

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

INTRODUCCIO

1. INTRODUCCIO

1.1. Origen, importància i distribució de la carxofera

La carxofera (*Cynara scolymus*, L.) és una planta herbàcia pertanyent a la família de les *Asteraceae* o *Compositae* i que actualment assoleix una considerable importància econòmica a tota la regió mediterrània. És una espècie conreuada per l'aprofitament de la part carnososa dels seus capítols o caps florals, ja sigui per consum en fresc o en conserva.

Segons la majoria de botànics, el gènere *Cynara* forma un petit grup taxonòmic compost per una espècie cultivada *C. scolymus*, L. i tres espècies salvatges, localitzades en la zona mediterrània: *C. cardunculus*, L., àmpliament distribuïda per tota la regió, *C. sibthropiana*, Boiss i Helds, que es desenvolupa en les Illes Egees i *C. syriaca*, Boiss, ubicada en el sur de Turquia, Síria, Líban i Israel (Zohary i Basnizky, 1975).

Segons Boswell (1949), l'espècie *C. scolymus*, L. és originària de les àrees centrals i occidentals de la regió mediterrània. Diversos autors (Marzi, 1969; Foury, 1978, 1979; Ancora et al., 1981b) han trobat referències del conreu de carxofera des dels inicis de l'era cristiana. Plinius descriu el conreu, la propagació del material vegetal, dates de plantació, i Columella i Galeno escrigueren de les seves propietats terapèutiques.

Aquest conreu i el de *C. cardunculus* L. foren molt populars en l'Imperi romà, però amb la caiguda del mateix probablement deixaren de conrear-se, ja que no se n'han trobat referències posteriors fins al segle XV, quan es tornà a cultivar la carxofera a l'àrea de Nàpols, d'on passà

a Venècia i Florència (Boswell, 1949). A partir d'aquest ressorgiment és quan l'esmentada espècie començà a ser cultivada comercialment per l'aprofitament dels seus capítols o inflorescències en estat inmadur. Posteriorment, el conreu arribà a França, Espanya i Anglaterra. La primera referència del conreu als Estats Units es troba en el catàleg de "McMahon's Gardeners" del any 1806 (Hedrick, 1972).

Actualment *C. scolymus* L. és cultivada en els cinc continents per al consum humà bàsicament i també per l'extracció de certes matèries farmacològiques (cinarina), destacant com a principals zones productores els països de la regió mediterrània, la costa central californiana, certes àrees d'Argentina i de Xile. Els principals països productors de carxofes són per ordre d'importància Itàlia, on el conreu de carxofera és realitzat pràcticament arreu del país, Espanya i França on el cultiu es troba restringit en unes àrees concretes. Aquests tres països comptabilitzen més del 70% de la producció mundial (Taula 1).

Les estadístiques facilitades pel Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació (M.A.P.A., 1989, 1990) i pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (D.A.R.P., 1986) senyalen com les zones amb major producció a l'Estat espanyol les províncies de Llevant (Alacant i València) i la zona del Delta de l'Ebre (comarques del Montsià i del Baix Ebre), seguides de La Rioja i Navarra (Taula 2 i 3).

La superfície global espanyola dedicada a aquest cultiu s'ha mantingut constant, amb poques oscil·lacions, des dels inicis dels anys vuitanta (Taula 4).

Taula 1 - Superfícies i produccions mundials, 1988

	Superfície (ha)	Producció (t)
Africa	19.000	151.000
Algèria	9.000	40.000
Egipte	3.000	55.000
Marroc	5.000	41.000
Tunísia	2.000	15.000
Amèrica	10.000	148.000
Estats Units	4.000	55.000
Argentina	4.000	78.000
Xile	2.000	15.000
Europa	95.000	947.000
França	14.000	88.000
Grècia	3.000	32.000
Itàlia	48.000	494.000
Espanya	30.000	333.000
Altres països	3.000	21.000
Total mundial	127.000	1.267.000

Font: FAO

De les dades observades a les taules es desprèn que a Catalunya es produeix aproximadament el 12% de la carxofa espanyola.

La difusió de l'espècie ha influït lògicament en la seva evolució; les condicions ambientals, els sistemes de conreu i la selecció realitzada per l'home en relació a les seves preferències de consum, i l'escàs intercanvi de material vegetal han generat que actualment existeixi un important nombre de varietats i/o cultivars diferents, tant en les característiques de la planta mare com dels fruits (precocitat, grandària, forma, color, nombre de capítols/planta, etc.) (Porceddu et al., 1974).

Taula 2 - Estimacions de superfícies i produccions espanyoles, 1990

Províncies i C. Autònomes	Superfície (ha)	Producció (t)
Navarra	1.030	12.200
La Rioja	1.304	10.000
Catalunya	3.690	47.000
Barcelona	940	10.700
Girona	10	1.000
Tarragona	2.640	28.400
Lleida	100	7.000
C.Valenciana	11.530	154.500
Alacant	4.100	51.000
Castelló	1.430	16.500
València	6.000	87.000
R. de Murcia	8.500	130.000
Andalucía	1.540	18.000
Almeria	60	700
Cádiz	325	4.400
Córdoba	100	1.300
Granada	175	2.100
Huelva	70	500
Jaen	110	800
Málaga	100	700
Sevilla	600	7.500
Altres comunitats	4.104	39.200
Total Estat espanyol	31.698	410.900

Font: M.A.P.A.

Taula 3 - Superfícies i produccions comarcals, 1984

Comarca	Superfície (ha)	Producció (t)
Baix Llobregat	705	11.558
Maresme	68	279
Tarragonès	33	412
Baix Camp	343	4.287
Ribera d'Ebre	52	564
Baix Ebre	735	9.172
Montsià	1.205	15.062
Resta comarques	254	3.163

Font: D.A.R.P.

Taula 4 - Evolució estatal del cultiu

Any	Superfície (mils d'ha)	Producció (mils de t)	Preu percebut pels agricultors (pta/kg)
1955	4.4	31.6	4.02
1965	14.2	123.7	8.02
1975	19.3	226.4	12.05
1980	22.0	288.2	21.83
1981	23.9	248.3	33.89
1982	22.8	257.0	36.39
1983	23.5	257.9	46.30
1984	25.6	289.1	50.08
1985	27.1	268.9	56.02
1986	26.0	360.9	35.64
1987	25.3	338.0	60.84

Font: M.A.P.A.

El Laboratori de Germoplasma del Consell Nacional d' Investigació Italià posseeix una important col·lecció mundial amb més de 140 cultivars de carxofera (Porceddu, 1979). Tanmateix, actualment tan sols 40 cultivars tenen una certa importància a nivell productiu.

Un tret característic en el cultiu de carxofera és el fet que cada país produeix amb una certa importància comercial, tan sols un o dos cultivars, excepció feta d'Itàlia. En aquest darrer país, la utilització dels diferents cultivars és molt específica segons la regió considerada, en relació a la demanda dels mercats interns (Magnifico, 1987; Mauromicale, 1987).

D'acord amb Espelta et al. (1983) la varietat més conreada a Catalunya i a la resta del Estat és "Blanca de Tudela", tanmateix la majoria de vegades les plantes que es conreen en una mateixa parcel·la no pertanyen a un cultivar i/o un clon determinat, sinó a un conjunt de diferents poblacions, ja que actualment no existeix un control el suficientment estricte que garanteixi la puresa varietal.

Altres cultivars conreuat són: "Blanca de Aranjuez", "Beni-carló", "Prat", "Reus", etc.

Tot i tractar-se d'una espècie perenne, la durada del conreu sempre ha estat limitada per la producció obtinguda. Actualment és bastant inviable mantenir la plantació més d'una campanya (zona mediterrània), ja que si aquesta es prolongués, l'input que genera el manteniment de la mateixa arribaria a superar l'output produït, ja que aquest darrer aniria minvant a mesura que s'envellís la plantació, al obtenir un rendiment cada cop més baix. Tanmateix a Navarra els agricultors solen mantenir la plantació més d'una campanya. Com a norma podem dir que a partir de l'any i mig, la producció decau estrepitosament per diferents motius que ja indicarem més endavant.

1.2. Reproducció tradicional de *Cynara scolymus*, L.

1.2.1. Sistemes de reproducció

1.2.2.1. Via vegetativa

La carxofera és un cultiu plurianual que a la regió mediterrània es propaga vegetativament emprant diferents tipus de material segons costums i/o época de multiplicació. Els horticultors dels principals països productors de carxofa solen fer servir, generalment, com a material reproductor cardets, estagues, troços de soca o bé ulls. Un cardet és un brot axil·lar separat de la planta mare abans que es produexi el viratge floral. Les estagues són fraccions de tiges basals que en la seva part inferior porten gemes latents. Una soca és un fragment de rizoma amb arrels d'uns 15-20 cm de llargada. Les soques i les estagues cal separar-les de la planta mare després de la parada vegetativa que se li produeix quan es deixa de regar a l'inici de l'estiu. Els ulls són gemes engrandides i latents. El primer tipus de material, molt emprat pels productors francesos, es recomana quan les noves plantacions es realitzen a la tardor o a l'hivern; tanmateix és un sistema poc utilitzat en altres zones pel seu elevat cost de producció, ja que els cardets han de ser prèviament arrelats, la qual cosa es realitza, generalment en viviers abans de plantar-los en el camp. Quan la plantació es fa a ple estiu (juliol-agost) la soca esdevé el material idoni. A Catalunya el sistema més emprat és la reproducció per soca. L'únic país on la utilització dels ulls té certa importància és Itàlia.

Actualment les plantes mares que hauran de constituir la nova plantació poden provenir de dos tipus de material molt diferent. En els millors casos es tractarà de material certificat (amb garantia varietal); però la majoria de vegades procedeix de la pròpia explotació agrícola, i ha estat el propi horticultor qui durant les campanyes prèvies ha seleccionat, segons el seu propi criteri, les plantes que utilitzarà com a material reproductor. Normalment quan un agricultor decideix implantar per primera vegada aquest conreu a la seva explotació no dubta a adquirir material certificat, però com que el valor afegit brut que aconsegueix amb les carxofes no és gaire elevat i a més és força fluctuant, generalment no tan sols segons la campanya, sinó al llarg de la mateixa, fa que quan ha de replantar de nou per tal de disminuir els inputs, es procura ell mateix el material a emprar. També cal destacar que no sempre el material certificat es comporta millor que el seleccionat pel propi agricultor, ja que existeix una important font de variabilitat en l'adaptació dels diferents clons a altres zones de cultiu. És freqüent que clons molt productius en zones valencianes o navarreses, quan són cultivats a Catalunya pateixen una forta davallada de producció.

1.2.1.2.Via sexual

La propagació per llavor és actualment molt poc utilitzada pels agricultors, per mor de l'elevat grau d'heterocigosi de l'espècie, esdevenint normalment amb aquest sistema de reproducció plantes de pèssima qualitat comercial, al formar-se uns capítols petits i unes bractees força obertes. Pràcticament tan sols és utilitzada en el camp de la millora vegetal. Tanmateix a la zona del Delta del Ebre i puntualment els anys 1989 i 1990 una empresa agrícola sembrà a la primavera unes parcel·les de llavors de carxofe-

ra de cultivars americans amb la finalitat d'aconseguir carxofes a ple estiu.

1.2.2. Problemàtica de la multiplicació

1.2.2.1 Index de multiplicació

La multiplicació tradicional presenta un baix índex de propagació i/o una baixa eficiència. Quan es multiplica per cardets sense passar per viver per tal d'abaratir els costos d'implantació del cultiu, la supervivència dels esqueixos plantats no sol ser superior al 50% (Ancora i Saccardo, 1987). El nombre màxim de soques que es pot aconseguir per planta mare és de 3 ó 4, per tant, quan una planta mare és de qualitat excel·lent i vol ser utilitzada com a productora de noves plantes que puguin seguir mantenint les seves qualitats comercials (rendiment, precocitat, resistència a les malalties, etc.), en obtenir-se una taxa de propagació tan baixa fa que no es pugui aconseguir emprant aquesta tècnica un elevat nombre de descendents que poguessin arribar a establir la propera campanya una parcel·la de cultiu amb material de qualitat i uniforme. Utilitzant aquest sistema una parcel·la comercial sempre estarà constituïda per material vegetal procedent de nombroses plantes mares. Totes les fraccions de soques seleccionades i enterrades en el camp a l'estiu presenten a Catalunya un percentatge de supervivència irregular, segons si es tracta, com ja hem explicat anteriorment de material seleccionat i certificat o bé si procedeix de les pròpies explotacions. A la zona del Delta del Ebre, per exemple, quan les soques provenen del primer origen es pot arribar fins i tot a assolir un èxit en la implantació del cultiu del 80%, mentre que quan el material és adquirit en la pròpia zona, el percentatge de supervivència està molt relacionat, normalment, amb les con-

dicions ambientals de la campanya precedent; si s'han produït problemes d'entollament, pràcticament no s'arribarà ni a aconseguir un 40% (T. Fosch, comunicació personal), perquè la carxofera és una espècie molt sensible a la asfíxia radicular.

1.2.2.2. Transmissió de malalties i degeneració

Els sistemes vegetatius tradicionals de propagació tenen un alt risc de transmissió de malalties criptogàmiques (bacteris, fongs) i de nematodes, i principalment d'infeccions virals, atesa la seva fitopatogeneïtat i manca de control sanitari d'aquest darrer agent.

Des de fa alguns anys a tota la conca mediterrània es ve produint, i principalment a les varietats de fulla dentada, una degeneració de la carxofera caracteritzada per un marcat nanisme de la planta, amb fulls molt petites i arrissades i un rendiment pràcticament nul. Diversos autors atribuiren aquesta degeneració a la presència de certs virus (Costa et al., 1959; Marrou i Mehani, 1964; Welvaert i Van Varenberg, 1979). Posteriorment es relacionaren aquests símptomes, no ja amb una virosi simple, sinó amb una acció conjunta de virus i bacteris (Welvaert i Van Varenberg, 1979). S'han aïllat diversos tipus de bacteris, presents a plantacions de carxofera, pertanyents als gèneres *Pseudomonas*, *Erwinia* i d'altres en forma de bastó però que no són del gènere *Corynebacterium* (Welvaert i Van Varenberg, 1979).

Com ja hem dit anteriorment el cultivar "Blanca de Tudela" és força heterogeni i sovint manifesta uns canvis morfològics, fins i tot en material seleccionat. Per tant és d'esperar que d'una mateixa planta mare sorgeixi alhora una descendència amb un determinat percentatge d'heterogeneï-

tat (variacions intraclonals). Per aquest fet pràcticament a tots els camps espanyols productors de carxofes de l'esmen-tat cultivar veurem sempre la presència d'individus ben di-ferents al parental. Les malformacions més freqüents obser-vades són o bé plantes que alhora que estan menys desenvolupades també són menys productives i presenten uns capítols axatats, o bé plantes que manifesten un creixement extrema-dament vigorós, que mostren unes característiques botàniques més properes al card (*C. cardunculus*, L.) que a la seva prò-pia espècie. Aquest creixement sempre està lligat a la pre-sència de fulles pinnatífides i a una pèrdua de productivi-tat i precocitat. Aquestes plantes solen donar una capsa (primer capítol que apareix) força gros, però després les filloles i les refilloles (altres capítols) esdevenen molt petites, presentant també unes bràctees més punxagudes i més amoratades. Aquests tipus d'anomalies s'han observat també en altres varietats de fulla llisa com "Blanca de Aranjuez" i "Violet de Provence". Aquests dos tipus de plan-tes reben el nom de material o plantes degenerades. Aquestes plantes a les zones productores catalanes reben el nom de "Caps de mort" o "Caps de gat". Aquesta degeneració també és present a les plantacions franceses del cultivar de fulla sencera "Violet de Provence" i anomenades l'any 1967 per Po-chard i col.laboradors plantes tipus "pastel" (Pécaut, 1986). També s'han observat en alguns cultivars italians de fulla sencera.

1.2.2.3. Virosis de la carxofera

Els problemes de virosi en la carxofera són greus. El seu estudi és difícil per mor de l'heterogeneïtat morfo-lògica i fisiològica de l'hoste, així com les dades alguns cops confuses de la bibliografia.

Fins a l'actualitat han estat descrits 16 virus presents en el gènere *Cynara*, recopilats l'any 1979 per Martelli et al., dels quals 14 s'han pogut aïllar en la espècie *C. scolymus*.

Existeixen alguns virus que tot hi estar presents a les plantes de carxofera no els ocasionen aparentment greus perjudicis. Aquests virus es denominen latents. Costa et al. (1959) describiren per primera vegada el Virus Latent de la Carxofera (ALV, Artichoke Latent Virus) que normalment no manifestava cap tipus de simptomatologia visual, i que estava present a totes les plantacions de carxofera californianes. Posteriorment l'any 1964 Marrou i Mehani trobaren un virus que afectava totes les plantacions franceses i tunisenques, i que presentava unes característiques molt similars a les descrites pels anteriors autors.

Diversos autors atribueixen l'elevadíssima difusió del ALV arreu on es cultiva carxofera al tipus de propagació (via agàmica) i a la transmissió per àfids, tals com: *Myzus persicae* (Sulz.), *Aphis fabae* (Scop.), *Branchycaudus cardui* (L.) i *Aulacorthum solani* (Kalt.) (Foddai et al., 1977, 1983; Rana et al., 1980; Migliori et al. 1984a).

Majorana i Rana (1970) localitzaren un virus, també latent, a les carxoferes italianes i que no era el ALV. Aquest nou virus, que es transmès per nematodes i no per àfids com el ALV, rebé el nom de AILV (Artichoke Italian Latent Virus). Les plantes que manifesten el AILV són també nanes, amb fulles molt petites i amb una baixa producció. Les plantes afectades pel AILV desenvolupen només un capítol de pèssima qualitat, amb unes bràctees obertes, dentades i amb escassa pigmentació (Welvaert i Zitouni, 1974).

Posteriorment Martelli et al. (1979) també trobaren el ALV a les carxoferes italianes. Aquest virus ha estat identificat per altres autors en tots els països de la conca mediterrània on es conreen carxofes (Migliori et al., 1984a; Peña-Iglesias i Ayuso, 1972, Romero et al. 1985).

Peña-Iglesias i Ayuso (1972; 1974) trobaren el ADV (Virus de la Degeneració de la Carxofa). Els esmentats autors senyalaren que gran part del material espanyol, estudiat per ells, de carxofera estava contaminat amb el ADV i suposaren que aquest virus era la causa de la degeneració de la carxofera observada a l'Estat espanyol i que s'ha descrit en l'apartat 2.2.2.

Altres virosis que s'han localitzat manifesten normalment una simptomatologia externa, i a més es produeix sempre un decrement del creixement de la planta i una disminució de la quantitat i qualitat dels capítols. Aquestes virosis són:

-el BBWV (Broadbean Wilt Virus) trobat per Migliori et al. (1984a,b) en el cultivar francès "Camus de Bretagne".

-el BBWV-FA (BBWV-French Artichoke) (Migliori et al., 1987). L'esmentat virus havia estat prèviament identificat per Migliori et al. (1984b) com el CV-17 i per Pécaut et al. (1985) que l'anomenaren Isolat A.

-el ACDV (Artichoke Curly Dwarf Virus) (Marton, 1961).

-el AMCV (Artichoke Mottled Crinkle Virus) (Martelli, 1964; Quaquarelli i Martelli, 1966).

-el CMV (Cucumber mosaic virus) (Migliori et al. 1984a).

Altres virus identificats en algunes zones i varietats de carxofera són el Tomato Blanck Ring Virus (TBRV) (Migliori et al., 1984b), el Tabac Rattle Virus (TRV) (Migliori i Marzin, 1985), el Artichoke Yellow Ringspot Virus (AYRV) (Rana et al., 1980), el Artichoke Vein Banding Virus (AVBV) (Gallitelli et al., 1978).

Diversos cultivars d'espècies, entre d'altres, com la dalia (Morel i Martin, 1952), la patatera (Morel i Muller, 1968; Westcott et al., 1977), la maduixera (Boxus, 1976), el clavell (Buys, 1968) i diversos fruiters (Boxus i Druart, 1986) han estat sanejats de virus mitjançant l'obtenció de noves plantes a partir de micropropagació d'àpexs meristemàtics, tot realitzant els controls de virus adients. Els primers investigadors que van obtenir plantes de carxofa lliure de virus per cultiu de meristems fou un equip espanyol (Peña-Iglesias i Ayuso, 1974). En aquest sentit Harbaoui et al. (1982) van iniciar un programa de cultiu *in vitro* per intentar sanejar els cultivars de carxofa de Tunísia.

Actualment diversos equips investigadors realitzen estudis per tal d'arribar a resoldre la problemàtica de la degeneració de la carxofera, ja que aquesta podria estar més lligada a factors genètics que a problemes de virosi (Pécaut, comunicació personal).

1.3. Micropropagació de *Cynara scolymus* L.

Les tècniques del cultiu *in vitro* en el sistema productiu de *Cynara scolymus*, L., i especialment la micropropagació, poden tenir un gran interès. En primer lloc podria ser una via de solució pel que fa a l'obtenció d'una descendència clonal en quantitat i homogènia, a partir de propagar plantes mares de gran interès productiu (Ancora et al., 1981 a,b). Segonament, i mitjançant la utilització de meristems o teixits meristemàtics (meristem + primordis foliars) com a explants inicials fóra possible aconseguir el sanajement del material, amb la qual cosa es disposaria de plantes lliures de virus i bacteris (De Leo i Greco, 1976). Les tècniques *in vitro* podrien també agilitzar i millorar els programes de selecció i millora vegetal que tal com s'ha comentat anteriorment són una temàtica d'elevat interès (Ancora et al. 1981 a,b).

Atenent a la temàtica d'aquesta tesi només es considerarà primera aplicació, ja que no s'abordarà cap assaig sobre el testatge de virus.

Els avantatges que suposa la implantació d'aquesta tècnica no es poden generalitzar, ja que poden variar molt en funció de la zona i del cultivar en qüestió (Pécaut et al., 1985). Les limitacions que es poden derivar de la utilització comercial d'aquesta tècnica en la reproducció de *Cynara scolymus*, L. són múltiples i poden estar lligades a diversos factors. Els més destacables són el cost de la planta micropropagada (Ancora et al., 1981a,b; Arce et al., 1988), la naturalesa dels virus recontaminants, les característiques genètiques de les noves plantacions, en existir una tendència a la mutació en condicions *in vitro* superior a la que es manifesta en camp, i la capacitat de mantenir les

característiques agronòmiques al llarg dels anys (Pécaut al., 1985).

1.3.1. Material vegetal propagat

Certes tècniques emprades en el cultiu *in vitro* permeten obtenir plantes de carxofera lliures de patògens a partir de material vegetal d'interès comercial però afectat per certs virus, bacteris i/o fongs.

El primer treball de micropropagació de carxofera fou realitzat per Toponi l'any 1960 (en Ancora, 1986), i no pas amb l'objectiu d'establir un mètode de propagació ràpid, sinó per estudiar l'efecte hormonal en la proliferació cel·lular i la formació de cal·lus quan el material vegetal de partida eren bràctees. Els primers que describiren el cultiu *in vitro* de *C. scolymus*, L. com un sistema de propagació ràpida foren De Leo i Greco (1976). El cultiu *in vitro* de meristem de carxofera ha servit per aconseguir material lliure de virosis (Peña-Iglesias i Ayuso, 1974; Ayuso i Peña-Iglesias, 1980; Harbaoui i Debergh, 1980; Harbaoui et al., 1982; Peña-Iglesias i Ayuso, 1983; Pécaut et al., 1985), o per micropropagar (Moncousin, 1980, 1981; Mocousin i Ducreux, 1984; Ancora et al., 1981a,b; Morone Fortunato et al., 1979).

Alguns autors han estudiat altres fonts de material vegetal, per tal d'establir pautes alternatives en la multiplicació *in vitro* de l'esmentada espècie, però fins a l'actualitat els més emprats han estat el meristem + pocs primordis foliars i les gemes (Taula 5). Amb la utilització d'altres teixits, generalment sols s'ha aconseguit la formació de cal·lus, exceptuant el cultiu d'explants de receptacle que poden arribar a neoformar brots (Devos et al., 1975;

Morone Fortunato *et al.*, 1979, Ancora *et al.*, 1981 a; Harbaoui *et al.*, 1982). L'elevat grau de contaminacions bacterianes i/o la toxicitat fenòlica, que es creen en el medi quan s'utilitzen capítols com a font d'explantació, no fa aconsellable aquest material per a la regeneració de brots (Harbaoui i Debergh, 1980). L'equip d'Ancora (1981a) pretenqué la regeneració de brots adventicis cultivant fragments de capítols amb un medi que contenia 2 mg l^{-1} d'àcid naftalen acètic (NAA) i 5 mg l^{-1} de bencilaminopurina (BAP); es produí, tanmateix, una important brotació, però els resultà impossible promoure el seu creixement. Harbaoui *et al.* (1982) observaren regeneració de brots, però tant sols en un 20/100 dels explants de capítol sembrats. Millors resultats de regeneració s'observaren amb explants de receptacle cultivats en un medi amb BAP (1 mg l^{-1}) i NAA (9.2 mg l^{-1}) (Morone Fortunato *et al.*, 1979). Després de diversos subcultius d'obtenció de cal·lus en un medi amb BAP (10^{-6} M) i 2,4-D (10^{-7} M) (2,4 ac. diclorfenoxiacètic) a partir d'explants de cotiledó i receptacle s'aconseguí una ràpida regeneració de brots (Devos *et al.*, 1975). Scaramella i Ricci l'any 1979 obtingueren formació d'embrioids a partir d'explants de tija floral, els quals manifestaren un creixement totalment nul (Ancora, 1986). Orisei *et al.* (1988) presuposen que els brots adventicis que obtingueren a partir de cal·lus eran d'origen embriogènic.

Els cultivars de carxofera micropropagats, segons la bibliografia existent, són escassos i d'acord amb el consum i producció de l'esmentada espècie, tots els equips de recerca en aquest tema treballen amb cultivars típicament mediterranis.

La majoria dels cultivars emprats a Itàlia i França són del tipus de fulla pinnatifida, mentre que pràcticament a Espanya la majoria són de fulla sencera.

Taula - 5 Própaguls de *Cynara scolymus* més emprats

Explant	Autors	Resposta in vitro
Bràctees	Toponi (1960)	Cal.lus
Capítols	Harbaoui i Debergh (1980)	Cal.lus
Arrels i Fulles	Harbaoui i Debergh (1982)	Cal.lus
Receptacles	Ancora et al. (1979) Moncousin (1979) Scaramella i Ricci (1979) Devos et al. (1975)	Cal.lus, des. floral
Receptacles	M. Fortunato et al. (1979) Onisei et al. (1988)	Cal.lus, brots adv. Cal.lus, brots adv.
Tija floral	Scaramella i Ricci (1979)	Cal.lus, embrioids
Rizoma	Scaramella i Ricci (1979)	Cal.lus, embrioids
Cotiledons	De Leo i Greco (1973)	Cal.lus, arrels i estructures globulars
Llavors	De Leo i Greco (1973) Bigot i Foury (1984)	Brots
Apexs caulinars	Peña-Iglesias i Ayuso (1974) Ayuso i Peña-Iglesias (1980) Harbaoui i Debergh (1980) Harbaoui et al. (1982) M. Fortunato et al. (1979) Moncousin (1980, 1981) Ancora et al. (1981 a,b) Pécaut et al. (1983, 1985) Arce et al. (1988)	Brots i plantetes

1.3.2. Cultiu de meristem i àpexs caulinars

Morel i Martin (1952) van ser els primers a demostrar que es podien obtenir plantes lliures de virus, a partir de material viròtic mitjançant el cultiu *in vitro*, al reproduir plantes de dàlia a partir de meristems.

Actualment es pot dir que el cultiu de meristem és una de les tècniques més fidedignes que podem emprar per tal d'aconseguir plantes lliures de virus i d'altres

patògens (Hansen i Green, 1983; Boxus, 1984; Boxus i Druart, 1986).

Per a la majoria d'espècies, la part de la planta mare que es posa en cultiu és el dom apical, i més freqüentment, el meristem apical juntament amb alguns primordis foliars (àpexs caulinars); conjuntament presenten una dimensió entre 0.25 i 1 mm, segons les espècies. En general es considera que els explants de meristem de dimensió superior a 1 mm no presenten cap garantia sanitària (Margara, 1982). Tanmateix quan s'empreen àpexs caulinars de grandàries inferiors per assegurar la seva garantia sanitària caldrà realitzar els corresponents tests de virosis. Existeix una regla general que diu: com major és la grandària de l'explant, més fàcil és el seu posterior desenvolupament a brot, però al mateix temps més difícil és que sigui sà. El nombre d'àpexs meristemàtics sans és inversament proporcional a la mida dels mateixos (Mori i Hosakawa, 1977), per tant cal cercar per a cada espècie o varietat el compromís entre grandària i capacitat de regeneració + sanitat. Un altre avantatge en la utilització de meristem és l'estabilitat genètica que generalment comporta, perquè el nou brot es pot desenvolupar sense que s'hagi de passar prèviament per la formació de cal.lus.

Per a la micropropagació de la carxofera i atesa la problemàtica fitosanitària d'aquest cultiu, comentada anteriorment, la major part dels autors utilitzen els teixits meristemàtics com a explants (Peña-Iglesias i Ayuso, 1974, 1983; Ayuso i Peña-Iglesias, 1980; Harbouï i Debergh, 1980; Harbauoi et al., 1982; M. Fortunato et al., 1979; Moncousin, 1980, 1981; Ancora et al., 1981 a,b; Pécaut et al., 1983, 1985; Arce et al., 1988; Suelzu et al. 1989). Quasi tots els autors estan d'acord a afirmar l'estabilitat genè-

tica de les carxoferes cultivades *in vitro* a partir d'àpexs meristemàtics o gemes en varietats de fulla retallada (Pécaut et al., 1983; Harbaoui et al., 1982; Saccardo i Ancora, 1984). No obstant, Pécaut (1986) ha observat que la descendència de material micropropagat del clon INRA VP45 del cultivar "Violet de Provence" (cultivar de fulla sencera) manifestava freqüentment un aspecte ben diferenciat del parental, ja que pràcticament tota la descendència mostrava característiques típiques de plantes degenerades, tot i que el rendiment i la qualitat del producte obtingut eran satisfactoris, però perdien precocitat entre 2 i 3 setmanes a la primavera i no s'adaptaven al cultiu de tardor. Plantes micropropagades l'any 1989 (dades no publicades) en el Laboratori de l'Escola Universitaria d'Enginyeria Tècnica Agrícola de Barcelona del cultivar "Blanca de Tudela" i transplantades en el camp, a finals d'estiu de l'any esmentat, a la zona del Delta del Ebre, tot i presentant fulles retallades, fructificaren a la tardor. Pécaut (comunicació personal, 1989) pensa que aquesta variació de la descendència respecte al material original podria estar relacionada amb la interacció d'algun factor genètic i el nombre de subcultius que el material hagués sofert en la fase de multiplicació *in vitro*. Ancora et al. (1981a,b) determinaren el nombre de cromosomes continguts en les plantes micropropagades que contenen $2n=34$ cromosomes.

Harbaoui et al. (1982) aconseguiren eliminar el virus ALV quan la grandària dels àpexs meristemàtics emprats per iniciar el cultiu oscil·lava als voltants dels 0.5-0.8 mm. Aquesta llargada d'àpex permetè una implantació dels explants força exitosa així com un desenvolupament més ràpid dels mateixos.

Obtinguda la regeneració d'un brot a partir de meristem, cal seguir el procés normal *in vitro* de multiplicació, arrelament i aclimatització del material micropropagat.

1.3.3. Fases de la micropropagació

1.3.3.1. Generalitats

Per a desenvolupar amb èxit la micropropagació són necessàries, segons els diferents autors que han treballat amb *C. scolymus* L., les següents fases de cultiu:

- Fase I - Establiment del cultiu asèptic i viable
(Fase d'iniciació)
- Fase II - Multiplicació dels brots
(Fase de multiplicació)
- Fase III - Preparació dels cultius per tolerar
les condicions de *in vivo*.
(Fase d'arrelament)
- Fase IV - Aclimatització
(Fase d'aclimatització)

Diversos autors i especialment els grups de recerca del professor Debergh de la Universitat de Gent i del professor Read de la Universitat de Minnesota han demostrat per un ampli espectre d'espècies i varietats altres que la carxofera, que molts dels problemes que s'observen en la fase d'iniciació del cultiu *in vitro* es poden aminorar i/o subsanar introduint una fase prèvia a la micropropagació que es realitza en condicions de *in vivo* i que es coneix com a Fase 0: Preparació de la planta mare (Debergh i Maene, 1981, 1985; Read et al., 1979). Aquesta fase té com a objectiu condicionar les plantes mares per poder arribar a aconseguir explants amb una millor i més homogènia resposta a la Fase I. L'estat fisiològic de la planta mare i, per tant, de l'explant dependrà del nivell nutricional, tractament lumínic, grau de desenvolupament, tractaments hormonals i d'altres tractaments rebuts, fotoperíode, poda, reg, època de l'any, etc. Tots aquests condicionants poden intentar

ser optimitzats per assegurar la viabilitat i el desenvolupament del explant *in vitro* (Read et al., 1979). Debergh i Maene (1981, 1985) postularen que les plantes mares abans de ser utilitzades com a font d'explants, s'haurien de mantenir durant un període més o menys llarg de temps en un hivernacle on caldria establir unes adequades condicions higièniques, reg per goteig sense mullar la planta, nutrició, irradiància i fotoperíode controlats.

Aquest aspecte no ha estat considerat pels diversos grups de treball que aborden la micropropagació de *Cynara scolymus*, L., possiblement per la dificultat que representa extraure del camp plantes selectes i col·locar-les en condicions de cultiu protegit i controlat, de forma que ambdues operacions resultin exitoses.

En aquesta tesi no s'aborda la temàtica de l'oportunitat d'establir una Fase 0 en el protocol de micropropagació de *C. scolymus*, L., si bé es considera un tema que podria tenir interès.

És imprescindible aconseguir per a cada una de les fases de cultiu un medi nutritiu satisfactori per a la espècie o varietat que es desitgi reproduir. El cultiu *in vitro* de *C. scolymus*, L. presenta a més una sèrie de problemes que, amb certa freqüència, no es comenten a la bibliografia. A la fase d'iniciació sorgeixen entrebancs en l'obtenció del material asèptic (segons la sanitat de la planta mare), i per la presència de substàncies fenòliques inhibidores del creixement (Ancora et al., 1981 a,b). A la fase de multiplicació, sovint s'evidencien fenòmens de vitrificació (Debergh et al., 1981) i de dominància apical (la brotació és molt heterogènia). A l'arrelament es presenten complicacions per la baixa aptitud rizogènica del material (Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984). L'aclimatit-

zació comporta també inconvenients molt notables. La micro-propagació de carxofera esdevé un tema d'elevat interès hortícola però amb un grau de dificultat considerable (Ancora et al., 1981a,b; Moncousin, 1980, 1981; Harbaoui i Debergh, 1980; Debergh et al., 1981; Harbaoui et al., 1982; Pécaut et al., 1983, 1984; Ancora, 1986; Arce et al., 1988; Suelzu et al., 1989).

1.3.3.2. Fase d'iniciació

A - Preparació i desinfecció del material vegetal

El material vegetal que es separa de la planta mare en el camp són els cardets vegetatius, és a dir, aquells que encara no han sofert el viratge floral, i que contenen per tant en el seu interior l'àpex caulinar vegetatiu. En el cultiu *in vitro* de carxofera, i tant si es vol iniciar el cultiu emprant teixits meristemàtics (meristem + 2 ó 3 primoridis foliars) com gemes, és desitjable desinfectar sempre el material per aconseguir una implantació dels explants més exitosa, ja que quan s'utilitzen cardets de carxofera per la pilositat de les fulles i tiges, i pel fet de ser molt curts els entrenusos i alhora la majoria de cardets han desenvolupat la seva part basal sota terra, presenten greus problemes en el moment de fer-hi una desinfecció eficaç. Amb les pautes proposades de desinfecció per diferents autors es pretén eliminar les possibles contaminacions exògenes (Moncousin, 1980; Harbaoui i Debergh, 1981; Ancora et al., 1981a; Pécaut et al., 1983).

Prèviament a la desinfecció, cal eliminar les fulles dels cardets a excepció de les 3 ó 4 últimes, que serviran per protegir l'explant de la matèria activa desinfectant. La realització d'una desinfecció enèrgica suposa un

gran dany per als teixits, és per això, que s'ha de deixar l'apex meristemàtic recobert per aquestes primeres fulles en el moment de la desinfecció (Moncousin, 1980; Harbaoui i Debergh, 1981; Ancora et al., 1981 a,b; Pécaut et al., 1983).

Moncousin (1980) aconsella la següent pauta de desinfecció (Pauta 1):

- . Rentat del material amb sabó.
- . Immersió ràpida en alcohol del 70% (30 s).
- . Bany de 30 min amb hipoclorit sòdic (4%).
- . 3 Rentats amb aigua destil.lada estèril de 10-15- 30 min respectivament.

Segons l'esmentat autor (Moncousin, 1981) l'èxit de la desinfecció del material vegetal està molt lligada a la grandària del explant (Taula 6). Emprant gemes de 5 mm obtingueren un 40% de propàguls sense contaminacions bacterianes aparents. Amb grandàries d'apex més petites a l'assenyalada aconseguiren un 60% de material no contaminat i un coeficient d'eficiència del 48% (considerant conjuntament el % de no contaminació i el % d'explants que es desenvoluparen en el medi d'iniciació), quan els àpexs procedien de plantes mares joves (6 mesos) el coeficient d'eficiència es situava entorn al 75%. Per a tots tipus de material utilitzat sempre notaren una infecció bacteriana més o menys freqüent, fos quina fos la tècnica de desinfecció utilitzada.

L'any 1980 Harbaoui i Debergh assajaren diferents agents desinfectants: etanol, hipoclorit de sodi, clorur de mercuri. Els millors resultats els obtingueren realitzant (Pauta 2):

- . Un rentat amb aigua corrent
- . Una immersió ràpida en etanol (96%) (2-3 s)

- . Un bany de 5 min en una solució de 5 gl^{-1} de clorur de mercuri.
- . Un bany de 25 min en una solució del 10% de lleixiu comercial.
- . Tres rentats de 10 min amb aigua destil·lada estèril,

i en tots els casos, i per tal d'evitar les possibles exudacions fenòliques, abans i després de la desinfecció del material vegetal, aquest es guardava en una solució que contenia 150 mgl^{-1} d'àcid cítric i 100 mgl^{-1} d'àcid ascòrbic.

La presència d'etanol a les pautes de desinfecció ha estat associada per Martínez i Cañameras (1988) en "Blanca de Tudela" i "Blanca d'Aranjuez" a problemes de necrosi dels explants.

Harbaoui et al. (1982) utilitzen una desinfecció força semblant a la ja descrita anteriorment (Harbaoui i Debergh, 1980), però sense realitzar el bany etílic (Pauta 3).

Ancora et al. (1981 a,b) proposen per a desinfectar (Pauta 4) una immersió de 5 s en alcohol (70%), seguida d'un bany de 20 min en hipoclorit sòdic al 1.5% de clor actiu i realitzar 3 rentats amb aigua destil·lada estèril, contenint 100 mgl^{-1} d'àcid ascòrbic. Segons els autors abans citats el material resultava regularment contaminat. També van aconseguir alguns cultius asèptics de meristems apicals sense haver realitzat cap tipus de desinfecció prèvia.

Un 90% d'explants sense contaminacions aparents fou aconseguit per Pécaut et al. (1983) (Pauta 5) immergint el material 5 min en etanol (70%), a continuació banyant-lo 5 min amb "Mercryl laurylé" i finalment realitzant un bany

de 10 min amb hipoclorit càlcic (5%).

Suelzu et al. (1989), per a desinfectar material del cultivar italià "Spinoso sardo", aconsellen una immersió de 2 minuts en alcohol etílic al 70%, seguit d'un bany de 20 minuts de hipoclorit sòdic al 1.4% de clor actiu i finalment rentar 3 vegades amb una solució acuosa estèril que contingui 100 mg l^{-1} d'àcid ascòrbic (Pauta 6).

Per a la desinfecció de llavors Moncousin i Ducreux (1984) aconsellen un bany de 20 min amb etanol (70%) seguit d'un altre bany també de 20 min amb hipoclorit sòdic (14.5%) i 3 rentats amb aigua estèril (Pauta 7), mentre que Bigot i Foury (1984) proposen una imbibició en aigua estèril durant 24 h, seguit d'un immersió de 30 min en alcohol (70%) i d'un bany de 10 min amb hipoclorit càlcic (100 gl^{-1}) i també 3 rentats amb aigua estèril (Pauta 8).

B - Medis de cultiu

Els teixits meristemàtics solen presentar requeriments molt específics en relació a la composició del medi nutritiu i de les condicions ambientals d'incubació. La concentració i el equilibri mineral i hormonal poden ser factors decisius de l'èxit. Les hormones sintètiques citoquiniques i auxíniques més emprades en la micropropagació són la bencilaminopurina (BAP) i els àcids naftalenacètic (NAA) i el indolacètic (IAA). Tanmateix la citoquinina més utilitzada en la formulació de medis d'iniciació i de multiplicació de *C. scolyum* L. és la 2 isopenteniladenina (2ip). Les gibberelines (GA_3) són emprades amb menys freqüència, tant en la micropropagació en general com en la de *C. scolyum*, L.

La majoria d'autors utilitzen en la composició dels medis d'iniciació les solucions macrominerals formulades per Murashige i Skoog (1962), excepció feta de Pécaut et al. (1983) que fan servir la solució de Tendille i Lecerf (1974) i Moncousin i Ducreux (1984) que empren la de Linsmaier i Skoog (1965).

Les solucions microminerals varien molt segons els equips investigadors; pràcticament es pot associar cada equip amb un tipus de formulació (Taula 6). La resta de components del medi també és força variable, a excepció del contingut en hidrats de carboni que oscil·la entre 20 i 30 g de sacarosa l^{-1} normalment.

Tots els autors que han iniciat el cultiu amb àpexs caulinars o gemes incorporen baixes dosis hormonals en el medi de sembra, per afavorir un desenvolupament normal de l'àpex i un baix risc de producció de cal·lus. Tal com ja hem citat anteriorment la citoquinina més emprada és la 2ip, a una concentració de 1 mg l^{-1} , a excepció del medi proposat per Moncousin (1981) on aquesta concentració s'eleva a 5 mg l^{-1} . Dos equips creuen adient iniciar els seus cultius amb presència de KIN, tanmateix les quantitats emprades són força diferents: 0.1 mg l^{-1} (Pécaut et al., 1983) i entre 5 - 10 mg l^{-1} és la dosi recomenada per l'equip d'Ancora (1981 a,b). Aquesta diferència seria atribuïble possiblement als diferents materials d'explantació. Tan sols l'equip format per Peña i Ayuso (1974) consideren adequat incorporar en els seus medis BAP (0.1 mg l^{-1}).

Tots els medis d'iniciació que esmenta la bibliografia contenen sempre algun tipus d'auxina, essent l'IAA la més emprada, normalment a una dosi de 1 mg l^{-1} . Tanmateix Peña i Ayuso (1974) incorporaren al seu medi NAA (0.1 mg l^{-1}) i el primer treball publicat sobre el tema per Mon-

cousin (1980) considerava oportú l'adició d'IBA (1 mg l^{-1}) en el medi.

La incorporació de GA_3 ha estat molt més discutida, tot i que la majoria d'autors la creuen indispensable, quan s'utilitzen com a explants teixits meristemàtics. L'equip de Debergh (Harbaoui i Debergh, 1980; Debergh et al., 1981; Harbaoui et al., 1982) consideraren que l'adició de GA_3 és apte per estimular l'arrencada vegetativa dels àpexs, però que una vegada aconseguida, és convenient la ubicació del explant en un medi que no contingui l'esmentada hormona, per tal d'aconseguir més satisfactoriament un adequat desenvolupament del propàgul; és per això que l'esmentat equip presenta dos medis consecutius d'iniciació. Moncousin (1981) creu que la presència i la quantitat de GA_3 en el medi cal que variï amb la data d'entrada del material a incubació (necessitats màximes d'hormona durant l'hivern, intermitges a la tardor i pràcticament nul·les a la primavera).

Els aditius orgànics dels medis d'iniciació són força variables i alhora poc discutits a la bibliografia en aquesta fase. Cal destacar la incorporació d'àcid cítric (150 mg l^{-1}) citada per Peña i Ayuso (1983) per a disminuir la proliferació de fenols, que altres autors controlen afegint àcid ascòrbic a les aigües de rentat de la desinfecció.

El contingut d'agar oscil·la entre 6 i 8 g l^{-1} , a excepció del grup de Debergh (Debergh et al., 1981; Harbaoui et al., 1982) que posteriorment a haver realitzat un estudi força detallat sobre la vitrificació (apartat 1.3.4.1) creu que la millor concentració d'agar és la de 11 g l^{-1} .

El pH és bastant comú per a tots els medis i varia entre 5.5 i 5.8.

Tots els autors consideren indispensable la sembra del explant en medis d'iniciació, a excepció de Ancora (1981 a,b) i Suelzu et al. (1989) que inicien els seus cultius en medis de multiplicació. Moncousin (1981) i Harbaoui et al. (1982) senyalen que la durada de la fase d'iniciació variarà segons el grau de desenvolupament de l'explant, i creuen aconsellable el manteniment d'aquesta fase fins que el propàgul no hagi aconseguit desenvolupar 4 ó 5 fulles, per tal de poder passar posteriorment a la fase de proliferació brots d'una grandària tal, capaços de produir brotació i obtenir per tant una bona taxa de multiplicació.

Segons Moncousin (1981), l'èxit en l'establiment del cultiu és variable atenent principalment a la interacció entre el percentatge d'explants desinfectats satisfactoriament, que com ja hem assenyalat anteriorment està intrínsecament relacionat amb la grandària del mateix, i el percentatge de propàguls que arriben a sobreviure en el medi, que també està lligat amb la grandària dels mateixos; com més petita és la mida de l'explant més baix és el percentatge de supervivència.

Les condicions ambientals de cultiu establertes per aquesta fase oscil.laren segons autors, però les més estandaritzades són:

temperatura 21-25°C

fotoperíode 16h - 24h

intensitat de llum 20 - 100 $\mu\text{EPARm}^{-2}\text{s}^{-1}$

Ancora et al. (1981 a,b) obtingueren un gran nombre de brots a les quatre setmanes d'iniciació del cultiu quan el material sembrat eren gemes de 0.5 a 2 cm de grandària, (material no sanejat).

El medi d'iniciació proposat per Moncousin i Ducreux (1984) per al desenvolupament de llavors, tan sols contenia la solució mineral Linsmaier i Skoog (1965), sacarosa (2%) i agar (0.6%); la germinació es realitzà a les fosques i a una temperatura de 18°C, en el moment que s'obrien els cotiledons el material era sotmès a una irradiància de $100 \mu\text{EPARM}^{-2} \text{s}^{-1}$ durant un fotoperíode de 16 h i a una temperatura de 20-25°C.

Bigot i Foury (1984) aconseguiren el desenvolupament d'embrions, procedents de llavors, utilitzant les sals de Murashige i Skoog (1962) i 30 gl^{-1} de sacarosa.

Taula - 6 Principals medis d'iniciació emprats en la micropropagació de *Cynara scolymus*

Autor	Tipus explant	Desinf.	Macro	Micro	IBA	IAA	NAA	KIN	2ip	BAP	GA ₃	Sacr. -1	Agar	Altres	pH	Super. (%)
						mg/l						gl				
Moncousin (1980)	Gemes	1	MS	G	G	1	-	-	1	-	-	20	8			5.6 irreg.
Moncousin (1981)	Ap. mer Gemes Llavors	1	MS	G	G	-	0.1	-	5	-	0.1	20	8			48 39 75
Ancora (1981a)	Gemes	4	MS	MS	(2)	-	0.5	5/10	-	-	-	40	7	(2)		5.5 baix
Harbaoui i Debergh (1980)	Ap. mer.	2	MS	NN	(3)	-	1	-	1	-	0.025	20	6			5.8 35
Debergh et al. (1981)	Ap. mer.	3	MS	NN	(3)	-	1	-	1	-	0.025	20	11			5.8
Harbaoui et al. (1982)	Ap. mer.	3	MS	NN	(3)	-	1	-	1	-	-	20	11			5.8
Peña i Ayuso (1983)	Apexs mer.	5	MS	MS	MS	-	0.1	-	0.1	1	30	8	8	(3)		5.7
Pécaut (1983)	Ap. mer	5	T	T	T	-	-	0.1	-	-	0.1	30	8			5.8 90
Moncousin i Ducreux (1984)	Ap. mer llavors	1 7	LS	LS	-	-	-	-	-	-	-	28	6			5.6
Bigot i Foury (1984)	Embrions	8	MS	MS	-	-	-	-	-	-	-	30				5.8
Suelzu et al. (1989)	Ap. mer Gemes	6	MS	MS	(4)	-	0.5	-	1	-	-	30				

- (1) NaH₂PO₄ 50 mg/l + tirosina 100 mg/l + adenina 40 mg/l
 (2) Tiamina 0.4 mg/l + mioinositol 100 mg/l
 (3) Acid cítric 150 mg/l
 (4) Tirosina 100 mg/l + Adenina 40 mg/l

- MS: Murashige i Skoog (1962)
 G: Gamborg i Eveleigh (1969)
 NN: Nitsch i Nitsch (1962)
 T: Tendeille i Leclerc (1974)

1.3.3.3. Fase de multiplicació

Les solucions macrominerals utilitzades per quasi bé tots els equips que han treballat amb *C. scolymsus*, L. són les formulades per Murashige i Skoog (1962). En la fase de multiplicació sembla que hi ha més concordància entre els investigadors respecte les solucions microminerals emprades, que en la fase d'iniciació abans comentada. En els medis de proliferació les més utilitzades són també les formulades per Murashige i Skoog (1962), a excepció del equip de Debergh que segueix afegint al medi les de Nitsch i Nitsch (1969) (Taula 7).

Els estudis de Moncousin (1980) no mostraren diferències significatives entre la utilització de medis amb els microelements de Gamborg i Eveleigh (1968) o els de Murashige i Skoog (1962).

Tots els autors consideren oportú incorporar als medis de proliferació les mateixes quantitats de sacarosa emprades en la fase d'iniciació, així com mantenir el mateix pH.

Les diferències més notables entre els medis proposats a la bibliografia radiquen en les concentracions, tipus i relacions hormonals i en els aditius orgànics (Taula 7). Les citoquinines i les auxines més emprades són la 2ip i la KIN i el IAA i el NAA, respectivament. Quan un medi sols conté 2ip com a font de citoquinines, les dosis utilitzades per a multiplicar material procedent d'explantacions d'àpexs caulinars o gemes, varia segons autors entre 5 i 20 mg l⁻¹. Harbaoui i Debergh (1980) creuen adient incorporar 20 mg l⁻¹ de 2ip o bé de 2 a 5 mg l⁻¹ de KIN. Pocs autors utilitzen per multiplicar baixes dosis de citoquinines a excepció de Pécaut et al. (1983). Alguns au-

tors combinen Zip i KIN (Debergh et al., 1981; Pécaut et al., 1984).

Harbaoui i Debergh (1980) observaren que rebaixant la dosi de citoquinines s'alentia el creixement i la taxa de multiplicació de les tofes, però que repercutia positivament sobre el control de la vitrificació.

La BAP és una citoquinina poc recomenada, tant sols es considerada per Peña i Ayuso (1983) i M. Fortunato (1979). Els assajos realitzats per Harbauoui i Debergh (1980) concloeren que la utilització de la BAP manifesta a dosi de 5 mg l^{-1} una vitrificació del 100% de les tofes. A més aquesta hormona els comportà aconseguir un material de pèsima qualitat, brots i limbs molt més estrets i altres tipus de malformacions.

La incorporació de GA_3 en aquesta fase és poc freqüent. Segons Harbaoui i Debergh (1980) i Moncousin (1980) estimula el desenvolupament de les gemes axilars. L'adició en el medi de dosis superiors a 0.01 mg l^{-1} pot repercutir en un etiolament de les tofes (Harbaoui i Debergh, 1980). Segons Ancora et al. (1981b) amb el seu medi de multiplicació el desenvolupament i la proliferació de brots es "mantingué normal i estable" al llarg de successius subcultius, i per això no consideraren la incorporació de GA_3 . Tanmateix Moncousin (1980) posa en evidència la problemàtica de poder obtenir de forma repetitiva el fenomen d'una proliferació homogènia al llarg de varis subcultius i per això incorporava als seus medis 0.5 mg l^{-1} de GA_3 ; quan emprava concentracions superiors (5 mg l^{-1}) obtenia perturbacions morfològiques i fisiològiques a nivell foliar, i a concentracions inferiors a 0.5 mg l^{-1} no observava cap resposta.

La resta de components orgànics del medi, com ja hem senyalat abans, és força variable. Mentre que uns autors formulen uns medis "poc" enriquits en aditius orgànics, sols amb presència d'una o dues vitamines i d'inositol (Harbaoui i Debergh, 1980; Debergh et al., 1981; Peña-Iglesias i Ayuso, 1983; Debergh et al., 1981; Cervera, 1989), d'altres empren unes formulacions força enriquides en vitamines i en aminoàcids (Ancora et al., 1981a,b; Moncousin, 1980, 1981; M. Fortunato, 1979 Moncousin i Ducreux, 1984; Pécaut et al. 1983).

Moncousin (1981) assajà la incorporació en el medi de proliferació de certes substàncies estimuladores del creixement, com certs aminoàcids (fenilalanina, tirosina), que podien o bé bloquejar la via de la síntesi de triptofan i conseqüentment la del IAA o bé perquè es podien manifestar com precursors en la biosíntesi dels flavonoids. El mateix autor estudià el comportament de les tofes quan en el medi s'incorporava àcid clorogènic o bé àcid triiodobenzoic. Les millors taxes de multiplicació (taxa total = 10) i qualitat de les tofes les aconseguí amb la incorporació de tirosina (50 mg l^{-1}). El fet d'incorporar tirosina al medi i d'incrementar la dosi de 2ip a 10 mg l^{-1} li comportà el poder suprimir la incorporació de GA_3 en el medi de multiplicació. Cal destacar també la incorporació de sulfat d'adenina i del fosfat monosòdic com a estimuladors en els medis proposats per Peña i Ayuso (1983), Moncousin (1980), Ancora et al. (1981 a,b), Pécaut et al. (1983, 1984) i Bigot i Foury (1984).

La incorporació de carbó actiu en el medi de multiplicació és ineficaç per incrementar la taxa de proliferació (Ancora et al. 1981a,b).

Les concentracions d'agar són molt variables, oscil·lant entre 6 i 11 gl^{-1} . Com es comentarà posteriorment (apartat 1.3.4.1.) la concentració d'agar afecte molt sensiblement el fenomen de la vitrificació.

Cal remarcar que els treballs publicats sobre la fase de multiplicació de *Cynara scolymus*, L. no especifiquen clarament la taxa viable de proliferació realment aconseguida, és a dir, no fan esment del percentatge de brots i tipus no viables obtinguts.

Els primers medis de proliferació formulats per Harbaoui i Debergh (1980) eren líquids amb suport de cotó. Amb ells obtingueren taxes de multiplicació de 3 a 4, subcultivant cada 4-5 setmanes. Aquests medis líquids els comportaren òbviament grans problemes de vitrificació i per això en posteriors treballs contemplaren l'estudi de l'esmentat fenomen. L'any 1981 l'equip de Debergh presentà el seu treball sobre la composició del medi més adequat per a multiplicar el cultivar "Violet d'Hyères", amb una determinada concentració de tipus hormonal i d'agar (de 2 a 7 mg l^{-1} de 2 ip i 2.5 mg l^{-1} de KIN, i 11 g.l^{-1} d'agar). Amb l'esmentat medi les taxes no resultaren molt elevades (2.5 a 2.8), però les tofes presentaren brots homogenis (apartat 1.3.4.1).

Moncousin (1980) tan sols aconsegueix que li multipliquin un 50% dels explants entrats a iniciació, amb una taxa total de 4.5. Segons el mateix autor (Moncousin, 1981; Moncousin i Ducreux, 1984) incrementant la quantitat de 2ip i incorporant al medi tirosina, la taxa total s'eleva a 8.

Ancora et al. (1981b) obtingueren també bones taxes de multiplicació (4.5) amb el cultiu de tofes provinents d'explantació de gemes.

Estudis iniciats al Laboratori de *in vitro* de l'Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Agrícola de Barcelona senyalen que les taxes de multiplicació en els primers subcultius són baixes i que posteriorment augmenten (3-4) i es mantenen certs mesos per a tornar a disminuir quan porta un any o més en cultiu (Martinez i Cañameras, 1988). D'acord amb els resultats obtinguts per l'equip de Debergh (Debergh et al., 1981) sobre les interaccions Zip--KIN en els medis de multiplicació de *Cynara scolymus* L., s'inicià a l'E.U.E.T.A.B. un treball fi de carrera (Cervera, 1989) dirigit per N. Cañameras i X. Martinez per tal d'estudiar l'efecte de les esmentades citoquinines en el cultivar "Blanca de Tudela". El medi base emprat fou el formulat per Harbaoui i Debergh (1980). Les dosis de KIN emprades foren: 1-2.5-5 mg l^{-1} i les de Zip: 10-20-25-30 mg l^{-1} . En l'esmentat estudi s'avaluaren una sèrie de paràmetres durant 3 subcultius successius, també es caracteritzaren diferències entre el cultiu en tub i el cultiu en bocal. Es comprovà que l'efecte subcultiu presenta una indicència important en la resposta als diferents tractaments hormonal, que és necessària una concentració de 10 mg l^{-1} de Zip per a mantenir o augmentar la taxa viable de multiplicació al llarg dels subcultius, que les taxes viables més elevades es donaren sempre amb combinacions Zip+KIN, que la KIN també mostrava per aquesta varietat un efecte aparent sobre la vitrificació inferior al mostrat per la Zip, que les tofes obtingudes amb medis sols amb Zip presentaven fulles més estretes i una brotació més cloròtica, 2.5 i 5 mg l^{-1} de KIN inhibeixen el creixement dels brots, que la brotació obtinguda en cultiu en bocal fou superior a la aconseguida en tub, tanmateix la taxa viable no presentà diferències, degut a què en bocal es formava un elevat percentatge de brots molt petits.

El fotoperíode donat en aquest fase per a tots els autors es de 16 h a 24 h de llum, a excepció de Benoît i Ducreux (1981) que l'establiren de 12 h. Aquests darrers autors també feren proliferar el material vegetal a temperatures més aviat baixes (20°C) (Taula 8).

Quan es multipliquen brots procedents d'embrions, Bigot i Foury (1981) aconsellen utilitzar un medi Murashige i Skoog (1962) enriquit amb fosfat monosòdic (50 mg l^{-1}), sulfat d'adenina (40 mg l^{-1}), KIN (1 mg l^{-1}), NAA (0.1 mg l^{-1}), sacarosa (3 %), agar (0.7 %) i pH 5.5, i subcultivar els brots desenvolupats quan tinguin 4 fulles. La taxa de multiplicació obtinguda oscil·là força segons el clon i el nombre de subcultiu. Amb el millor clon aconseguiren una taxa mitjana de 2.5.

Taula - 7 Medis de multiplicació més emprats en la micropropagació de *Cynara scolymus*

Autor	Tipus explant	Macro	Micro	Ad.org.	IBA	IAA	NAA	KIN -1	Zip	BAP	GA ₃	Sacr. -1 gl	Agar -1 gl	Altres	pH	Taxa
Moncousin (1980)	Gemes	MS	G	G	-	0.1	-	-	5	-	0.5	20	8	(2)	5.6	4.5
Moncousin (1981)	Ap.mer Gemes Llavors	MS	MS	MS	-	0.1	-	-	10	-	-	20	8	(3)	5.5	10.2
Ancora (1981a,b)	Gemes	MS	MS	(4)	-	0.5	-	5o10	-	-	-	40	7	(4)	5.5	4.5
Harbaoui i Debergh (1980)	Ap.mer.	MS	NN	(5)	-	1	-	2a5 ó 20	-	-	(0.01)	20	0		5.8	3.5
Debergh et al. (1981)	Ap.mer.	MS	NN	(5)	-	1	-	2.5 2a10	-	-	opc.	20	11		5.8	2.6
Harboui et al. (1982)	Ap.mer.	MS	NN	(5)	-	1	-	2.5	-	-	-	20	11		5.8	
Peña i Ayuso (1983)	Apexs mer.	MS	MS	(1)	-	-	0.1	-	2	-	-	30	8	(1)	5.7	
Pécaut et al. (1983)	Ap.mer.	MS	MS	MS	-	-	0.1	-	1	-	-	30	8	(6)	5.8	4.5
Pécaut et al. (1984)	Ap.mer.	MS	MS	MS	-	-	0.1	0.5	0.5	-	-	30	8	(6)	5.8	4.5
Moncousin i Ducreux (1984)	Ap.mer Llavors	LS	LS	LS	1	-	-	-	10	-	-	20	6	(7)	5.8	>8
Bigot i Foury (1984)	Embrions	MS	MS	MS	-	-	0.1	40	-	-	-	30	7	(8)	5.8	2.5
Suelzu et al. (1989)	Ap.mer Gemes	MS	MS	(4)	-	0.5	-	1	-	-	-	30	7	(4)	5.5	2.7

(1) NaH₂PO₄ 85 mg/l + tiamina 5 mg/l + piridoxina 5 mg/l + inositol 500 mg/l MS: Murashige i Skoog (1962)
 (2) Sulfat d'adenina 100 mg/l G: Gamborg i Eveleig (1968)
 (3) Tirosina 50 mg/l NN: Mitsch i Nitsch (1969)
 (4) NaH₂PO₄ 50 mg/l + tirosina 100 mg/l + adenina 40 mg/l T: Tendeille i Leclerc (1974)
 (5) Tiamina 0.4 mg/l + mioinositol 100 mg/l
 (6) NaH₂PO₄ 85 mg/l + sulfat d'adenina 40 mg/l
 (7) Tirosina 60 mg/l
 (8) NaH₂PO₄ 50 mg/l + sulfat d'adenina 40 mg/l

Taula - 8 Condicions ambientals de les fases d'iniciació i de multiplicació de *Cynara scolymus*

Autor	Iniciació			Multiplicació		
	Irradiància -2 ^{-1} ($\mu\text{Em s}^{-1}$)	Fotoperíode (h llum)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Irradiància -2 ^{-1} ($\mu\text{Em s}^{-1}$)	Fotoperíode (h llum)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Moncousin (1980,1981)	180	16	22-25	36	12	22-25
Ancora et al. (1981a,b)	18-54	16	25	52	16	25
Harbaoui i Debergh (1980)	21-27	24	24	21-27	24	24
Debergh et al. (1981)	31.4	24	21-25	31.4	24	21-25
Harboui et al. (1982)	21	24	21-25	21	24	21-25
Peña i Ayuso (1983)	20	16	27	20	16	27
Pécaut et al. (1983,1984)		12	25		12	25
Moncousin i Ducreux (1984)	100	20-25	16	100	16	20-25
Bigot i Foury (1984)	72	16	22-25	72	16	22-25
Suelzu et al. (1989)	40	24	25	40	24	25

1.3.3.4. Fase d'arrelament

Aquesta fase implica l'arrelament *in vitro* dels microbrots provinents de la fase de multiplicació, i l'enduriment d'aquestes plantetes per tal que siguin capaces de resistir les condicions de *in vivo*, i puguin manifestar la seva capacitat fotosintètica (Druart et al., 1982). Actualment, l'arrelament *in vitro* només es realitza per a aquelles espècies que tenen dificultats d'arrelar directament *in vivo*.

La bibliografia existent sobre la micropropagació de carxofera coincideix plenament en afirmar que la fase d'arrelament *in vivo* és pràcticament impossible i que *in vitro* és força problemàtica. Actualment l'arrelament dels microbrots de carxofera encara és un dels principals problemes a superar en la metodologia de micropropagació de l'esmentada espècie (De Leo i Greco, 1973; Peña-Iglesias i Ayuso, 1983; Benoît, 1975; Morone Fortunato et al., 1979; Moncousin, 1979; Moncousin, 1980; ; Harbaoui i Debergh, 1980; Moncousin, 1981; Ancora et al., 1981 a,b; Harbaoui et al., 1982; Pécaut et al., 1983; Ancora, 1986; Martínez i Cañameras, 1988). Possiblement aquesta dificultat podria estar lligada a un gran nombre de factors, d'entre els que caldria destacar: la formulació mineral i/o la presència de substàncies estimuladores del creixement, la interferència de compostos fenòlics, l'estat de desenvolupament del material vegetal (dels microbrots), les condicions ambientals (temperatura, intensitat de llum, fotoperíode, humitat, etc.), i l'activitat enzimàtica (Gaspar et al., 1979; Harbaoui et al., 1980; Moncousin, 1981; Moncousin i Ducreux, 1984).

A - Medis de cultiu

L'equip de Debergh (Maene i Debergh, 1985, 1987) atenent l'èxit obtingut en diverses espècies i varietats, altres que la carxofera, assajaren l'interès d'eliminar la fase d'arrelament *in vitro* i substituir-la per una fase d'allargament amb l'objectiu de conseguir una elongació uniforme de les gemes o dels brots desenvolupats en la fase de multiplicació, que permetés una millor inducció rizogènica posterior amb tractament auxínic sintètic dels microesqueixos allargats i un transplantament d'aquests microesqueixos induïts, en condicions de *in vivo*, en hivernacle d'aclimatització.

Per allargar els microbrots Harbaoui et al., (1982) cultivaren material de *Cynara scolymus*, L. obtingut en la fase de multiplicació, en un medi gelificat en absència de 2ip, i on la solució de Murashige i Skoog (1962) era substituïda per la de Knop a meitat de concentració per afavorir l'allargament dels brots. Posteriorment es cultivaren durant un mes en un medi líquid, amb suport de cotó, que contenia tiamina-HCl (10 mg l^{-1}), sacarosa (20 g l^{-1}), carbó actiu (0.3 g l^{-1}), rebent una exposició progressiva i continua de llum ($84 \mu\text{EPARm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Per iniciar la fase d'arrelament els microbrots allargats foren immersos per un període de tres o quatre dies en una solució acuosa que contenia 2 mg l^{-1} d'IBA i sota la intensitat lumínica abans esmentada. El sistema radicular es desenvolupà a les 5 - 6 setmanes que seguiren a la finalització del tractament auxínic. La temperatura d'arrelament oscil·là entre els 17-24°C i la humitat relativa fou pràcticament del 100%. Aquestes experiències realitzades per l'esmentat equip (Harbaoui i Debergh, 1980, Harbaoui et al., 1982) per intentar desenvolupar una metodologia per aconseguir la rizogènesi *in vivo* de *Cynara scolymus* L. no foren del tot exitoses.

Investigacions més recents realitzades per Ancora (1986) mostren com l'equip de Harbaoui (Harbaoui i Debergh, 1980, Harbaoui et al. 1982), que és aconsellable abans d'iniciar la fase d'arrelament cultivar prèviament els microbrots en un medi que no contingui citoquinines amb la finalitat d'aconseguir uns brots més aptes per a ser arrelats.

Els trets més característics de la majoria dels medis rizogènics per a carxofera són la utilització de les solucions macrominerals de Murashige i Skoog (1962) diluïdes a la meitat, l'adició de NAA com a hormona d'arrelament, i una concentració d'agar entre 0.7% i 0.8%. Com a font de microelements incorporen les solucions de Murashige i Skoog (1962), algunes vegades també diluïdes a la meitat. L'adició d'hidrats de carboni és variable segons autors i oscil·la entre 15 i 30 g.l⁻¹. El pH és constant 5.5 - 5.6 (Taula 9).

Les dosis més emprades de NAA oscil·len majoritàriament entre 1 i 2 mg.l⁻¹ (Moncousin, 1981; Ancora et al., 1981 a,b; Peña i Ayuso, 1983; Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984; Arce et al., 1988). Tanmateix Pécaut et al. (1983) i Bigot i Foury (1984) empen concentracions molt més baixes (0.5 i 0.1 mg.l⁻¹ respectivament). Cal recordar que els microbrots posats en arrelament i obtinguts pels darrers autors provenen de material procedent de llavors. L'únic medi d'arrelament que proposa l'adició d'una citoquinina és el proposat també per Pécaut et al. (1983). Pràcticament cap autor utilitza el IBA com auxina estimuladora de la rizogènesi, a excepció de Moncousin en el medi formulat l'any 1980. L'IAA tan sols és emprada per M. Fortunato et al. (1979) i a altes dosis (20 mg.l⁻¹).

Ancora et al. (1981b) assajaren també concentracions superiors de NAA, així com l'efecte d'altres auxines (IAA i IBA), però en cap cas aconseguiren una rizogènesi superior a l'aconseguida amb 2 mg l^{-1} de NAA (50%). Els medis que contenien IBA manifestaren una inducció radicular menys exitosa que la resta.

El segon medi d'arrelament descrit per Moncousin (1981) contenia bor (100 mg l^{-1} de tetraborat sòdic). Tanmateix els seus treballs posteriors (Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984) no contemplen l'esmentada addició i per tant és lògic considerar que probablement la incorporació de bor en els medis d'arrelament de carxofera no és indispensable per incrementar significativament el percentatge d'arrelament. El bor estimula la producció d'arrels en la majoria d'espècies en condicions rizogèniques *in vivo*. El mecanisme d'actuació del bor com a estimulador de la rizogènesi no és exactament conegut, però ja Weiser i Blaney (1967) relacionaren el bor amb processos d'oxidació, possiblement al incrementar-se la mobilització dels àcids cítrics en els teixits radiculars.

Peña i Ayuso (1983) creieren oportú incrementar la intensitat de llum a 10.000 lux en el moment que es divisava el sistema radicular. Altres autors consideren més adient realitzar tota la fase rizogènica a les fosques (Pécaut et al., 1983; Ancora et al., 1981 a,b), o bé iniciar l'arrelament amb un període de foscor de 24 hores durant una setmana (Arce et al., 1988), i d'altres han comprovat que no existeixen diferències significatives entre l'arrelament amb un fotoperíode determinat (16 o 24 h de llum) o a les fosques (Moncousin i Gaspar, 1983).

Els primers assajos d'arrelament realitzats per Moncousin (1980, 1981) evidenciaren la bona resposta dels microbrots a la rizogènesi, en el cultivar "Vert de Laon", quan el medi era enriquit amb vitamina D₂ (10 m.l⁻¹). Moncousin i Gaspar (1983), en estudiar l'activitat peroxidàsica dels seus medis d'arrelament, establiren dues fases rizogèniques consecutives, però de durada desigual. La primera (fase d'inducció rizogènica) que comprenia 6 dies, d'acord amb el comportament de l'activitat peroxidàsica, implicava el manteniment dels microbrots en el medi d'arrelament pròpiament dit. La segona fase (fase d'iniciació) comportava el transferiment dels brots a un nou medi que no contenia cap tipus auxínic o bé contenia rutina (610 mg l⁻¹). Els esmentats autors obtingueren resultats similars considerant tan sols una única fase rizogènica, és a dir, mantenint els microbrots en el mateix medi d'arrelament durant tota la fase, tanmateix es formava cal.lus en la base d'aquests microesqueixos, mentre que aquest fenomen no s'apreciava en els que havien estat transferits al medi pròpiament dit d'iniciació. Als 10 dies d'iniciar-se l'assaig, el percentatge d'arrelament dels brots no transferits al medi d'iniciació, era del 42% amb un nombre d'arrels de 0.46 i als 20 dies del 76% i amb 2.38 arrels. En el cas dels brots transferits a medis d'iniciació, el percentatge als 10 dies fou del 78% i als 20 dies es mantingué el percentatge en el medi que no contenia reguladors i fou del 84% en el medi que contenia rutina, el nombre d'arrels mig fou de 2.3 a 2.4.

Basant-se en el treball anterior del primer autor, Moncousin i Ducreux (1984), assajaren els efectes sobre la rizogènesi: altres combinacions hormonals, procedència del material vegetal (brots micropropagats procedents de llavor o bé d'àpexs caulinars) i el nombre de subcultius (2-4-6-8-12-15) successius en medi de multiplicació. Previ a la iniciació de la fase d'arrelament i amb l'objectiu de homoge-

nitzar el material el cultivaren tot en un medi amb la meitat de les sals de Linsmaier i Skoog (1965), sacarosa (1.8%) i agar (0.6%). Els medis d'arrelament formulats a partir del mateix medi base citat contenien diferents dosis de NAA (0-1-2-5 mg l^{-1}) i un medi contenia 1 mg l^{-1} de NAA + 10 mg l^{-1} de vitamina D₂. Els millors percentatges d'arrelament s'aconseguien en els brots procedents de llavor (68%) i en els de major nombre de subcultius (54-64%) en el medi que contenia NAA + Vitamina D₂. Altres autors han trobat altres espècies tals com *Camellia japonica* que a mesura que incrementava el nombre de subcultius devallava el percentatge d'arrelament, encara que no de forma estadísticament significativa (Sanmartin et al., 1986). En el treball de Moncousin i Ducreux abans esmentat el nombre d'arrels formades més gran es donà en el material procedent de llavor. El percentatge de brots amb formació de cal.lus estava relacionat també amb el nombre de repicats i amb l'origen. Els brots amb més formació de cal.lus foren els procedents de llavor i els que havien sofert més repicats. La formació d'aquest teixit fou més important quan més incrementava la concentració auxínica del medi. Els medis que originaren menys formació de cal.lus foren el que no contenia auxina i aquell que contenia NAA + vitamina D₂.

El medi d'arrelament, de brots procedents d'una explantació d'embrions, formulat per Benoît i Foury (1984) contenia les sals de Murashige i Skoog (1962) on els macroelements eren reduïts a la meitat, carbó actiu (0.2%) i NAA (0.1 mg l^{-1}). Amb aquest medi i per a un determinat clon obtingueren a les 5 setmanes un 77% d'arrelament amb un nombre mig d'arrels per plantula de 2.6. Senyalen, com d'altres autors, la necessitat d'emprar brots vigorosos per tal d'obtenir un arrelament ràpid i exitós; un 40% dels brots amb més de 5 fulles arrelaren en 15 dies i a les 3 setmanes presentaven una mitjana de 3.9 arrels/brot.

B - Activitat peroxidàsica i arrelament

Les diferències qualitatives i quantitatives de l'activitat peroxidàsica serveixen com indicadors de la diferenciació (floració, arrelament, maduració, etc.) Aquesta activitat s'altera quan es produeixen canvis en el desenvolupament vegetal (Wolter i Gordon, 1975; Gaspar et al., 1975).

Les peroxidases són glicoproteïnes reconegudes com paràmetres qualificadors dels canvis auxínics i per això l'estudi de la seva activitat és important en la inducció rizogènica (Cassells et al., 1982).

L'única font de peroxidasa comercial (E.C.1.11.7) utilitzada actualment per als diferents assajos bioquímics, s'extrau de les arrels de rave picant cultivades per sistemes tradicionals de reproducció, tot i que recentment la possibilitat d'obtenir peroxidases és possible emprant també les tècniques de cultiu de teixits (Yamada et al., 1987; Moreno et al., 1989).

En alguns teixits més del 95% de l'activitat peroxidàsica és localitzada en les parets i els espais intercel·lulars, i tot i que algun cop són trobades enllaçades a les membranes (Birecka i Miller, 1974). Normalment existeixen en una mateixa planta sota varies formes moleculars que poden ser separades per tècniques electroforètiques.

Existeixen dos tipus bàsics de peroxidases: les aniòniques i les catiòniques. Cadascuna d'elles manifesta un comportament diferenciat en la inducció rizogènica. Prèviament a l'aparició d'arrels es produeix un increment

de l'activitat peroxidàsica total (àcides i bàsiques), seguit d'una devallada de la mateixa, en relació a un decrement de les peroxidases bàsiques o catióniques, també denominades auxinoxidases (Gaspar, 1979, 1981; Gaspar et al., 1982). Gaspar (1979) desenvolupà una pauta d'arrelament *in vitro* utilitzant les variacions quantitatives de l'esmentada activitat com marcadors de les fases d'inducció i d'iniciació dels processos rizogènics, la fase inductiva vindrà caracteritzada per un increment de l'activitat enzimàtica. En aquesta fase no s'observen modificacions histològiques i citològiques aparents. En la fase d'iniciació es comencen a formar els primordis radiculars (Thorpe et al., 1978; Gaspar, 1979) i per tant s'observa un procés de lignificació continuada en la formació de les cèl·lules xilemàtiques (Ranadive i Haard, 1972; Harking i Obst, 1973). La devallada de les peroxidases catióniques hauria d'implacar que la inducció radicular estigués caracteritzada per la reducció de l'auxina (Gaspar, 1981); tanmateix els resultats d'anàlisis d'auxines en el curs de la rizogènesi en diferents espècies vegetals són força discrepants (Haissing, 1986) i calen estudis més detallats per a discutir l'acció d'aquest regulador en les dues fases successives del procés radicular.

L'activitat peroxidàsica màxima que s'assoleix en la fase d'arrelament *in vitro* és força variable atenent principalment a l'espècie, cultivar o clon i als reguladors de creixement auxínics emprats (Simola, 1973; Van Hoof i Gaspar, 1976; Thorpe et al., 1978; Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984; Patience i Alderson, 1987).

Els treballs realitzats en arrelament *in vitro* per Chandra et al. (1971, 1973) en *Phaseolus aureus*, Nanda et al. (1973) en *Impatiens alsamica*, per Quorin et al. (1974) i per Druart et al. (1982) en *Prunus*, per l'equip de Moncou-

sin (Moncousin i Gaspar, 1983; Moncousin i Ducreux, 1984) en carxofera i per Berthon et al. (1987) en *Sequoiadendron giganteum* mostraren que els esmentats canvis en l'activitat peroxidàsica podien ser utilitzats fidedignament com indicadors de la transició en la rizogènesi de la fase inductiva a la fase d'iniciació.

Varis autors han observat un important increment de la concentració peroxidàsica i una ràpida davallada de la mateixa quan els tractaments rizogènics es realitzen en condicions de foscor (Gaspar et al., 1977; Druart et al., 1982; Cassells et al., 1982).

Moncousin i Gaspar (1983) realitzaren l'estudi de l'activitat peroxidàsica en brots de 3 cm de llargada i amb 6 fulles del cultivar de carxofera "Vert de Laon" en fase d'arrelament. L'esmentat material procedia d'una explantació de gemes axilars que havien estat subcultivades 8 vegades en el medi de propagació proposat per Moncousin (1980a,b, 1981). Els medis d'arrelament emprats per a desenvolupar l'experiència contenien el medi basal suplementat amb diferents hormones i/o vitamines: IBA (1 mg l^{-1}), vitamina D_2 (10 mg l^{-1}), NAA (1 mg l^{-1}) i NAA (1 mg l^{-1}) + vitamina D_2 (10 mg l^{-1}). S'avaluà l'activitat peroxidàsica diàriament i es veié que el 6è dia era quan la concentració peroxidàsica assolía el màxim en el tractament que resultà més afavoridor per a la inducció radicular (elevats percentatge d'arrelament i nombre d'arrels al final de la rizogènesi), que fou el medi que contenia vitamina D_2 i NAA. Resultà força exitós traslladar els brots induïts (6 dies) a un altre medi compost pel medi basal però sense reguladors del creixement o bé suplementat amb rutina (610 mg l^{-1}) un cop finalitzada la fase d'inducció rizogènica. Utilitzant aquests dos medis consecutius obtingueren als 10 dies un arrelament del 42% i als 20 dies del 84%. Un fotoperíode de 16 h de

llum o bé una irradiància continuada durant la fase inductiva millorà la rizogènesi, front un control sense llum. Tanmateix les condicions de foscor o un fotoperíode de 16 h eran estimuladors de la fase d'iniciació. Realitzar les dues fases en condicions de foscor afavorí la formació de cal.lus.

Les variacions de l'activitat peroxidàsica de *Cynara scolymus* L. durant la fase de rizogènesi atenent a l'origen del propàgul (llavor o teixit meristemàtic) i el nombre de subcultius procedents (2-4-8-12-15) en el medi de multiplicació foren estudiades per Moncousin i Ducreux (1984). El percentatge d'arrelament i el nombre d'arrels obtinguts depenien del nombre de repicats i del tipus d'explant. El percentatge rizogènic més elevat es donà en el material que havia estat més subcultivat (12-15 subcultius) i en el procedent de llavor. L'esmentat material fou el que manifestà una activitat peroxidàsica més elevada. Els citats autors consideren per tant que el material que ha sofert més nombre de repicats presenta aptitud rizogènica en presentar característiques de material rejuvenit. Aixó està d'acord amb els assajos realitzats en altres espècies: *Pinus* (Françlet et al., 1980), *Vitis* (Favre, 1977) i *Dahlia* (Watelet-Gonod i Favre, 1981).

Taula - 9 Medis d'arrelament més emprats en la micropropagació de *Cynara scolymus*.

Autor	Tipus explant	Macro	Micro	Ad.org.	IBA	IAA	NAA	KIN	Sacr.	Agar	Altres	pH	T (°C)	Llum ² (µE/m s)	Fot. Arrel. (h)	Arrel. (%)
					(mg/l)				gl ⁻¹							
Moncousin (1980)	½ MS	G	G		10	-	-	-	15	8	(2)	5.6	22-25	180		
Moncousin (1981)	½ MS	MS	MS		-	-	1	-	15	8	(3)	5.6	22-25			
Ancora et al. (1981a)	½ MS	½ MS			-	-	2	-	20	7	(4)	5.5	25	0	0	50
Ancora et al. (1981b)	½ MS	½ MS			-	-	2	-	20	7	(5)	5.5				84
Peña i Ayuso (1983)	Apexs mer.	½ MS	½ MS		-	-	2	-	30	8	(1)					
Pécaut (1983)	Apexs	½ MS	MS		-	-	0.5	0.05	30	8	-	5.5	25	0	0	70
Moncousin i Gaspar (1983)		MS	MS				1		20	8	(6)	5.6				80
Moncousin i Ducreux (1984)	½ LS	½ LS	LS		-	-	1	-	18	6	(6)	5.6	20-25	100	16	14-68
Bigot i Foury (1984)	LLav. ½ MS	MS	MS		-	-	0.1	-	30	7	(8)	5.8				77

(1) Carbó actiu 500 mg/l + Tiamina 0.4 mg/l + Inositol 100 mg/l MS: Murashige i Skoog (1962)

(2) NH₄NO₃ 150 mg/l + Tiamina 4 3 LS: Linsmaier i Skoog (1965)

(3) Vitamina D 10 mg/l + Tetraborat sòdic 100 mg/l G: Gamborg i Eveleig (1968)

(4) Tiamina 0.9 mg/l + Inositol 100 mg/l + Ac. ascorbic 100 mg/l

(5) Tiamina 0.4 mg/l + Inositol 100 mg/l + Ac. ascorbic 100 mg/l

(6) Vitamina D 10 mg/l

(7) Rutina 0 mg/l o 610 mg/l

(8) Carbó actiu 2 g/l

1.3.3.5. Fase d'aclimatització

L'èxit d'una bona tècnica de micropropagació no pot ser avaluada fins que no es coneix el nombre de plantes o brots que poden ser satisfactòriament aclimatats.

Aquesta fase consisteix en la transferència del material provinent de les fase de proliferació o d'arrelament a condicions de *ex vitro*. El material a aclimatar podria ser: microesqueixos arrelats, microesqueixos induïts a rizogènesi, o bé microbrots sense tractament d'arrelament *in vitro*. L'objectiu principal d'aquesta fase és aconseguir una elevada supervivència, l'adquisició de resistència a les condicions ambientals *ex vitro* i la recuperació i/o implantació de totes les activitats fisiològiques.

Les fulles dels brots d'espècies vegetals durant la micropropagació presenten una activitat fotosintètica reduïda (Short et al., 1984), baix contingut de ceres epicuticulars (Grout i Aston, 1978a; Sutter i Langhans, 1979; Wardle et al., 1983; Fuchigami et al., 1981), anormalitats estomàtiques (Brainerd i Fuchigami, 1982; Wardle et al., 1983; Short et al., 1984) i una anatomia alterada (Grout i Aston, 1978b; Short et al., 1984). Com a conseqüència d'aquestes alteracions foliars es produeix normalment mortalitat dels brots en la fase d'aclimatització (Grout i Crisp, 1977; Wardle et al., 1979; Short et al., 1987). Les primeres fulles desenvolupades durant la fase d'aclimatització presenten una anatomia i una fisiologia transitòria entre les fulles obtingudes *in vitro* i les originades en condicions *ex vitro*.

L'aclimatització és, en moltes espècies i també en *C. scolytus*, un dels problemes més importants del cultiu *in vitro*. Amb freqüència, la supervivència és molt baixa, i s'hi originen unes pèrdues econòmiques molt elevades i el consegüent encariment del material aclimatat.

L'èxit en l'aclimatització depèn de l'acondicionament previ en la fase d'arrelament i del control de les condicions ambientals durant l'aclimatització (Maene i Debergh, 1987). La taxa de mortalitat en la fase d'aclimatització sembla ser depenent de la humitat relativa existent en la fase de multiplicació, en el cas d'emprar microbrots no arrelats, o en la fase d'arrelament si s'aclimata material arrelat. Diversos autors han assajat de baixar la humitat relativa de les fases prèvies a l'aclimatització mitjançant diversos procediments: elevades concentracions d'agar (Marín i Gella, 1987), presència de lanolina i/o de sílica gel (Wardle et al., 1983), ja que com més elevada sigui la humitat relativa *in vitro* menor és el percentatge de supervivència que s'aconsegueix.

Segons l'equip de Donnelly (Donnelly i Vidaver, 1984 a,b; Donnelly et al., 1985) quan la intensitat de llum en la fase d'arrelament ha estat baixa ($25 \mu\text{EPARM}^{-2}\text{s}^{-1}$) la mortalitat és significativament inferior que quan aquesta ha estat elevada ($80 \mu\text{EPARM}^{-2}\text{s}^{-1}$), tot i presentar els brots, de les dues procedències, una anatomia similar. Aquest comportament diferent en l'aclimatització l'atribueixen a que els brots procedents de baixa irradiància poseien un contingut de pigmentació superior i possiblement una grandària de fulla inferior que implicaria una reducció en les pèrdues d'aigua.

Gertsson (1988) obtingué un millor arrelament i aclimatització conjunt (80%) de brots de *Senecio x hybridus* multiplicats a baixes concentracions de BAP (de 0 a 0.1 mg l⁻¹) que altes (5 mg l⁻¹) on fou del 50%. Diversos autors proposen, per tal d'incrementar el percentatge de supervivència, realitzar una primera fase d'aclimatització (fase de preparació) sota condicions ambientals controlades, ubicant el material procedent d'*in vitro* en una cambra d'aclimatització, on sigui possible regular alhora la temperatura, la humitat relativa, la intensitat lumínica, la concentració de CO₂ i l'intercanvi gasós; i posteriorment realitzar una segona fase d'aclimatització en hivernacle (Kozai et al., 1987, 1988; Hayashi i Kozai, 1987; Fujiwara et al., 1988; Hayashi et al., 1988). Un enriquiment de la concentració de CO₂ en hivernacle acompanyat d'un increment de llum suplementaria permeté a Desjardins et al. (1990) aconseguir una aclimatització altament satisfactoria en *Asparagus officinalis*.

Com a substrats, cal utilitzar materials estèrils que presentin una alta aireació i, al mateix temps, una bona disponibilitat d'aigua (barreges de turba, perlita, vermiculita, etc.). La calefacció del substrat és beneficiosa en molts casos. Inicialment la humitat relativa ha de ser molt elevada, i la intensitat lumínica, relativament baixa; progressivament, és necessari disminuir gradualment la humitat relativa i augmentar-hi la irradiància (Marín i Gella, 1987; Martínez i Cañameras, 1988). Aquestes condicions es poden aconseguir fàcilment, en hivernacles de multiplicació, amb les tècniques modernes de control ambiental.

Marín i Gella (1987) aclimatant microbrots arrelats de *Prunus cerasus* L., observaren que a partir del 15è dia d'iniciar-se la fase d'aclimatització començava a manifestar-se una important mortalitat del material vege-

tal, sempre que l'aclimatització es feia en condicions ambientals amb una elevada humitat relativa; tanmateix quan la humitat relativa davallava a intervals progressius, la supervivència dels microbrots era significativament superior. Això suggereix que les plantes procedents de *in vitro* necessiten estimular-se per tal de començar a adaptar-se als nous mecanismes de vida autòtrofa.

Ancora et al. (1981b) aclimatitzaren brots de carxofera arrelats en una barreja composta de turba (80%) i perlita (20%), mantenint una temperatura de 20°C i una humitat relativa propera a la de saturació durant una setmana. Harbaoui et al. (1982) després d'aconseguir l'arrelament *in vivo* mantenia les plantes durant tres setmanes en un hivernacle i posteriorment les traslladava a una espècie d'ombracle resguardat del vent, previ a la plantació del material en el camp.

Bigot i Foury (1984) realitzaven l'aclimatització en dues etapes: un o dos repicats en una sorra amb solució nutritiva, 20°C de temperatura i 16 hores de llum diàries. Posteriorment les plantes eren vernalitzades abans de ser ubicades en el camp. El percentatge de mortandat era força considerable (40%) i l'atribuïren l'excés d'humitat en el substrat, que produïa o bé necrosi de coll o bé asfíxia radicular.

1.3.4. Problemàtica de la micropropagació

1.3.4.1. Vitrificació

La vitrificació és una alteració fisiològica que es presenta freqüentment en la propagació *in vitro* de varies espècies vegetals. Aquest fenomen pot causar importants perdues de material micropropagat i pot arribar a impedir una bona programació comercial a llarg termini (Navatel, 1982). Les fulles del material vitrificat solen ser amples, gruixudes, translúcides, arrugades i normalment arrissades i es trenquen amb molta facilitat. Segons Pâques i Boxus (1987c), en una revisió sobre la bibliografia existent del tema, senyalen que els brots vitrificats presenten fulles típicament anormals, que poden ser: translúcides, vítries, vitrescents, cristal·lines o hiperhidratades, ja que el significat de la paraula "vitrificació" difereix lleugerament segons autors, per Beauchesne (1981) implica descriure plantes d'aspecte cristal·lí. Gautheret (1981) creu més oportú utilitzar el terme hiperhidratació en lloc de vitrificació, al hipotetitzar la presència d'aigua en lloc d'aire en els espais lacunars en aquests tipus de teixits. Pâques i Boxus (1987b) confirmaren la hipòtesi abans esmentada al comprovar que aquest aspecte translúcid de les fulles vitrificades sí que es devia a una presència d'aigua en l'espai lacunar.

Aquests desordres fisiològics estan relacionats amb deficiències de clorofil·les i amb una hipertròfia de les cèl·lules (Jones, 1976; Werner i Boe, 1980; Gaspar et al., 1987; Pâques i Boxus, 1987b). Tanmateix la diferència entre el contingut d'aigua entre plantes vitrificades i no vitrificades no excedeix del 6% (Kevers et al., 1984; Leshem, 1983; Pâques i Boxus, 1984, 1987 a,b; Ziv et al., 1983).

La causa d'aquesta hiperhidraticitat ha estat i és encara molt discutida i sembla ser, a més a més, que els fenòmens de vitrificació varien segons un clon o un altre dins d'un mateix cultivar (Pâques i Boxus, 1987c). Les causes del fenomen algunes vegades semblen estar relacionats a la posició de l'explant en la planta mare (Denco, 1987), probablement influenciat pels nivells hormonals endògens, i a la manipulació del material en el laboratori: preparació de l'explant i posició en el medi de cultiu, composició del medi, condicions ambientals (Pâques i Boxus, 1987c) i forma de tallar o separar el material al llarg dels subcultius (Harbaoui et al., 1982; Pâques i Boxus, 1987a). Estudis microscòpics realitzats per Debergh et al. (1981) confirmaren que les fulles vitrificades formades en les fases d'iniciació o propagació no presentaven teixits descolorits sinó tan sols mesòfil esponjós. El color verd més clar que sovint caracteritza les fulles vitrificades podria ser una conseqüència directa d'una deficiència en els continguts de clorofil·les a i b (Phan i Letouzé, 1983; Letouzé i Daguin, 1983; Ziv et al., 1983; De Proft et al., 1987; Kim i Byun, 1988; Pasqualetto et al., 1988). Tanmateix certes vegades les fulles vitrificades que estan enroscades manifesten un verd més intens que no s'ha de relacionar amb un increment de clorofil·les, sinó que probablement és el resultat d'una superposició de teixits foliars (Von Arnold i Erickson, 1984; Pâques i Boxus, 1984). Estudis microscòpics també mostren els teixits vitrificats dotats d'una epidermis abaxial amb estomes prominents (Debergh et al., 1981; Vieth et al. 1983; Vieitez et al., 1985; Pâques i Boxus, 1987a), una làmina cuticular ausent o discontinua, així com un abundant parenquima lacunar (Debergh et al., 1981; Vieth et al., 1983; Vieitez et al., 1985) i uns volums dels espais lacunars i cel·lulars més grans (Pâques i Boxus, 1984, 1987a; Von Arnold i Erickson, 1984; Vieth et al., 1983; Vieitez et al., 1985, 1987; Kim i Byun, 1988; Pasqualetto et al.,

1988). Kevers et al. (1984) observaren que les plantes vitrificades presentaven una activitat peroxidàsica més elevada, també demostrat per Standardi i Micheli (1988), i que la presència de fenilalanina ammonia-lyasa (PAL), així com el contingut fenòlic eren més baixes. L'activitat peroxidàsica i la PAL estan involucrades en la lignificació (Roberts i Miller, 1983; Gaspar et al., 1982; Kevers i Gaspar, 1985). Els teixits vitrificats són deficientes en síntesi de lignina (Kevers i Gaspar, 1985; Daguin i Letouzé, 1985, Letouzé i Daguin, 1987; Kevers et al., 1988; Kim i Byun, 1988; Pasqualetto et al., 1988). Pasqualetto et al. (1988) comprovaren que les fulles vitrificades tenien continguts en potasi i calci més elevats que les fulles normals, mentre que presentaven deficiències en magnesi.

Aquest fenomen ha estat observat i/o estudiat per diversos autors en diferents espècies vegetals, d'entre d'altres: *Prunus* sp. (Quorin i Lepoivre, 1977; Boxus et al., 1978; Zuccherelli, 1979; Druart et al., 1981), *Malus* sp. (Boxus et al., 1978; Rugini i Verma, 1983; Leonhardt i Kandelner, 1987), *Salix japonica* (Beauchesme, 1981), *Salix babylonica* (Letouzé i Daguin, 1983), *Dianthus caryophyllus* (Hakkaart i Versluijs, 1983; Ziv et al., 1983; Denco, 1987); *Forysthia intermedia*, *Oreopanax nymphaeifolium*, *Gerbera jamesonii*, *Allium porrum*, *Apium graveolens*, *Brassica oleracea*, *Ficus lyrata*, *Pinus* sp., *Raphanus sativus*, *Sequoia sempervirens* (Debergh, 1983), *Castanea sativa* (Vieitez et al., 1983); *Olea europea* (Rugini et al., 1987); *Pirus malus* (Romani i Standardi, 1987); *Gypsophilla paniculata*, L. (Dillen i Buysens, 1989) i també en *Cynara scolymus* (Debergh et al., 1981; Debergh, 1983; Cervera, 1989).

Per tal de disminuir el fenomen de la vitrificació s'han proposat diferents mètodes de control: Quorin i Lepoivre (1977) aconsellen reemplaçar les sals del medi de Mu-

rashige i Skoog (1962) que continguin ions clorurs, ja que atribueixen el fenomen a la presència d'aquests ions. Altres autors recomanen un aport de calor (Boxus et al., 1978; Druart et al., 1981), l'adició de pectina en el medi de cultiu (Zuccherelli, 1979), disminuir o eliminar la presència d'ions amoni (Beauchesne, 1981; Letouzé i Daguin, 1983; Letouzé i Daguin, 1987; Piagnani i Eccher, 1988), no incorporar BAP o bé disminuir la seva concentració (Boxus et al., 1978; Denco, 1987; Leshem et al., 1988), incrementar la concentració d'agar (Hakkaart i Versluijs, 1983; Debergh et al., 1981; Debergh, 1983; Ziv et al., 1983; Rugini et al., 1987; Leonhardt i Kandeler, 1987; Kim et al., 1988), utilitzar medis en doble capa (Viseur, 1987; Molnar, G., 1987), adicionar lecitina en els medis de cultiu líquids (Romani i Standardi, 1987), incorporar fructosa en lloc de sacarosa com a font d'energia, afavorir la disminució de la humitat relativa i establir un bon intercanvi gasòs, mitjançant l'obertura dels tubs o dels bocals de cultiu (Dillen i Buysens, 1989).

De tot el que hem dit anteriorment podem deduir que la correcta utilització de totes aquestes propostes dependrà molt de l'espècie, cultivar o clon micropropagat. De totes elles la més estandaritzada per a la majoria d'espècies és emprar medis solidificats amb una elevada concentració d'agar, superior al 0.8%, tot i que aquesta elecció farà davallar pràcticament en tots els casos la taxa de multiplicació. De fet aquesta opció implica entre d'altres disminuir la pressió de vapor en equilibri a l'atmosfera del bocal o tub.

Poques vegades brots vitrificats han pogut ser "regenerats" com a material normal. Rugini i Verma (1983) aconseguiren recuperar brots vitrificats d'ametller, emmagatzemar-los els durant 15 dies a baixes temperatures (40C)

abans de subcultivar-los novament. Leonhardt i Kandeler (1987) empeltaren material vitrificat de *Pediocactus* i un 72% del mateix manifestà un creixement completament normalitzat.

Els brots vitrificats obtinguts *in vitro* no solen sobreviure la fase d'aclimatització. Aquest fracàs es pot relacionar més amb el mal funcionament fisiològic de la fulla que amb el fet d'aconseguir un arrelament deficient (Debergh i Maene, 1984).

En la micropropagació de carxofera les malformacions més característiques que presenten els brots vitrificats són: làmina foliar i pèciol amb gran contingut d'aigua, les fulles més joves esdevenen molt turgents, les fulles vitrificades que primerament estan poc desenvolupades aconsegueixen quintuplicar la seva llargària, s'observa un canvi de color de verd intens a translúcid i finalment les fulles vitrificades acaben necròtiques (Debergh, P. et al., 1981).

Debergh et al. (1981) per disminuir la problemàtica de la vitrificació en carxofera van realitzar una sèrie de proves amb la varietat obtinguda a Tunísia "Violet d'Hyères", convençuts que el potencial hídric del medi de cultiu era un factor determinant en la vitrificació. Compararen medis líquids i sòlids. Afegien al medi base diferents concentracions d'hidrats de carboni (29 i 58 mM de sacarosa o manitol) i de Bacto Agar Difco (0 - 0.6% - 0.9% - 1.1% - 1.5% - 2%). Els brots que es desenvoluparen en els medis que contenien concentracions iguals o superiors al 1.1% d'agar amb o sense presència d'hidrats de carboni no presentaven els fenòmens d'hiperhidratació, tanmateix les taxes de multiplicació foren molt baixes (1 - 1.5). A quantitats més baixes d'agar la taxa total de multiplicació incrementava notablement (3.3) però la vitrificació oscil.lava entre el

40-100%. Aquests resultats podrien lligar-se a un increment de l'activitat peroxidàsica d'acord amb els resultats obtinguts per Kevers i Gaspar (1985) en el cultiu *in vitro* de clavell amb excés hídric.

Els resultats d'incrementar la concentració d'agar del medi obtinguts pels citats autors en carxofera i en altres espècies, així com els aconseguits per Ziv et al. (1983) en clavell demostren que la vitrificació pot esser pràcticament eliminada quan és produeix una disminució de la disponibilitat d'aigua en el medi cultiu, és a dir, quan disminueix substancialment el potencial hídric en el medi, i per tant una disminució de la humitat relativa dintre del tub de cultiu. La disminució de la humitat relativa a més de promoure com s'ha dit una reducció de la vitrificació, comporta un procés d'epidermització afavoridor per les condicions posteriors de *ex vitro*. En condicions standar de cultiu *in vitro* els treballs realitzats per Grout i Crisp (1977) en col-i-flor, per Sutter i Langhans (1982) en col i per Ziv et al. (1983) en clavell demostraren que amb altes humitats relatives no es formava cera epicuticular en les fulles dels brots. En canvi quan treballaven amb humitats relatives més baixes si que es produïa en algunes espècies com el clavell (Ziv et al., 1983) i col (Sutter i Langhans, 1982) formació de cera epicuticular. La seva deficiència comporta una pèrdua d'aigua més important i en conseqüència una dessecació dels microbrots quan són transferits en la fase d'aclimatització (Sutter i Langhans, 1979).

1.3.4.2. Infeccions bacterianes i fúngiques

Les infeccions bacterianes i fúngiques que es solen manifestar en la micropropagació de material vegetal poden ser d'origen exogen o endogen. Els fongs, pràctica-

ment tots són d'origen exogen mentre que les contaminacions bacterianes solen tenir els dos orígens. Debergh i Maene (1984) han determinat un únic cas de contaminaciones fúngiques endògenes en *Medinilla magnifica* on es detectaren microconidis de *Fusarium spp.* en el teixit vascular, fins i tot en el meristem. Eliminar els microorganismes exògens en el cultiu *in vitro* de *Cynara scolymus* L., i altres espècies, es pot aconseguir realitzant una adequada preparació i desinfecció del material vegetal. Tanmateix la presència de bacteris endògens pot arribar a crear greus problemes. Algunes vegades la manifestació d'aquestes colònies bacterianes es produeix als pocs dies posteriors a la sembra de l'explant, però desgraciadament pot expressar-se després de diversos mesos de la posta en cultiu, ja que molts medis no són gaire rics proteïnícament, i per tant poder ser inòspits per a alguns bacteris, i per això és força normal que tardin a manifestar-se. Son diversos els autors que aconsellen la utilització de medis reveladors, incorporant al medi extracte de llevat (Debergh i Maene, 1985; Scortichini i Chiarioti, 1987) i peptona (Debergh i Maene, 1985). Moncousin (1980, 1981) creu molt convenient ubicar els explants de carxofera, posteriorment a la desinfecció dels mateixos i abans de la seva entrada en la fase d'iniciació pròpiament dita, en un medi que ell anomena de "tria" formulat amb: les sals minerals de Heller (250 mg l^{-1}), hidrolisat de caseïna (500 mg l^{-1}), extracte de llevat (8 g l^{-1}) i agar (30 g l^{-1}). Amb aquest medi d'elevat contingut proteic, s'estimula el desenvolupament de les colònies bacterianes i fúngiques, i per tant pot permetre més fàcilment la manifestació de les mateixes en el medi, i en conseqüència eliminar tots aquells propàguls amb contaminacions aparents i així garantir una millor asèpsia en les properes operacions de cultiu. Per tal de prevenir o reduir l'oxidació dels fenols recomana que mentre que el material està en aquest medi de "tria" estigui a les fosques. Les colònies bacterianes identificades per

l'esmentat autor en les varietats de carxofera amb les que treballà pertanyen als següents gèneres: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* i *Xanthomonas*. Cal considerar que el fet que no es manifestin contaminacions, emprant aquests medis reveladors no implica que el material micropropagat estigui lliure de bacteris o fongs endògens.

Segons Harbaoui i Debergh (1980) aquesta manifestació tardana també es veu facilitada per les ferides produïdes al subdividir les tofes en la fase de multiplicació i es força variable el seu grau d'aparició (10-40% del material explantat). L'adició d'antibiòtics (estreptomicina, penicilina, cloramfenicol, etc.) en el medi no aconsegueix inhibir el seu desenvolupament de les colònies bacterianes, tan sols retardar-la (Harbaoui i Debergh, 1980). Les dosis que haurien d'usar-se d'antibiòtics per tal d'aconseguir inhibir l'aparició de colònies bacterianes són tan altes que causen fitotoxicitat, per exemple, el cloramfenicol perquè fos efectiu hauria d'utilitzar-se a dosis superiors als 50 mg l^{-1} , i ja a partir de 10 mg l^{-1} esdevenen símptomes de fitotoxicitat en el gènere *Cynara* cultivat *in vitro* (Harbaoui i Debergh, 1980).

1.3.4.3. Efecte subcultiu en la fase de multiplicació

La majoria de treballs publicats sobre el comportament de les espècies micropropagades en la fase i multiplicació, normalment tan sols fan esment a la resposta del material micropropagat a diferents tractaments (hormonals, nutritius, ambientals, etc.) en un únic subcultiu, tot i que la resposta al llarg de diferents subcultius pot ser força diferent (Norton i Norton, 1986).

Normalment la taxa de multiplicació incrementa durant les primeres generacions per davallar posteriorment, així com es produeix un decrement en la llargada dels brots, en la grandaria de la fulla i un augment en la formació de cal.lus. Aquest fet ha estat estudiat en diverses espècies: *Chaenomeles japonica* (Thunb) Spach., *Crataegus brachyacantha* Sarg i Engelm, *Potentilla fructioca*, L. *Prunus cerasifera*, Ehrh, *Prunus tormentosa*, Thumb (Norton i Norton, 1986) i en *Actinidia chinensi* (Pl) (Standardi, 1982). Altres autors han comprovat que al menys després de seguir set generacions de cultiu de morera in vitro no es produïren canvis notables en la taxa de proliferació (Swartz et al., 1983), i que brots de *Prunus* podien ser cultivats sense cap problema per més de dos anys (Rugini i Verma, 1983). Gertsson (1988) en els seus estudis amb *Senecio x hybridus* conclugué que el comportament al llarg de diferents subcultius, presentava dintre d'un mateix cultivar, variabilitat clonal.

Alguns autors citen el fenomen de l'habitució a les citoquinines emprades, especialment al BAP, en acumular-se i estimular alhora la seva síntesi en els teixits de l'explant (Clarasó, 1987; Hereu, 1987; Canals, 1987; Ortiz, 1989).

En *Cynara scolymus*, L. i per la varietat "Blanca de Tudela" (Cervera, 1989) l'efecte subcultiu té una incidència molt important en la resposta als diferents tractaments hormonals, sobretot quan el material porta més d'un any en cultiu, mentre que aquest efecte és menys evident en els primers subcultius.

1.3.5. Qualitat del material micropropagat

Els assajos de camp amb plantes de carxofera obtingudes per micropropagació mostren que aquestes siguin de la varietat que siguin són sempre més vigoroses i produeixen un nombre més important de capitols (Pécaut et al., 1983; Saccardo i Ancora, 1984). Plantes lliures de virus pertanyents al cultivar "Violet d'Hyères" produïren doble nombre de capitols que plantes propagades per via tradicional i no mostraren cap símptoma d'infecció vírica fins i tot després de 2 anys del seu transferiment al camp (Harbaoui et al., 1982). Les plantes micropopagades però viròtiques també produeixen més que les plantes control, però menys que les no viròtiques (Saccardo i Ancora, 1984). Les plantes micropopagades a més a més de poder no ser viròtiques poden estar lliures d'altres patògens (fongs i bacteris), l'absència dels quals pot també afavorir un millor desenvolupament i creixement de la planta. Freqüentment les plantes procedents de micropropagació perden precocitat de floració, però Saccardo i Ancora (1984) aconseguiren plantes de carxofera que no havien perdut aquesta important qualitat, i que es mantingué durant tres anys consecutius a la seva plantació.

Pel que fa als cultivars de fulla sencera o poc dentada ("Blanca de Tudela", "Blanca de Aranjuez", "Violet de Porovence", etc.) la bibliografia és quasi inexistent. Alguns equips d'investigació que treballen amb aquests cultivars posen de manifest tot i no aportant encara resultats experimentals fefaents (Pécaut comunicació personal), que sempre i quan el material procedent de la micropropagació no presenti fulla retallada es manté la precocitat i a més millora la producció. Però no obstant, quan el material micropropagat presenta variacions intravarietals (presència de fulles pinnatífides) es retarda la precocitat, encara que la producció pot ser superior.

Els treballs de camp realitzats per l'equip de Migliori i Pécaut a França (Pécaut 1984, 1986) mostraren que les plantes procedents de micropropagació i sense virus, podien tornar-se a recontaminar a partir del quart o cinquè mes de ser transferides al sòl, encara que en aquesta fase de desenvolupament, no totes les plantes eren afectades per igual, i a més a més la concentració viròtica era baixa. Pràcticamet, quan les plantes portaven més de 18 mesos de conreu, totes eren infectades per dos virus, principalment el ALV i el BBWV. Tanmateix les plantes que havien estat cultivades sota un hivernacle especial, que impedís l'entrada d'insectes, no presentaven recontaminacions viròtiques en finalitzar el primer any de cultiu.

En el cas de la varietat "Blanca de Tudela", la precocitat, tant de plantes multiplicades per sistemes tradicionals com per *in vitro*, sembla estar relacionada amb el tipus de fulles desenvolupades, com més incidència de fulles dentades menys precoç és la planta i generalment dóna menys producció (degeneració de la carxofera).

1.3.6. Aspectes anatòmics i fisiològics en la micropropagació

Són escassos els treballs publicats en relació a les característiques anatòmiques de composició i fisiològiques del material vegetal en les diferents fases de la micropropagació i comparativament en relació al material ja aclimatat i/o de camp. Els diversos treballs aborden normalment aspectes parcials de la temàtica fisioanatòmica obtenint resultats moltes vegades contradictoris. Aquest fet no és d'estranyar atès que es treballa amb espècies i varietats diferents i que la metodològia emprada en les fases de micropropagació (tant mediambientals, com de composició de medis i temps) és molt variable segons autors.

1.3.6.1. Estomes

Alguns autors han trobat que la densitat estomàtica en fulles de brots de diferents espècies en les fases de micropropagació és superior a la que presenta la pròpia espècie en condicions de cultiu tradicional (Wetzstein i Sommer, 1983; Blanke i Belcher, 1989) o abans de la seva aclimatització en hivernacle (Wetzstein i Sommer; Donnelly et al., 1986; Martinez et al., 1990). Altres autors han trobat resultats diferents per exemple Marin (1986) en l'espècie *Prunus cerasus* trobà menys densitat estomàtica en fulles de *in vitro* que en fulles de la mateixa espècie cultivades en camp, però la densitat estomàtica *in vitro* era superior encara que no significativament de les fulles de material aclimatat procedent de micropropagació.

La forma dels estomes sembla ser diferent segons espècies. *Liquidambar styraciflua* (Wetzsteini Sommer, 1982) i *Prunus cerasus* (Marin i Gella, 1988) presenten formes

arrodonides i de grandària més gran, mentre en que *Philodendron tuxla* (Martinez et al., 1988) solen ser freqüentment elíptics.

La regulació del funcionament estomàtic en fulles *in vitro* difereix segons espècie, en col-i-flor (Grout i Aston, 1978a), en col (Sutter i Langhans, 1979), en *Prunus cerasus* (Marin i Gella, 1988) es produeix tancament estomàtic a baixa irradiància, en canvi Brainerd i Fuchigami (1981) fulles de pomera comprovaren que els estomes desenvolupats sempre estaven oberts i pràcticament no responien a estímuls exteriors tals com: fosc, mannitol, adició d'àcid abscísic, increment de CO₂, etc.

Donnelly et al. (1982) observaren que els estomes estaven més oberts en la fase d'arrelament que en la fase de multiplicació en la micropropagació de morera.

1.3.6.2. Anatomia

La grandària tan petita del material micropropagat probablement cal relacionar-la més amb un decrement de la divisió cel.lular que amb la pròpia grandària cel.lular (Smith et al., 1986).

Les plantes micropropagades presenten una anatomia de fulla alterada amb un parènquima en palissada amb poques capes cel.lulars (Donnelly i Vidaver, 1984a; Tisdall i Donnelly, 1988; Martinez et al., 1988), amb cèl.lules de menor longitud (Brainerd et al., 1981; Smith et al., 1988), o sense diferenciar-se de les altres cèl.lules del mesòfil (Grout i Aston 1978a; Wetzstein i Sommer, 1982; Reuther, 1988). Probablement i com a conseqüència de l'elevada humitat i de tat cel.lular en el parènquima és menor, amb majors espais

tat cel.lular en el parènquima és menor, amb majors espais aeris intercel.lulars (Grout i Aston, 1978; Brainerd et al. 1981; Wetzstein i Sommer, 1982; Donnelly i Vidaver, 1984a; Marín i Gella, 1988). El gruix de la fulla és menor (Wetzstein i Sommer, 1982; Donnelly i Vidaver, 1984a; Simth et al., 1986), tot i que la longitud de les cèl.lules epidermiques adaxials i abaxials no són diferents de les plantes desenvolupades *ex vitro* (Brainerd et al., 1981). La superfície de l'epidermis conté també menys ceres epicuticulars.

Els estudis realitzats per Reuther (1988) mostren que les fulles, i principalment les completament desenvolupades de diferents cultivars d'espècies micropropagades (*Spathiphyllum floribundum*, *Pelargonium zonale* i *Rosa rugosa*) contenen una quantitat de cloroplasts significativament menor que les desenvolupades en hivernacle, així com presenten també una grandària inferior i una forma més inflada.

Les condicions nutricionals heterotròfiques i les modificacions observades per diversos autors en el desenvolupament de les fulles permet suggerir que els cultius de microbrots realitzen una baixa o nul.la activitat fotosintètica (Grout i Aston, 1978; Wetzstein i Sommer, 1982; Donnelly i Vidaver, 1984b; Lee et al., 1985; Pospislová et al., 1988; Schoch et al., 1989). Tanmateix Reuther (1988) senyala que es pot millorar l'eficiència fotosintètica durant la fase d'arrelament *in vitro* enriquint l'ambient amb CO₂ i especialment en condicions de baixa irradiància, al incrementar-se la fixació de CO₂.

Les fulles desenvolupades *in vitro* presenten un percentatge de contingut hídric major que les cultivades en camp (Donnelly i Vidaver, 1984b).

Les fulles diferenciades *in vitro* mantenen la seva anatomia i estructura morfològica alterada després de la seva aclimatització en hivernacle, sols els cloroplasts milloren la seva grandària, tanmateix les fulles que ja es formen en aquesta darrera fase presenten una anatomia foliar normal (Reuther, 1988).

Les arrels formades *in vitro* presenten pocs i irregulars vasos en el cilindre central. Normalment la seva unió a la tija és defectuosa i pot estar separada per la formació de cal·lus (Aynsley i Marston, 1975; Hughes et al., 1973) o amb lligams vasculars primis i anormals (Grout i Aston, 1977). En *Pirus malus*, Hicks (1987) i en diferents clons de peus de *Prunus* (Filiti et al., 1987) i en *Prunus cerasus*, Marin i Gella (1988) no observaren cap discontinuïtat en els vasos xilemàtics i per tant hi havia un efectiu transport d'aigua entre les arrels i el brot.

1.3.6.3. Pigments fotosintètics

L'estudi de l'evolució de certs paràmetres en la micropropagació de *Philodendron tuxla* realitzat per Martinez et al. (1988) mostrà que la fulla més jove completament expandida presenta valors similars de contingut clorofil·lic (a + b) durant les fases de multiplicació i d'allargament (a baixa intensitat lumínica); en una posterior fase d'allargament a més elevada irradiància la concentració de clorofil·la augmenta, per tornar a davallar durant l'aclimatització (arrelament *ex vitro*). Finalitzat l'arrelament-aclimatització, s'observa un increment de la concentració de pigments i de la relació Cla/Clb associat a la instauració de l'autotròfia.

Capellades et al. (1990) han estudiat en brots

de roses micropropagades la dinàmica de la fluorescència de la clorofil·la a.

1.3.6.4. Contingut en nitrogen (N) i Pes específic foliar (PEF)

En condicions *in vitro* les fulles presenten un elevat contingut en nitrogen orgànic que disminueix amb el trànsit a *ex vitro* (Martinez et al., 1988).

Donnelly i Vidaver (1984b) observaren que les fulles dels brots *in vitro* de "redraspberry" presenten un major percentatge de PEF que les cultivades en camp.

El PEF fou constant en totes les fases de micropropagació de *Philodendron tuxla* inclosa l'aclimatització (Martinez et al., 1988).