982; Donnelly i Vidaver, 1984a,b; Fabri *et al.*, 1986). Finalitzada la fase d'aclimatització aquestes fulles segons Whateley i Whateley (1984) i Marín i Gella (1988) poden modificar la seva estructura, que esdevindria més similar a la de les fulles de sol, amb una densitat cel·lular més elevada i una doble capa cel·lular en el parènquima en palissada, a més d'incrementar la seva àrea foliar (Grout i Millan, 1985; Martinez *et al.*, 1988). Per contra Donnelly i Vidaver (1984b) trobaren que l'àrea foliar no augmentava i Grout i Aston (1978a) sols observaren un lleuger allargament de les cèl·lules situades immediatament per sota de l'epidermis i Fabri *et al.* (1986) a les tres setmanes observaren un allargament cel·lular, però mantenint-se el mateix nombre de cèl·lules.