



Universitat de Girona

SISTEMA RADICULAR DE *Quercus suber*: ESTRUCTURA I DESENVOLUPAMENT

Dolors VERDAGUER i MURLÀ

Dipòsit legal: Gi. 1881-2012

<http://hdl.handle.net/10803/96754>

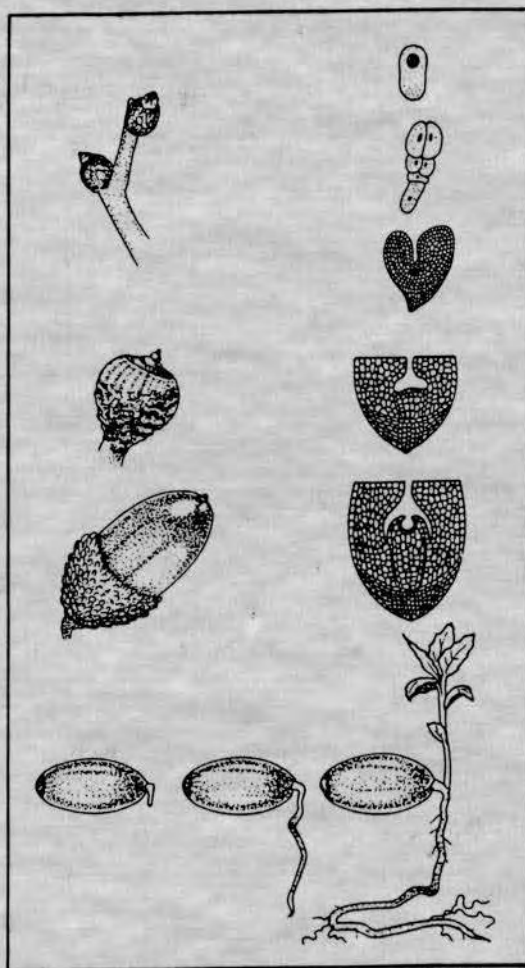
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

SISTEMA RADICULAR DE Quercus suber

DOLORS VERDAGUER I MURLÀ



TESI DOCTORAL

1995



Als meus pares

TESI DOCTORAL

SISTEMA RADICULAR DE *Quercus suber*

- Estructura i Desenvolupament-

Memòria que presenta Dolors Verdaguer i Murlà per
optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques per la
Universitat de Girona

Gener, 1995

Vist i plau de la directora de la memòria Dra. Ma.
Lluïsa Molinas de Ferrer, catedràtica del Departament
de Biologia de la Universitat de Girona.

Dra. Ma Lluïsa Molinas de Ferrer


Universitat de Girona
Biblioteca

Departament de Ciències Ambientals
UNIVERSITAT DE GIRONA

AGRAÏMENTS

Voldria manifestar la meua gratitud a totes les persones que m'han animat i ajudat al llarg d'aquests anys col·laborant a fer possible aquest treball. Desitjaria esmentar expressament:

A la Dra. Ma Lluïsa Molinas, per la direcció, recolzament i llibertat que m'ha donat durant el desenvolupament d'aquest treball, així com per la revisió i la discussió del manuscrit.

Als meus companys de laboratori, Dra. Antònia Caritat, Miquel Campos, Mireia Oliva, Pere Puigderrajols i els que també ho van ser Pere Vazquez i, Mercè Figueres, per la seva col·laboració espontània i desinteressada al llarg del treball i pel seu sentit de l'humor i senzillesa. Voldria agrair en concret a la Dra. Gemma Huguet la seva paciència a ensenyar-me les ara habituals tècniques histològiques i, també, les agradables estones que hem passat entre "sangoneres i arrels" comentant el dia a dia.

Als meus companys de la Unitat de Biologia Vegetal de la UdG, Miquel Campos, Dra. Conxi Rodriguez, Ariadna Clavell, Joan Font i molt especialment al Dr. Lluís Polo i Dr. Lluís Vilar, en els que sempre he trobat un sincer recolzament tant pel que fa a la meua trajectòria científica com docent.

A tot el Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona, en concret al Dr. Bargalló, al Dr. Fontarnau, a la Dra. Nuri Cortadelles, a l'Almudena i, a la Carme Carulla i Jordi Blavia, avui responsables del Servei de Microscòpia Electrònica de la UdG, he d'agraïr-los l'ajut i consells rebuts quant a les tècniques de preparació de les mostres per a microscòpia electrònica de scàning i per a microscòpia electrònica de transmissió.

Al Dr. L. Feldman per la seva cordialitat i tracte afable, i la seva bona disposició en revisar i discutir part d'aquest manuscrit.

Al Dr. Sergi Bonet per la confiança que va dipositar en mi just acabada la llicenciatura, i pel seu ajut i consells al llarg d'aquest treball.

A en Pep Espadaler, responsable del Museu del suro de Palafrugell, pel seu entusiasme i per l'oportunitat que va donar de transmetre, en un altre entorn, alguns dels resultats d'aquest treball.

A en Quim Paredes per haver realitzat pacientment la major part dels esquemes de la tesi.

Als amics de la "colla" que, amb admiració, he pogut comprovar que fins i tot una arrel poden convertir en motiu de broma i a la Teresa Colomer, a la recent Dra. Montse Sarrà, Marta Artigas i Marina Roldán, que sempre han estat disposades a donar-me un cop de mà.

A la família, als meus pares, Martí i Nativitat, al meus germans, Joan i Ma Àngels, pel seu recolzament incondicional, i a en Carles per haver suportat amb paciència i bon humor el meu "sprint" final.

ÍNDEX DETALLAT

	pàgina
PRESENTACIÓ	1

CAPÍTOL I: ONTOGÈNESI DE L'ARREL I DE LA CORONA RADICULAR

INTRODUCCIÓ7
MATERIAL I MÈTODES	
Material biològic9
Mètodes11
Taxa de creixement11
Microscòpia òptica11
Microscòpia electrònica d'escànnig15
Terminologia utilitzada16
RESULTATS	
Embrió: Fase de maduració17
Germinació i fase cotiledonar21
Figures25
DISCUSSIÓ53

CAPÍTOL II: CARACTERITZACIÓ DE L'ARREL PRIMÀRIA

MATERIAL I MÈTODES	
Material biològic57
Mètodes57
Microscòpia òptica57
Proliferació cel.lular59

CAPÍTOL II.a: ÀPEX RADICULAR I HISTOGÈNESI DEL SISTEMA VASCULAR

INTRODUCCIÓ65
RESULTATS	
Característiques de l'arrel primària67
Àpex radicular69
Histogènesi del sistema vascular71
Figures75
DISCUSSIÓ87

CAPÍTOL IIb: FORMACIÓ DE LES ARRELS LATERALS

INTRODUCCIÓ91
RESULTATS		
Arrels de primer ordre93
Ontogènesi93
Connexió96
Figures99
DISCUSSIÓ115

CAPÍTOL III: ENDODERMIS: DIFERENCIACIÓ I MADURACIÓ

INTRODUCCIÓ121
MATERIAL I MÈTODES		
Material biològic123
Mètodes123
Microscòpia òptica123
Microscòpia òptica de fluorescència127
Microscòpia electrònica de transmissió128
RESULTATS		
Diferenciació de l'endodermis133
Histoquímica de la paret cel.lular139
Figures141
DISCUSSIÓ159

CAPÍTOL IV: SISTEMA RADICULAR MADUR

INTRODUCCIÓ165
MATERIAL I MÈTODES		
Material biològic165
Mètodes167
Processat mostres $\varnothing > 10\text{mm}$168
Processat mostres $\varnothing < 10\text{mm}$168
Microscòpia d'escànnig170
Estudi dels components cel.lulars170
Terminologia utilitzada171
RESULTATS		
Sistema radicular173
Histologia de les arrels llenyoses fines175
Arrels blanques176
Figures177
DISCUSSIÓ191

CONCLUSIONS193
-------------	-------	------

BILIOGRAFIA197
-------------	-------	------

PRESENTACIÓ

Justificació del treball

El present treball sobre l'estructura i el desenvolupament del sistema radicular de l'alzina surera (*Quercus suber* L.), forma part d'un projecte més ampli sobre la biologia del suro i de la surera, dut a terme per l'equip del "Laboratori del suro" de la Universitat de Girona.

L'alzina surera és una espècie que creix de forma espontània en la conca del Mediterrani occidental, formant masses boscoses importants en zones amb període hivernal temperat. És una planta exigent amb la humitat limitant-se a les àrees de pluviositat superior a 500-600 mm anyals, i es tracta d'una espècie calcífuga, que només creix en substrats silícis de sòls àcids, constituïts per roques plutòniques o metamòrfiques. El seu desenvolupament es veu afavorit pels sòls profunds, sorrencs i ben airejats.

En forma natural queda restringida a la Península Ibèrica, al nord d'Àfrica, al sud de França, al sud d'Itàlia i, esporàdicament, a Turquia.

Classe: Dicotiledoneae	Família: Fagaceae
Subclasse: Hamamelididae	Gènere: Quercus
Superordre: Hamamelidanae	Subgènere: Cerris (Spach) Ørsted
Ordre: Fagales	Espècie: <i>Quercus cerris suber</i> L., Sp.Pl.:995 (1753)

Portugal és el primer país productor de suro (160.000 t/any), seguit d'Espanya (70.000 t/any, 21% de la producció mundial). A Catalunya la sureda ocupa 75.000ha en forma de bosc pur i mixt, que produeix un 15% de la producció estatal de suro. El sector surer català, però, constitueix el 70% de la indústria surera espanyola.

L'interès en aquesta espècie no radica tan sols en la importància econòmica, sinó, i molt especialment, en el seu valor ecològic i paisatgístic.

Q. suber és una espècie dominant en els boscos litorals de les comarques del Principat i pot arribar a créixer en els indrets més àrids i amb sòls esquistosos degut al seu marcat caràcter xerofític. A més, posseeix una elevada capacitat de regeneració davant certes pertorbacions antropogèniques com el foc, la tala o la pastura, habituals en l'ambient mediterrani. Actualment, es planteja una possible alternativa per cultivar-se en nombrosos conreus de secà abandonats.

Tanmateix, al tractar-se d'una espècie estrictament localitzada a la mediterrània, es troba fora dels circuits d'investigació centre-europeus o nord-americans i ha estat, fins ara, poc estudiada. Així ho demostra l'escassa bibliografia disponible, la major part dedicada a temes d'ecologia i silvicultura. Els estudis anatòmics i fisiològics són molt escassos i els que tracten concretament sobre el sistema radicular pràcticament nuls. Una descripció general de les arrels es pot trobar en el tractat de subericultura de Natividade (1950). Per altra banda, El Alaqui (1978), en un estudi sobre la morfogènesi del sistema radicular de les plàntules de *Quercus suber*, dedica un breu apartat de caràcter introductor a la morfologia i la histologia de l'arrel primària.

Dintre del context general de la biologia de la surera i de la producció de suro, l'estudi de l'arrel és molt important desde diversos punts de vista. D'una banda perquè el sistema hipogeu constitueix al voltant del 50% de la biomassa dels arbres i, de l'altra, perquè el funcionament de les arrels és essencial per a l'activitat fisiològica. Ara bé, el seu estudi presenta nombroses dificultats pel fet de trobar-se enterrat i, comparativament amb el sistema aeri, és poc conegut en el conjunt de les espècies arbòries. En el cas de la surera, a més, la corona i el sistema radicular tenen un particular interès perquè són responsables de l'elevada capacitat de rebrot d'aquesta espècie i expliquen el comportament clonal que es dona en condicions naturals. D'altra banda, per als estudis histogenètics i fisiològics, l'estructura del meristema radicular resulta molt més simple i més assequible que la dels meristemes caulinars. En aquest sentit, l'arrel de la surera ofereix un model molt apropiat per a l'estudi del procés de suberificació: en l'arrel apareixen successivament capes suberificades per compartimentar la distribució de fluids (endodermis i exodermis) i per protegir (peridermis i peridermis cicatricial). El fellogen de l'arrel de *Quercus suber*, quan es troba exposat a l'aire, és capaç -a l'igual que el brot aeri- de formar suro, un fel.lema compacte i permanent, únic entre les plantes llenyoses.

L'estudi acurat del sistema radicular a nivell histològic i cel·lular aporta una important aproximació al coneixement de la biologia del *Quercus suber* i ens ha de permetre disposar d'un model amb unes característiques úniques per afrontar, en etapes posteriors, estudis de caràcter molecular.

Objectius i organització de la memòria

Defugint una descripció purament lineal de les diferents fases de la formació del sistema radicular, el treball enfoca diferents aspectes concrets en funció dels objectius. Així, el treball s'ha estructurat en quatre parts principals dedicades, respectivament, a l'ontogènesi de l'arrel primària i de la corona radicular en relació a la capacitat de rebrot; a la caracterització histològica de l'arrel primària i del meristema radicular; a l'estudi de l'endodermis; i a la caracterització del sistema radicular madur. Cada apartat consta de: introducció, material i mètodes, resultats i discussió. El material i mètodes s'han descrit conjuntament quan ha resultat apropiat.

La primera part del treball consisteix en l'estudi ontogenètic de la formació de l'arrel i de la corona radicular, des de l'embrió madur fins als primers estadis juvenils. S'enfoca especialment en el paper del nus cotiledonar en la capacitat de rebrotar de la planta. Treballs previs havien permès comprovar que a diferència d'altres espècies de *Quercus*, les plàntules de surera responen a l'eliminació del brot aeri, mitjançant l'emissió de rebrots originats en la porció hipogea, per sota de la inserció cotiledonar. Aquest comportament va suggerir la possible participació de la regió de la corona radicular en la formació d'un òrgan de reserva de gemmes comparable al "lignotúber", descrit en altres espècies mediterrànies, principalment en els eucaliptus (Chattaway, 1958). L'interès en aclarir l'origen dels rebrots i, particularment, el paper del nus cotiledonar, han motivat aquesta part del treball.

Els objectius concrets són:

- i) Documentar els canvis histològics que es produeixen durant la maduració de l'embrió i la germinació
- ii) Estudiar les transformacions del nus cotiledonar i l'origen i el destí de les gemmes cotiledonars

- iii) Determinar el paper de la zona de transició tija-arrel "lignotúber " en les plàntules

La segona part del treball està centrada en la caracterització histològica de l'arrel primària. S'aporta una descripció general i s'estudia, per separat, l'organització de l'àpex radicular, la histogènesi del teixit vascular i la formació de les arrels laterals.

Els objectius concrets més destacables són:

- i) Estudiar l'organització del meristema apical i definir les poblacions de cèl.lules inicials
- ii) Identificar el centre quiescent
- iii) Determinar el patró de diferenciació dels elements vasculars
- iv) Estudiar la formació de les arrels laterals i la connexió amb l'arrel primària

L'estudi de l'endodermis constitueix el tercer capítol per la seva importància fisiològica i per tractar-se d'un teixit suberitzat en una planta considerada única per la seva capacitat de suberificar; el fellogen té caràcter permanent i forma un anell continu al voltant del tronc (Natividade, 1950) i, a més, el fel·lema és d'una gran puresa. S'emfasitzen els aspectes de diferenciació i maduració i, d'una manera especial, la formació de la banda de Caspari i la suberització de la paret cel.lular.

Els objectius concrets en aquest cas són:

- i) Estudiar a nivell ultrastructural les transformacions citològiques que tenen lloc durant la diferenciació de l'endodermis i la seva relació amb el procés de suberització.
- ii) Descriure per tècniques histoquímiques i per fluorescència les transformacions de la paret cel.lular que acompanyen la formació de la banda de Caspari i la suberització de la paret.

Finalment, el quart i últim capítol, més breu i més general que els anteriors, conté una descripció del sistema radicular adult de l'alzina surera. Les plantes llenyoses, en general, estan menys subjectes a estudi que les herbàcies i, particularment, el sistema radicular està poc estudiat per les dificultats metodològiques que comporta, al requerir una infraestructura no habitual i

implicar la pèrdua de la planta. Per aquesta raó, hem considerat interessant aprofitar les circumstàncies que van permetre disposar d'un exemplar adult amb una història i unes característiques físiques adequades i, de la infraestructura per poder realitzar aquesta part del treball que, bàsicament, pretén ser una primera aproximació a l'estudi de l'organització i anatomia del sistema radicular adult de l'alzina surera.

Els objectius concrets són :

- i) Caracteritzar a nivell anatòmic i histològic els components del sistema radicular madur.
- ii) Descriure la seva organització jeràrquica dins el sistema radicular.
- iii) Comprovar si alguns dels caràcters descrits en les plàntules es mantenen en l'arbre adult.

TAULA DE CONTINGUTS

PRESENTACIÓ

Capítol I.- Ontogènesi de l'arrel i de la corona radicular.

Capítol II.- Caracterització de l'arrel primària.

II.a.- Àpex radicular i histogènesi del cilindre vascular.

II.b.- Formació de les arrels laterals.

Capítol III.- Endodermis: diferenciació i maduració

Capítol IV.- Organització i estructura del sistema radicular madur.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

CAPÍTOL I:

ONTOGÈNESI DE L'ARREL I DE LA CORONA RADICULAR

INTRODUCCIÓ

La surera (*Quercus suber*) és una espècie que es caracteritza per tenir una elevada capacitat de rebrotar després d'alguna lesió. Els nous brots creixen ràpidament i amb més vigorositat que els de les plàntules (Caritat i col. 1989). La regió cotiledonar hi juga un paper important. Les gemmes latents que s'acumulen per sobre i sota dels cotilèdons s'activen fàcilment quan la part aèria és tallada.

El sistema hipogeu dels *Quercus* ha estat objecte de varis estudis des del treball de Mueller (1951), però s'han realitzat poques observacions a nivell microscòpic. La presència d'arrel pivotant és una característica important de les plàntules i arbres joves de la majoria de quercínees, però, en alguns arbres madurs desenvolupats en el bosc, l'arrel pivotant és eclipsada per les arrels laterals originades a partir de la corona radicular (Lyford, 1980); aquest és el cas de l'alzina surera *Q.suber* (Verdaguer i Molinas, 1992). D'altra banda, algunes quercínees tenen un complex sistema radicular en el qual es descriuen els lignotúbers, òrgans amb substàncies de reserva i gemmes latents responsables de la capacitat de rebrotar (Sutton i Tinus, 1983). El Emory oak, (*Q. Emoryi*) (Phillips, 1912) presenta estructures lignotuberoses resultat d'un sobre desenvolupament o hipertròfia d'arrels. Els lignotúbers, interconnectant rizomes, i les arrels, han estat descrits en el quercus gambelii (*Q.Gambelii*) per Tiedemann i col. (1987).

El terme lignotúber va ser originalment utilitzat per anomenar la protuberància present en la majoria d'espècies d'eucaliptus; aquests amplis òrgans han estat localitzats en les axil·les dels cotilèdons, o menys comunament, en les axil·les d'un o més parells de les primeres fulles (Carrodus i Blake, 1970). A partir de les gemmes latents del lignotúber es pot desenvolupar un nou arbre després que s'hagi provocat alguna lesió en el primer. En varies espècies d'eucaliptus es fa referència a l'anatomia del lignotúber (Carrodus i Blake, 1970; Bamber i Mulette, 1978; Carr i col. 1984) i en alguns arbusts del matoll Xilè (Montenegro i col. 1983). Els lignotúbers es caracteritzen per tenir: el sistema vascular anatòmicament semblant al d'una tija, el midó abundant, suggerint

una important funció de reserva (Bamber i Mulette, 1978), i gemmes acumulades. El nus cotiledonar s'ha associat d'una banda, amb la formació del lignotúber en alguns eucaliptus (Chattaway, 1958; Carr i col. 1982; Carter i Pantou, 1985) i amb el desenvolupament dels nòduls ("burl") en *Betula populifolia* (Stone i Cornwell, 1968). Però fins el moment, no s'ha realitzat cap descripció detallada de l'ontogenia d'aquestes estructures.

Els objectius d'aquest treball són: identificar l'origen de les tiges laterals i determinar com es forma el lignotúber en l'alzina surera. Per aquest motiu ens proposem, d'una banda, descriure les diferents fases de la maduració de l'embrió de l'alzina surera i determinar la fase de desenvolupament en què apareixen les gemmes cotiledonars i, de l'altra analitzar el destí d'aquestes gemmes embrionaries i estudiar l'anatomia del lignotúber en les plàntules. Per tal d'aconseguir els objectius proposats, remarquem que, en aquest treball, les característiques anatòmiques i embriològiques han estat descrites en relació a la capacitat de regeneració de la surera.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL BIOLÒGIC

Procedència de les glans

Les glans de *Quercus suber* L. s'han obtingut d'exemplars madurs d'alzines sureres procedents de suredes de les comarques gironines, com les ubicades en el massís de Montseny-Guilleries i principalment, en les Gavarres, per la seva proximitat física amb el centre d'estudi (Laboratori del suro, Universitat de Girona) (Vilar i col. 1992).

Recol·lecció de les glans

S'han descrit tres pics de maduració de glans: un a finals d'estiu, glans primerenques; un altre a la tardor, glans martinenques; i un altre pels voltants de Nadal, glans tardanes, essent la segona generació de glans la més abundant. Per realitzar aquest treball s'han recol·lectat glans martinenques que maduren entre novembre i desembre.

El tamany de les glans és molt variable. La seva llargada pot oscil·lar entre 20 i 45mm, el seu diàmetre entre 10 i 18mm i el seu pes entre 5 i 10g, per aquest motiu i per facilitar la posterior extracció i manipulació de l'embrió, s'han escollit alzines sureres que produïssin glans de tamany entre 35 i 45mm de llargada, 13 i 18mm de diàmetre i de pes aproximat entre 7 i 10 g.

Per obtenir l'embrió en les diferents fases de maduració, s'han recol·lectat glans periòdicament, des de l'inici de l'estiu fins a mitjans de l'hivern, durant els anys compresos entre el 1988 i 1992. La recol·lecció ha estat manual i arreu, tan sols s'han rebutjat aquelles que presentaven alguna alteració física visible. Les glans immadures de color verd s'han abastat directament de l'arbre, i les madures de tonalitat castany vermellosa, del sòl.

Conservació de les glans en el laboratori

Amb la finalitat de mantenir un estoc de glans viables durant tot l'any en el laboratori, s'han realitzat diferents proves de conservació, basades en la variació de la temperatura i humitat. Les proves que s'han realitzat han estat:

- a) En una cambra frigorífica a 4°C i en sec.
- b) En una cambra frigorífica a 4°C i amb humitat elevada.
- c) Amb sorra i a temperatura ambient.
- d) Amb sorra i a 4°C.
- e) Amb una saca airejada i a temperatura ambient.

Els resultats òptims els hem obtingut amb les condicions de l'assaig b, en una cambra frigorífica a 4°C i amb humitat elevada; en les condicions restants, la majoria de llavors s'assecaven i l'embrió no germinava. L'inconvenient, però, que presenta el mètode utilitzat és que les glans germinen i, per tant, se n'han d'emmagatzemar moltes per tenir-ne en les condicions desitjades.

Obtenció de plàntules

Les plàntules s'han obtingut de cultivar les glans en el mateix laboratori; solament les plàntules de més d'un any d'edat (± 4 anys), han estat cedides per l'Escola Forestal de Sta. Coloma de Farners (Girona).

Per obtenir les plàntules destinades a estudiar la taxa de creixement de la part hipogea, s'han fet germinar glans en recipients de forma cilíndrica i amb obertura lateral, construïts especialment per facilitar l'extracció de la plàntula sense malmetre els teixits de la part hipogea (Là.m.I-1).

Les plàntules destinades a l'estudi microscopi s'han obtingut sembrant les glans en testos de plàstic de 30cm de profunditat i 20cm de diàmetre.

En ambdós casos, les glans s'han plantat horitzontals respecte la línia del sòl i superficials (Là.m.I-2). El substrate utilitzat ha estat una barreja de turba i vermiculita en proporció 3 a 1. Les plàntules s'han mantingut sempre en l'interior a una temperatura mínima de 15°C i màxima de 23°C, i amb condicions controlades de humitat: els mesos de primavera i estiu s'han regat una vegada a la setmana, i els mesos de tardor i hivern una vegada cada quinze o vint i un dies.

MÈTODES

Mètode per estudiar la taxa de creixement de la part hipogea de les plàntules.

El mètode utilitzat es basa en l'experiència que va dur a terme, ja en el segle passat, Julius Sachs (Bonner i Galston, 1973), que consisteix en realitzar amb una substància no tòxica, tinta xina per ex., vàries marques equidistants en un teixit, arrel, tija, fulla... i observar després d'un temps la seva separació.

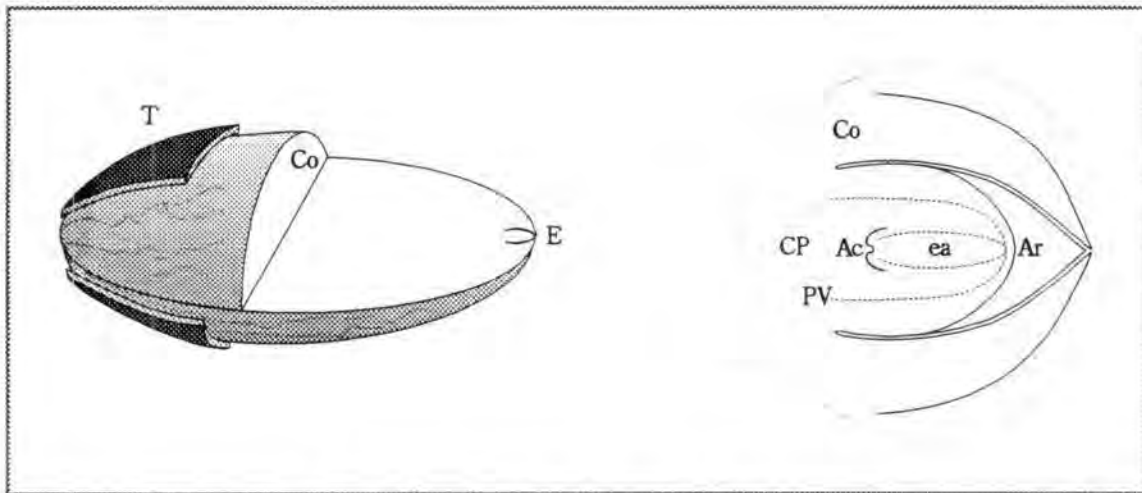
En aquest treball, les marques s'han realitzat amb làtex negre, no tòxic per teixits vegetals ni animals. El marcatge s'inicia després de la germinació, quan el teixit emergent de la plàntula mesura aproximadament 1cm. En aquesta fase es fa una marca que divideix el teixit emergent en dues parts: de la gla fins a la marca i de la marca fins a l'àpex. El dia següent es mesuren les distàncies, i en el cas que siguin superiors a 10mm es fa una nova marca. El procés es repeteix periòdicament durant uns vint i cinc dies. Vàries plàntules es fan créixer com a control per determinar si la seva manipulació influeix en el creixement, aquestes plàntules es mesuren al final de l'experiència.

Processat de les mostres per ser observades al microscopi òptic (MO).

Per a l'observació dels talls s'ha emprat la tècnica d'inclusió en glicol metacrilat, material que permet obtenir seccions semifines de peces relativament grans sense necessitat d'emprar mitjans molt sofisticats.

Obtenció de les mostres:

Embrions: Per obtenir l'embrió es dissectiona la gla de la següent manera: es treu la coberta de la gla amb un ganivet, es parteixen els cotilèdons per la meitat, en sentit transversal, guardant la part que conté l'embrió i, finalment, ajudant-nos d'un microscopi esteroscopi (Wild-Stereoscan) i un bisturí, es separen els peciols cotiledonars dels cotilèdons, quedant l'embrió lliure. Tot seguit, s'introdueix l'embrió en la solució fixadora per evitar la ràpida oxidació dels teixits (Esq.2).



Esq. 2. Esquema de les diferents parts d'una gla madura i de l'embrió. Ac, àpex caulinar; Ar, àpex radicular; Co, cotilèdon; CP, peciòl cotiledonar; E, embrió; ea, eix embrionari; PV, feixos vasculars; T, testa.

Plàntules: Les mostres s'han obtingut tallant, amb un bisturí o fulla d'afaitar, petits fragments de teixit de 3mm³ aproximadament de la zona a estudiar. Aquests seguidament s'han introduït en la solució fixadora.

Fixació: Les mostres s'han fixat amb formol al 10% tamponat amb CaCO₃ pH7. Les mostres s'han mantingut en la solució fixadora un mínim de 24 hores.

Deshidratació: Les mostres s'han deshidratat segons el protocol següent:

Procediment: 1-Alcohol isopropílic 70% (mínim 4h). 2-Alcohol isopropílic 80% (mínim 12h). 3-Alcohol isopropílic 96% (3 canvis de 1h). 4-Alcohol isopropílic 100% (4 canvis de 1/2h). 5-2/3 Isopropílic + 1/3 Butanol (mínim 12h). 6-1/2 Isopropílic + 1/2 Butanol (2 canvis de 1h). 7-Butanol 100% (2 canvis de 1/2h).

L'intercanvi de gasos i líquids en els teixits vegetals és problemàtic, degut a l'aire atrapat en els espais intercel·lulars, per facilitar la penetració de les diferents solucions i així afavorir l'imbibició en glicol metacrilat, la fixació i els primers passos de la deshidratació (1, 2 i 3), s'han realitzat sota una campana de buit i amb temps més llargs.

Inclusió en glicol metacrilat (GMA): La utilització histològica del GMA requereix la imbibició dels teixits pel monòmer 2-hidroxietil metacrilat o glicol metacrilat i la posterior polimerització per formar els blocs.

La inclusió en GMA es pot fer per polimerització dels plàstics a l'estufa a 60° C o bé per polimerització en fred. En aquest treball, les mostres han estat incloses en GMA pel mètode d'inclusió per polimeració en fred ja que és molt ràpida i permet aplicar el mètode per a estudis histoquímics (Bonet i Molinas, 1983).

Inclusió per polimerització en fred:

Solucions:

Solució infiltradora

-2-hidroxietil metacrilat (monomer),
80ml

-2-butoxietanol (regulador), 8ml

-benzoil peròxid (polimeritzador), 0'5g

Solució promotora

-polietilen glicol (pastificant), 8'0ml

-N-Ndimetil anilina (accelerador),

1,0ml

(Amdues solucions poden conservar-se durant uns mesos a la nevera).

Procediment:

- 1-Transferir les peces a la solució infiltradora. Dos canvis de 12h són suficients.
- 2-Barrejar acuradament la solució infiltradora amb la promotora en proporció 42:1, realitzant l'operació en un bany de gel, de tal manera que, encara que la reacció sigui fortament exotèrmica, no se sobrepassin els 20°C. La proporció pot oscil·lar entre 50:1 (blocs més durs i polimerització més lenta) i 50:1,5 (blocs més tous i polimerització més ràpida).
- 3-Transferir les mostres a la solució anterior per a la realització dels blocs.
Convé evitar el contacte de l'oxigen que inhibeix la correcta polimerització, per això s'utilitzen càpsules tipus "Ependorff" tapades.
- 4-Col·locar els motlles al refrigerador (4°C). La polimerització comença al cap de dues hores i pot donar-se per acabada tres hores més tard.

Microtomia: Els talls de 2 a 5µm s'obtenen amb un micròtom 1150- Autocut Reichert-Jung.

Tinció: En les seccions procedents de blocs de GMA no s'ha de retirar el plàstic ja que la seva hidrofília permet aplicar la coloració directament sense necessitat de desplastificar ni rehidratar. El plàstic pot quedar tenyit dèbilment amb algun

dels colorants, però aquest fet no interfereix en l'observació. L'aplicació de les tècniques de coloració requereix una adaptació per a aquest medi d'inclusió.

Generals i metacromàtiques:

-Blau de toluïdina: Reactius: blau de toluïdina (C.I.No 52040) (Bonet i Huguet, 1985) al 1% en H₂O amb tetraborat sòdic al 1% i, enrasat amb H₂O a 100cc.

Procediment: 1-Tenyir amb blau de toluïdina durant 10-20segons sota la flama, evitant l'emissió de vapors. 2-Rentar amb H₂O de 2 a 3 minuts. Diversos passos seran necessaris per retirar l'excés de colorant retingut pel plàstic. 3-Assecar i muntar.

Resultats: nucli blau intens; citoplasma blau-verdós; lignina verda; cel.lulosa blava; àcids pèctics vermell.

-Tionina: Reactius: tionina (C.I.No 52000) 0'1% amb H₂O.

Procediment: 1-Tenyir amb tionina 30 seg. 2-Rentar amb H₂O a pH 2 de 2 a 3 minuts. 3-Rentar amb H₂O de 2 a 3 minuts. 4-Assecar i muntar.

Resultats: nucli rosat-lilòs; nucleol blau intens; cromosomes blaus intens; citoplasma rosat-blavòs; parets cel.lulars blau-rosat; tanins blau intens.

Histoquímiques:

-PA.Schiff: Reactius: reactiu de Schiff (Merck, 9033); àcid periòdic 1% en H₂O amb una gota d'àcid nítric (HNO₃).

Procediment: 1-Oxidar amb àcid periòdic durant 15minuts. 2-Rentar amb H₂Oc durant 10 minuts. 3-Tractar amb reactiu de Schiff durant 15 minuts. 4-Rentar amb H₂O durant 10segons.

Resultats: polisacàrids vermell.

Observació i fotografia: Les observacions s'han fet en un fotomicroscopi Vanox (Olimpus) equipat amb epifluorescència. Per a la fotografia, s'ha utilitzat, per un costat, un filtre LBD i pel.lícula Ektacrome 100 ASA per a les diapositives en color i, per l'altre, un filtre verd IF 550 i pel.lícula Kodak T MAX 100 ASA per a la fotografia en blanc i negre.

Processat de les mostres per ser observades al microscopi electrònic d'escànnning (SEM)

Fixació: Per a la seva observació en microscòpia electrònica d'escànnning (MES), les mostres s'han fixat directament amb formol al 10% tamponat amb CaCO₃ pH 7 durant un mínim de 3 a 4 hores.

Deshidratació: S'ha procedit a la deshidratació per mitjà d'una sèrie etílica i s'ha portat a acetat d'amil.

Procediment: 1- Etanol 50% (3 canvis de 2h). 2- Etanol 70% (3 canvis de 2h). 3- Etanol 90% (2 canvis de 30min). 4- Etanol 96% (2 canvis de 30min). 5- Etanol absolut (3 canvis en 15min). 6- Etanol absolut-acetat d'amil (3:1) (10 min). 7- Etanol absolut-acetat d'amil (1:1) (10 min). 8- Etanol absolut-acetat d'amil (1:3) (10 min). 9- Acetat d'amil (3 canvis en 15 min).

Tota la deshidratació s'ha realitzat sota una campana de buit, en un buit enèrgic.

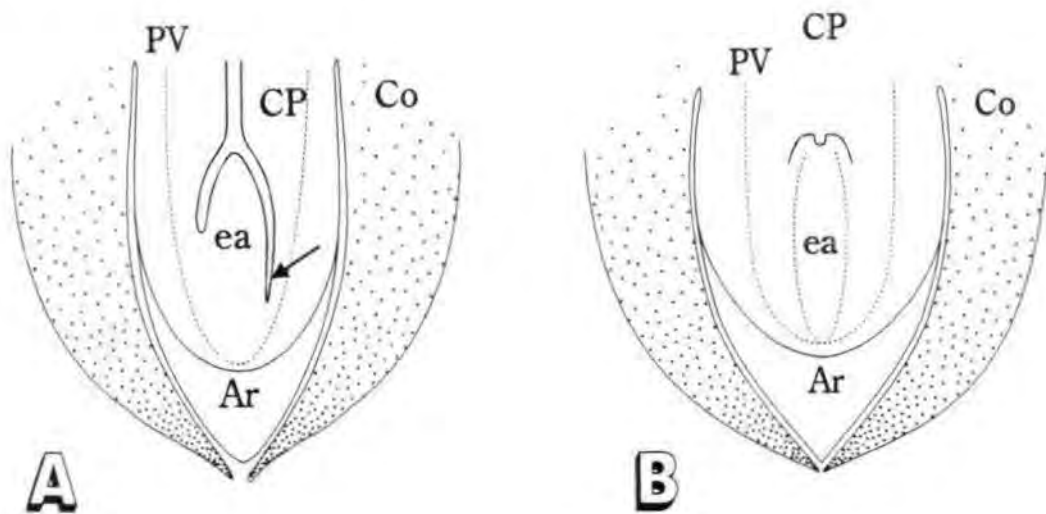
Assecament per punt crític i recobriment: Les mostres s'han assecat en un assecador de punt crític Polaron E-3000 utilitzant acetat d'amil com a líquid de transferència i anhídrid carbònic com a líquid de transició. S'han recobert amb un diode d'"sputtering" Polaron E-5000 formant un recobriment de ca. 400Å de gruix. Han estat montades en plaques de plata coloidal.

Observació i fotografia: Les observacions s'han fet en un microscopi Jeol 840 i un Cambridge Stereoscan S120 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Terminologia utilitzada:

Utilitzem la terminologia proposada per Groff i Kaplan (1988) d'arrel primària per descriure l'arrel formada a partir del meristem radicular de l'embrió, i tija primària a partir del meristem caulinar de l'embrió. Les gemmes formades sobre l'eix embrionari les anomenarem gemmes laterals en comptes de gemmes adventícies o secundàries; i les arrels formades igualment sobre l'eix embrionari o sobre altres arrels, les anomenarem també, arrels laterals en comptes d'adventícies o secundàries (Groff i Kaplan, 1988).

Segons Hayden (1988) es defineixen dos plans: d'una banda, el pla cotiledonar, pla longitudinal que passa pel mig dels cotilèdons; de l'altra, el pla intercotiledonar, pla longitudinal situat en angle recte al pla cotiledonar i que passa a través de l'eix de la plàntula entre els dos cotilèdons.



Esq.5- A) Embrió tallat longitudinalment pel pla cotiledonar. B) Embrió tallat longitudinalment pel pla intercotiledonar. Ar, àpex radicular; Co, cotilèdon; CP, peciòl cotiledonar; E, embrió; ea, eix embrionari; PV, feixos vasculars.

RESULTATS

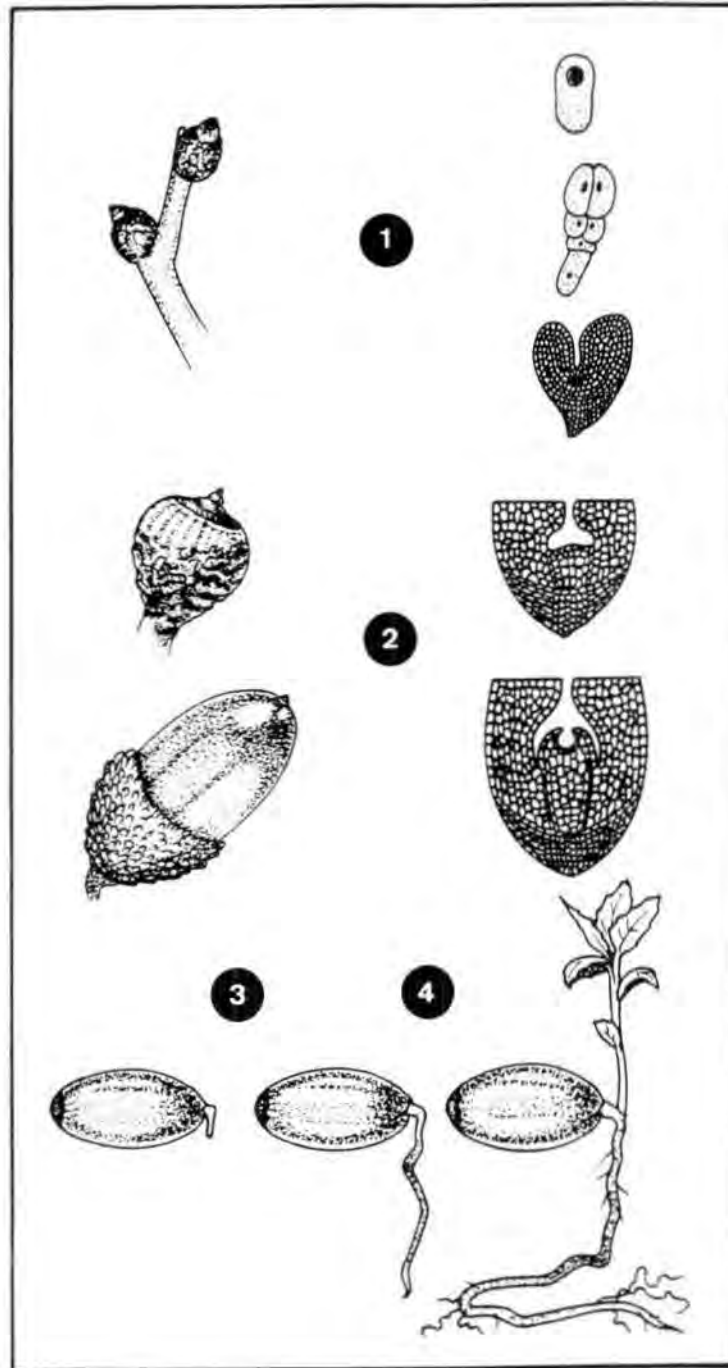
EMBRIÓ: FASE DE MADURACIÓ

En les plàntules de la surera, la regió de transició tija-arrel és relativament gruixuda i en ella s'observen varis grups de gemmes laterals i arrels laterals (Làm.II-1). Les gemmes es localitzen en dues sèries al llarg del pla cotiledonar (Làm.II-2) i actuen com a un òrgan de regeneració. Després de tallar repetidament els rebrots, les gemmes localitzades amb més profunditat en el sòl s'activen progressivament (Molinas i Verdaguer, resultats no publicats). La presència d'estructures lignotuberoses en les plàntules suggereix una estructura anatòmicament especialitzada originada a partir de la regió cotiledonar. Per verificar-ho s'han examinat varis embrions de glans en diferents fases de maduració.

Les fases de l'embrió i del desenvolupament de la plàntula en la surera estan assenyalades en l'Esquema 2. L'embrió és típicament bipolar i té simetria dorsiventral en relació als cotilèdons.

L'Esquema 3, mostra els canvis que tenen lloc durant la fase de maduració. Al principi de la maduració l'eix de l'embrió consisteix en un meristema apical caulinar pla i un eix curt amb l'apex radicular. Durant la fase de maduració, la superfície apical de l'epicòtil canvia i passa de ser plana a tenir forma de dom; l'eix embrionari s'allarga per creixement difús fins a una longitud aproximada de 2-3mm, mentre que el meristema radicular roman inactiu (Làm.III-2-4). El meristema apical caulinar forma els dos primers primordis foliars que apareixen en posició decussada als cotilèdons (Làm.IV-1-5); després, dos primordis foliars comencen a arquejar-se sobre l'apex (Làm.IV-6). Al finalitzar l'embriogènesi (Làm.IV-7) l'apex caulinar mostra de 2 a 4 primordis foliars.

Els feixos cotiledonars maduren abans que la diferenciació es doni en l'eix embrionari. En els cotilèdons, la diferenciació vascular produeix feixos colaterals en els quals la maduració dels elements traqueals apenes precedeix la del floema. En el pol radicular de l'eix embrionari, el teixit provascular forma un cilindre sòlid (Làm.V-1), en el que la part superior perd la seva compacticitat



Esq. 2- Etapes en el desenvolupament de l'embrió i la plàntula de l'alzina surera: 1) embriogènesi, 2) fase de maduració de l'embrió, 3) germinació i 4) inici del creixement de la plàntula.

(Làm.V-2-6), i eventualment es divideix en sis cordons provasculars: dos feixos cotiledonars medians i quatre laterals (Làm.V-4). Els feixos cotiledonars medians romanen en el pla cotiledonar i no es ramifiquen. Els feixos laterals s'originen de dos cordons situats en el pla intercotiledonar. Cada cordó lateral es ramifica dos vegades per produir quatre feixos procambials a nivell de l'epicòtil (Làm.V-5-6).

En l'embrió de la surera el teixit cotiledonar es troba fusionat a l'eix embrionari. Com a resultat, l'eix embrionari pot ser dividit en dues porcions: una porció apical visible entre els peciols cotiledonars per sobre el punt superior d'inserció dels cotilèdons, i una porció inferior en la qual el teixit de l'eix embrionari roman amagat pel teixit cotiledonar fusionat.

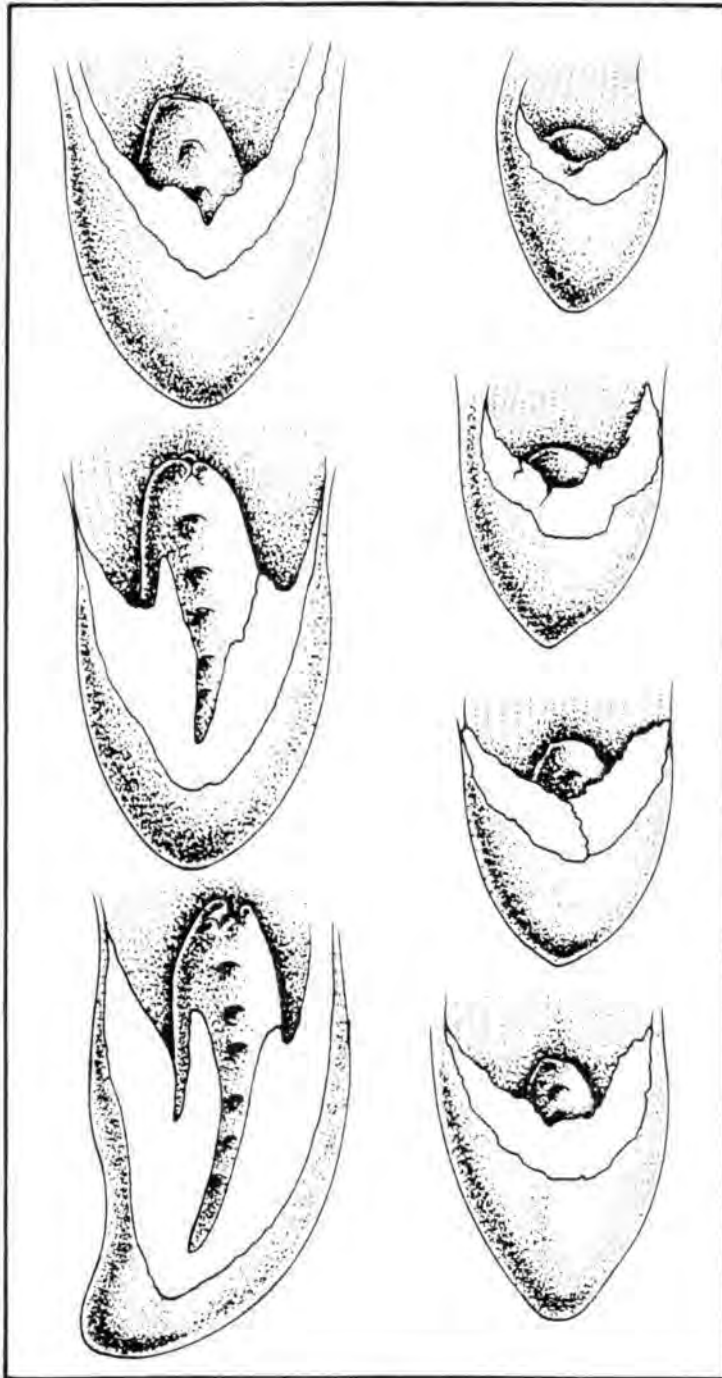
Només en les seccions a través dels pla cotiledonar és possible observar una franja contínua de teixit epidèrmic que s'exten al llarg de tota la longitud de l'eix, des del dom apical fins el punt inferior d'inserció dels cotilèdons (Làm.III-4).

Les figures de la Là.m.V-1-7, corresponen a seccions transversals a diferents nivells d'un embrió madur en el que és possible distingir l'epidermis sense fusionar dins el teixit cotiledonar (Làm.V-3-5).

Desenvolupament de les gemmes cotiledonars

Les gemmes laterals es fan visibles aproximadament per primera vegada a la meitat de la maduració de l'embrió, i quan grups de cèl.lules indiferenciades, lleugerament més denses, es fan evidents en una ràpida, parella successió (Làm.III-4). Els primordis de les gemmes es situen en el pla cotiledonar, en el pla axil.lar als cotilèdons (Làm.VI-1,2). El nombre de parells de gemmes sol ser de 5 a 7.

Les gemmes laterals es formen exògenament a partir de meristemes superficials. La seqüència ontogenètica de les successives gemmes laterals segueix un curs basipètal des de l'eix cotiledonar (Là.ms.VI-1 i 2, Là.m.VII-1). Vàries capes de cèl.lules estan involucrades en la formació de les gemmes laterals. Les divisions anticlinals es donen en les capes més externes, marcant una zona limitant ("shell-zone") (Làm.VI-3). Aleshores tenen lloc divisions periclinals i anticlinals en la segona i tercera capa, i progressivament, el meristema es va organitzant per formar un meristema apical (Làm.VI-4). La diferenciació de la zona limitant involucra l'elongació, vacuolització, i l'increment en el nombre de divisions cel.lulars del meristema perifèric adaxial



Esq. 3- Diagrama de les fases de maduració de l'embrió de l'alzina surera. A mesura que l'embrió esdevé madur, de dos a quatre primordis foliars es formen sobre l'epicòtil amb forma de dom pla, i s'observen de 6 a 7 parells de gemmes laterals en la superfície axil·lar de l'eix de l'embrió.

a la gemma. Aquest procés de diferenciació condueix a la formació d'un teixit arquejat de tipus cambial que delimita el meristema de la gemma de les cèl.lules del voltant (Làm.VI-3). La diferenciació de la zona limitant progressa a partir de cèl.lules situades a la base de la gemma. Les cèl.lules aparentment cambials de la zona limitant connecten amb els feixos provasculars de l'eix embrionari.

Quan el meristema de la gemma sobresurt, es fa externament visible sobre la superfície axil.lar de l'embrió i el seu desenvolupament pot ser seguit per microscòpia electrònica d'escànnig: primer s'observa una protrusió foliar (Làms.VII-2,3) i posteriorment es forma un primordi (Làms.VII-4,5) on la protuberància corresponent a la primera estípula es fa visible. En l'embrió madur, són visibles de dos a tres parells de gemmes en la part apical lliure de l'eix embrionari per sobre la part superior del punt d'inserció cotiledonar, mentre que la resta es troba amagada pel teixit cotiledonar fusionat. El desenvolupament de les gemmes laterals no progressa més fins a la germinació (Làm.VII-5). Quan la fase de maduració de l'embrió finalitza, el meristema apical de les gemmes laterals està cobert per un primordi foliar arrodonit que protegeix el meristema apical.

GERMINACIÓ I FASE COTILEDONAR

En un substrate adequat, les glans germinen ràpidament i l'eix cotiledonar s'elonga conduint la radícula fora de la llavor. En un inici, la protrusió de la radícula es produeix quan el conjunt que formen l'embrió i els pecíols cotiledonars s'ha allargat entre 1 i 2mm. L'augment longitudinal provoca tensions en els teixits de la coberta que acaben cedint, permetent així, el pas de la radícula. Seguidament s'observa un intens creixement intercalar dels pecíols cotiledonars passant d'un valor de 5-16mm de longitud, a l'inici de la germinació a 8-21mm, al cap de 24 hores. L'elongació dels pecíols provoca l'arrossegament de l'embrió cap a l'exterior. Com a conseqüència de l'elongació i encorbament dels pecíols cotiledonars, la punta de la radícula penetra en el sòl. Els cotilèdons es mantenen en l'interior de la gla. Durant les primeres 24 hores després de la germinació, l'embrió no augmenta pràcticament de longitud en comparació als pecíols cotiledonars, ara bé, durant aquest període continua el desenvolupament morfològic amb l'acumulació de primordis foliars i l'augment del nombre de tricomes. A partir del tercer dia, la zona de creixement no es localitza en els pecíols cotiledonars, sino en l'embrió com a resultat del creixement intercalar difús del nus cotiledonar. En la surera, el nus cotiledonar

es pot dividir en dues porcions: una porció superior en la qual l'eix embrionari és lliure entre els pecíols cotiledonars, i una porció inferior en la qual el teixit cotiledonar està fusionat amb l'eix embrionari (Làm.VIII-1). De quinze a vint dies després, els pecíols es separen i el brot esdevé visible (Làm.VIII-2). La regió fusionada cotiledonar s'elonga de 8 a 10cm i, en aquest sentit, l'eix de la plàntula, creix progressivament cap l'interior del sòl, mentre l'àpex radicular està encara pràcticament no funcional. Uns 20 dies després de la germinació, quan les plàntules mesuren de 15 a 20cm, la primera arrel es comença a elongar.

En la fase cotiledonar, es distingeixen, en la plàntula, tres regions: la porció no fusionada de l'epicòtil amb l'àpex caulinar en creixement; la porció cotiledonar fusionada ja elongada i la primera arrel en creixement (Làm.VIII-2,3). La zona no fusionada epicotiledonar es manté sense estendre's i el meristema apical caulinar comença a créixer, produint nous primordis foliars (Làm.VIII-1,3). L'àpex en creixement canvia de simetria dorsiventral a radial (Làm.IX-1,2) i el meristema apical forma nous primordis (Làm.IX-3). Quan els pecíols cotiledonars comencen a separar-se, el brot té de 4 a 7 primordis (Làm.IX-3). Els dos, tres primordis inferiors es desenvoluparan com a fulles protectores. En el brot el sistema vascular forma diferents feixos col.laterals en els quals la formació del protoxilema precedeix lleugerament a la del floema. El cambium vascular es forma molt aviat; poc després, tenen lloc divisions periclinals en unes poques capes de cèl.lules exteriors al floema, i s'inicia el desenvolupament del fellogen. Tant en la medul.la com en el parènquima cortical s'observen pocs grànuls de midó en la tija en creixement (Làm.X-1).

En aquesta fase cotiledonar, succeeixen varis canvis histològics en la porció inferior fusionada de l'eix embrionari. La diferenciació vascular s'inicia amb la formació de 8 a 11 pols de floema alternats amb pols de xilema, patró de vascularització que es correspon al patró de vascularització de l'arrel (Capítol II). Però, després, el metaxilema es diferencia internament adjacent al protofloema i el metafloema es diferencia externament adjacent al protoxilema, i el resultat és la formació de feixos col.laterals. Les cèl.lules en la porció central es diferencien formant una conspícua medul.la parenquimàtica amb gran quantitat de grànuls de midó (Làm.X-2). A mesura que continua el desenvolupament, hi ha una transició al creixement secundari: primer s'origina el cambium vascular, i quasi immediatament es forma el fellogen (Làm.X-2). El creixement en gruix és acompanyat per la formació d'arrels laterals. Les quals es formen endògenament per divisions periclinals de les

cèl·lules opostes al pols de protoxilema juntament amb algunes divisions de les cèl·lules endodèrmiques (Làm.XII-2-3) (Capítol II).

Durant la fase cotiledonar es desenvolupa la primera arrel (Capítol II). El sistema vascular de la primera arrel s'observa en la secció transversal (Làm.X-3), és poliarca, i consisteix en una mitja de 6-8 feixos vasculars alternants amb el mateix nombre de pols de floema. Sobre el temps en què es forma el càmbium vascular, tenen lloc divisions periclinals en la capa més externa del pericicle i es comença a formar el fel·logen; llavors es desenvolupa la peridermis. Una medul·la parenquimàtica relativament rica en midó és present.

Gemmes cotiledonars

Les gemmes situades en la porció no fusionada de l'eix embrionari es desenvolupen i formen curtes tiges orientades cap amunt. Aquestes gemmes estan cobertes per esquames laminars que desenvolupen tricomes marginals; les esquames s'assemblen a les del brot apical (Làm.XI-1-4).

Les gemmes situades en la porció fusionada de l'eix embrionari i amagades pel teixit cotiledonar són planes, estan comprimides contra l'eix i es troben orientades perpendicularment a aquest (Làm.XI-2-4, Là.m.XII-1). La naturalesa hipertrofiada de les esquames de les gemmes amagades i la disposició de les gemmes localitzades en l'eix es poden observar en les figures de la Là.m.XII-1-4. Les esquames que cobreixen l'apex de les gemmes amagades i són riques en tanins (Làm.XIII-3-4) i semblen tenir una funció protectora. Algunes de les gemmes localitzades en la porció fusionada es multipliquen per formar grups de gemmes (Làm.XII-4). La primera gemma s'incorpora dintre el teixit de l'escorça, i les altres gemmes es desenvolupen en les axil·les de les ja existents formant-se un grup connectat al xilema de l'eix principal de la planta.

Lignotúber en les plàntules

A mesura que continua el desenvolupament i la deferenciació, la regió cotiledonar que forma la zona de transició arrel-tija de la planta esdevé llenyosa, i presenta nombroses gemmes i grups de gemmes. Al final de la primera estació, algunes gemmes latents molt conspicues són visibles en la part inferior de la tija per sobre els cotilèdons. Aquestes, originades en la part superior de la porció no fusionada del nus cotiledonar, es situen normalment just per sota o en

la línia del sòl, i són les primeres de ser activades després de qualsevol accident que succeeixi en la part aèria de la planta (Làm.XIV-1). En canvi, en la porció fusionada del nus cotiledonar, que es localitza més profundament en el sòl, la majoria de gemmes formen petits grups i es desenvolupen arrels laterals (Làm.XIV-1,3). A continuació, els grups de gemmes formen petites plaques (Làm.XIV-1,2), consistents en agrupacions de gemmes latents, el teixit vascular de les quals roman connectat a l'eix principal de la planta. Anàlisis microscòpiques d'aquesta regió han mostrat que els radis medulars i el parènquima axial estan més desenvolupats i tenen més dipòsits de midó que els teixits adjacents de la tija i l'arrel.

LÀMINA I

Figures: 1 i 2

LÀMINA I

Sistemes de cultiu de glans de *Quercus suber*.

Fig. 1- Contenedor amb obertura lateral per facilitar la manipulació de la part hipogea de la plàntula.

Fig. 2- Cultiu de llavors en testos de plàstic per tal de obtenir plàntules en diferents estats de desenvolupament.



LÀMINA II

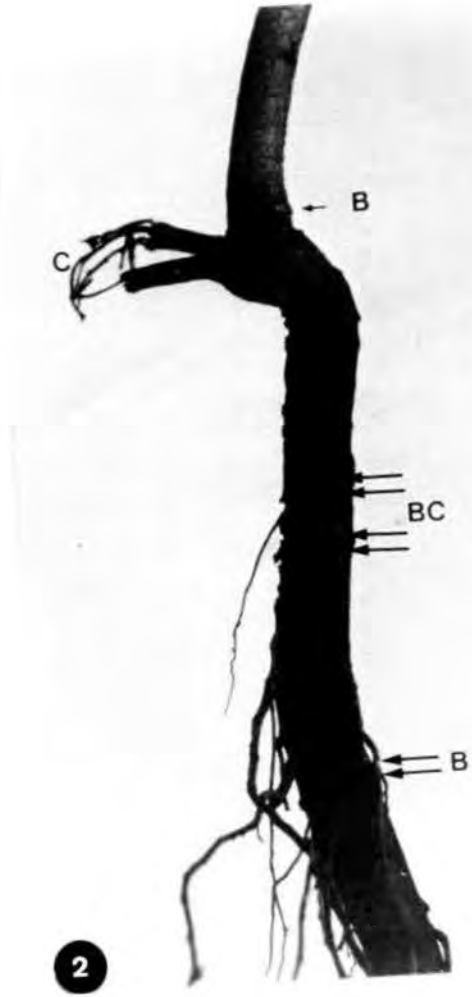
Figures: 1 i 2

LÀMINA II

Lignotúber en plàntules de *Quercus suber*.

Fig. 1- Plàntula de *Q.suber* de vuit mesos d'edat. Per sota dels cotilèdons, en la base de la tija, s'observa una zona més gruixuda d'uns 10-13cm que l'identifiquem com el lignotúber (fletxes). Aprox. X 1/3.

Fig. 2- Detall de la regió cotiledonar d'una plàntula de vuit mesos d'edat. Observi's la presència d'un parell de gemmes per sobre els cotilèdons (fletxa) i varis parells per sota els cotilèdons (dobles fletxes). Totes les gemmes estan disposades axil.larment als cotilèdons. X 1'5. B, gemma; BC, grup de gemmes; C, cotilèdons.



LÀMINA III

Figures: 1 a 4

LÀMINA III

Seccions longitudinals quasi medials d'embrions en diferents estats de maduració.

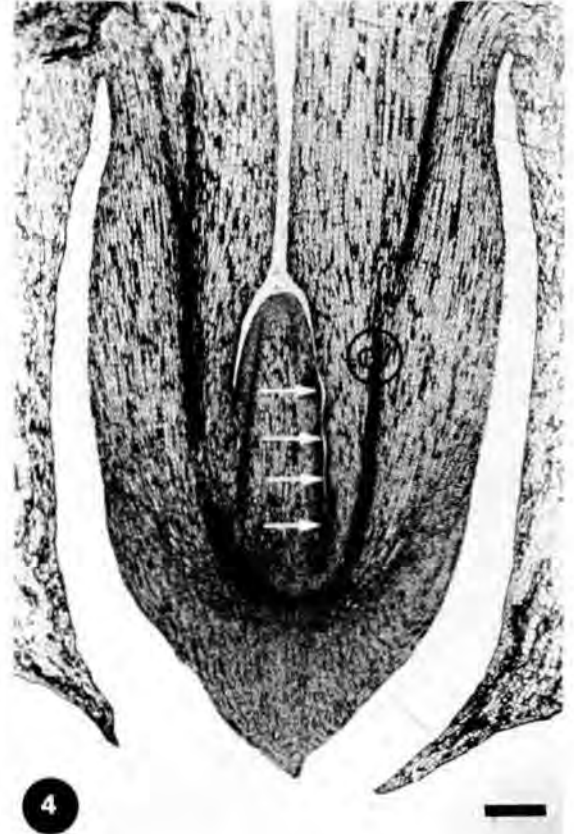
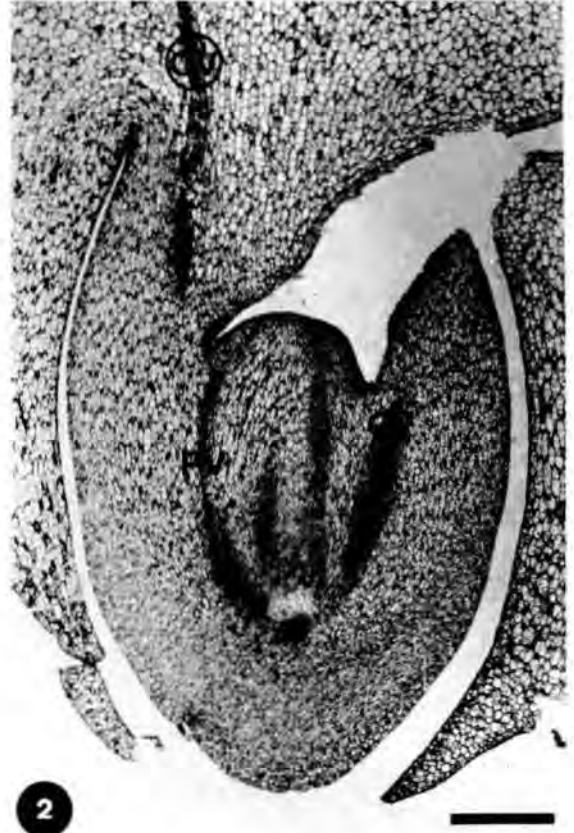
CV, feixos vasculars dels cotilèdons; P, primordi foliar; PV, teixit provascular. Barra= 300µm.

Fig.1.-Tall pròxim al pla intercotiledonar. Estat de l'embrió corresponent a l'inici de la maduració. El meristema caulinar és pràcticament una superfície llisa. El teixit provascular (PV) forma un cilindre buit connectant els dos meristemes apicals, el caulinar i el radicular. Tinció: PA-Schiff.

Fig.2.-Tall pròxim al pla intercotiledonar. Estat més avançat de la maduració de l'embrió. El meristema caulinar té forma de dom. Tinció: tionina.

Fig.3.-Tall pròxim al pla intercotiledonar. Estat intermig de la maduració de l'embrió. El primer primordi foliar s'observa arquejat sobre l'àpex. Tinció: tionina.

Fig.4.-Tall pròxim al pla cotiledonar. Embrió pràcticament madur. En l'eix embrionari s'observen gemmes laterals en desenvolupament. Les gemmes són visibles en el meristema perifèric de l'eix com un grup de cèl.lules més denses (fletxes). Tinció: tionina.



LÀMINA IV

Figures: 1 a 7

LÀMINA IV

Microfotografies al microscopi electrònic d'escànnig (MES), mostrant, durant la maduració, el desenvolupament del meristema apical caulinar en successives fases de creixement. Un dels cotilèdons ha estat extirpat per observar-se la superfície axil·lar de l'epicòtil. Barra= 100µm.

Fig.1.-Observi's l'àpex caulinar pràcticament pla.

Fig.2.-Estat més avançat en què s'observa un dom suau, lleugerament arquejat; noti's l'inici de la formació d'un primordi foliar en un dels laterals (fletxa); comença a evidenciar-se una gemma lateral (doble fletxa).

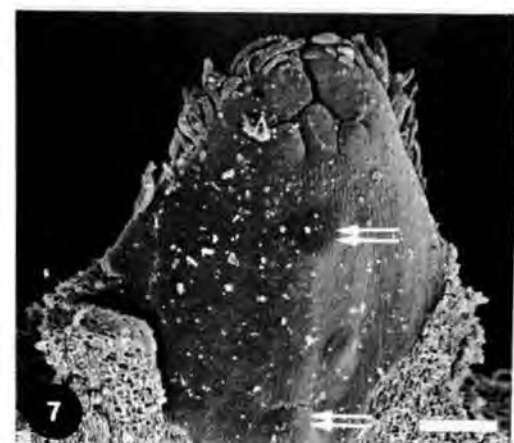
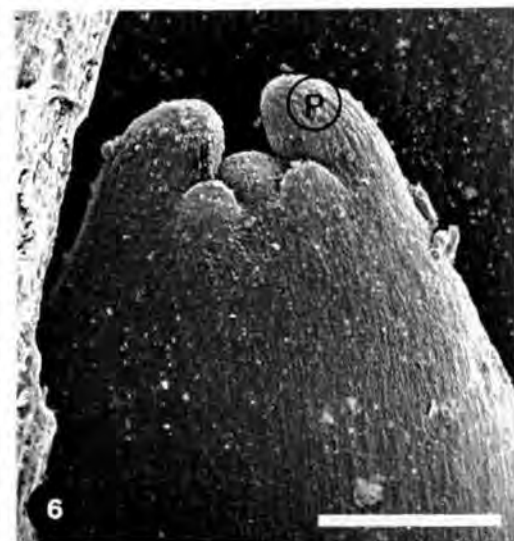
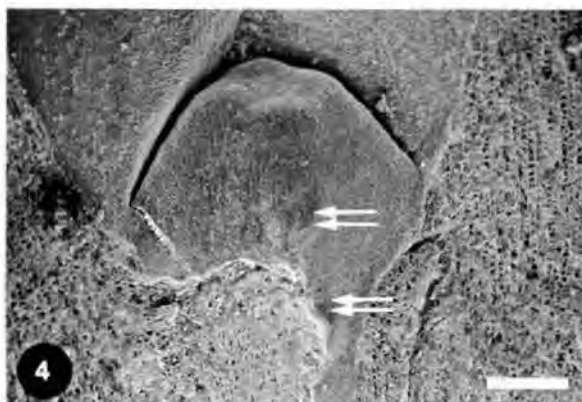
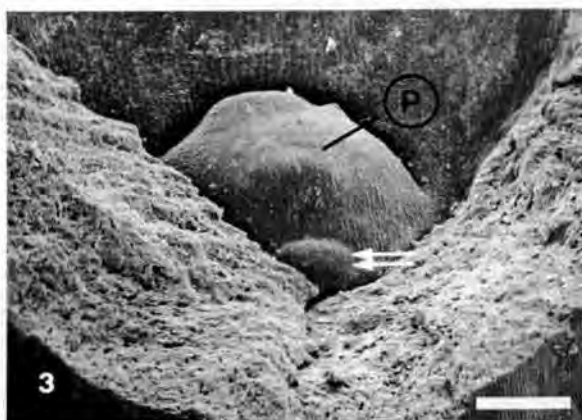
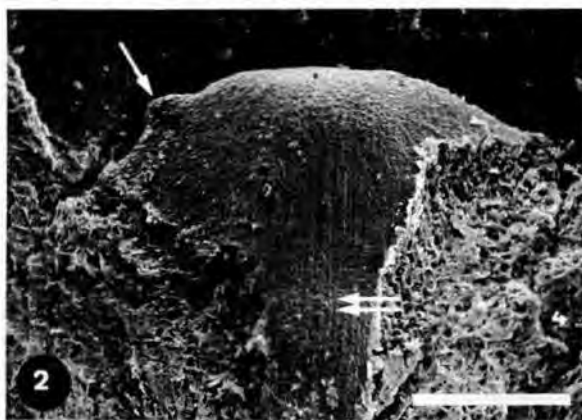
Fig.3.-Estat posterior, l'àpex caulinar pren una forma de dom una mica més pronunciat, on s'evidencia la formació d'un primordi foliar (P). Són visibles els primordis de les gemmes laterals.

Fig.4.-Estat més avançat en el qual s'observa un epicòtil en forma de dom molt acusat; s'hi distingeixen dos primordis foliars (doble fletxa).

Fig.5.-Epicòtil amb forma de con truncat. Noti's els tricomes (caps de fletxa) que s'observen en la superfície abaxial on es localitza el primordi foliar en desenvolupament (P).

Fig.6.-Meristema apical pràcticament madur. El primer parell de primordis foliars (P) s'observen arquejats sobre l'àpex.

Fig.7.-Meristema apical madur; quatre primordis foliars protegeixen l'àpex caulinar. Observi's el desenvolupament dels primordis de les gemmes laterals (dobles fletxes).



LÀMINA V

Figures: 1 a 7

LÀMINA V

Seccions transversals a diferents nivells en sentit basipètal.

EA, eix embrionari; LT, feixos cotiledonars laterals; MT, feixos cotiledonars medians; PV, teixit provascular; RC, caliptra. Barra=200µm.

Fig.1.-Secció pròxima al meristema radicular. Tinció: PA-Schiff.

Fig.2.-Secció en un nivell superior en la qual s'observa el cilindre provascular compacte. Tinció: PA-Schiff.

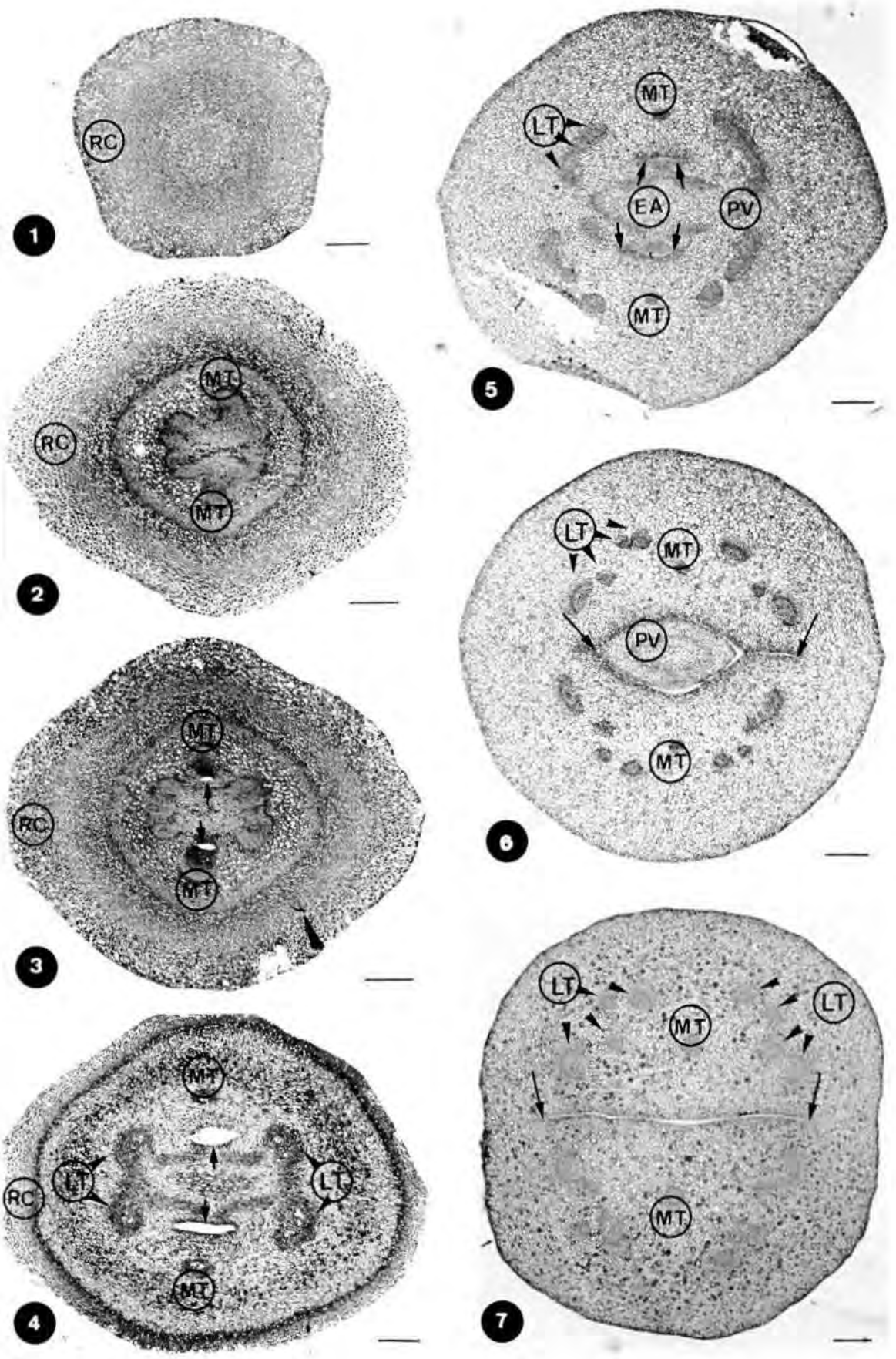
Fig.3.-Secció a uns 950µm de l'àpex. Els feixos cotiledonars medians s'originen en dues àrees adjacents al pla cotiledonar. L'epidermis no fusionada de la superfície axil·lar de l'eix embrionari comença a separar-se del teixit cotiledonar (fletxes).

Fig.4.-Secció a uns 1200µm de l'àpex. S'observen tres feixos per cotilèdon. Noti's l'epidermis en la superfície axil·lar no fusionada en l'eix embrionari (fletxes).

Fig.5.-Nivell posterior. Observi's en l'eix embrionari la continuïtat del cilindre vascular.

Fig.6.-Secció a través de la porció sense fusionar de la porció de l'eix embrionari. Cada cordó cotiledonar lateral es divideix en quatre feixos procambials.

Fig.7.-Secció per sobre l'epicòtil mostrant els feixos vasculars dels pecíols cotiledonars. Observi's els feixos medians cotiledonars en el pla cotiledonar (fletxa).



LÀMINA VI

Figures: 1 a 4

LÀMINA VI

Fotomicrografies mostrant l'inici de la formació de les gemmes laterals en la regió cotiledonar d'un embrió madur. Tinció: tionina.

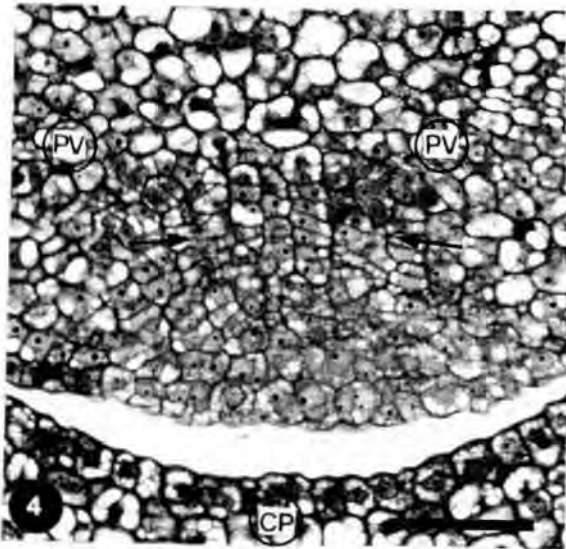
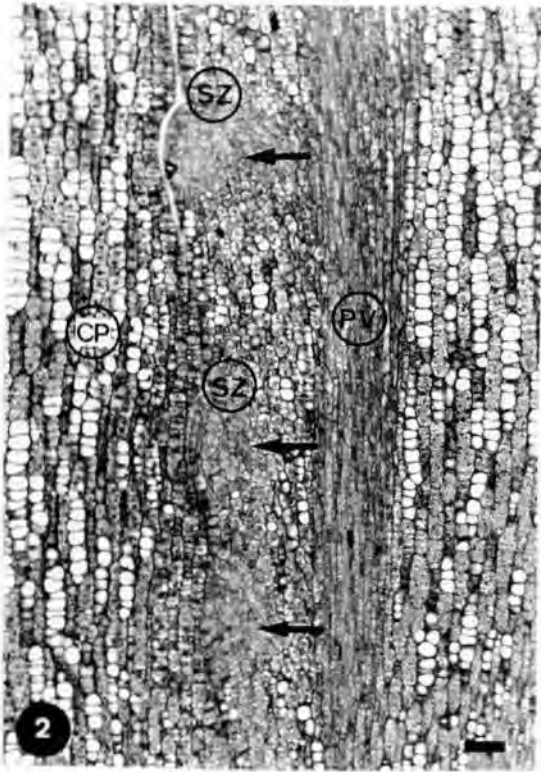
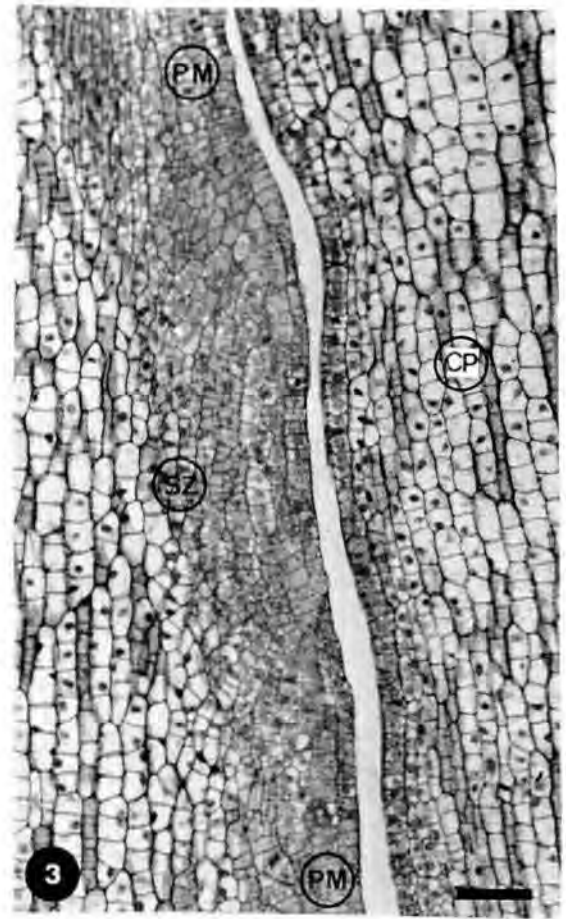
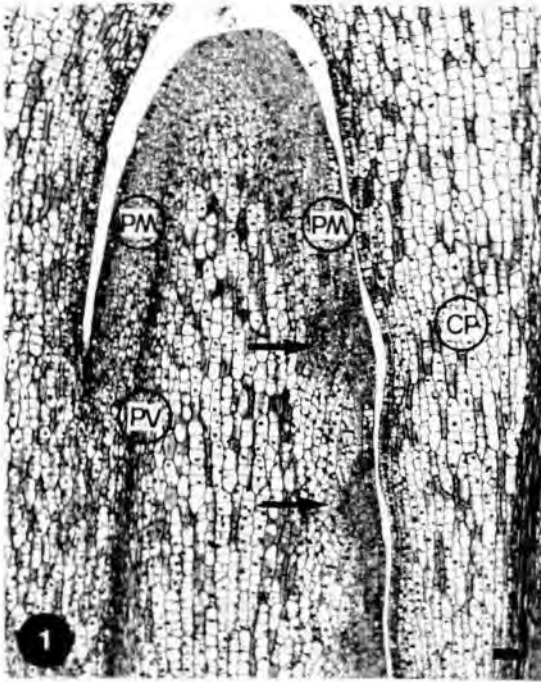
CP, pecíols cotiledonars; PM, meristema perifèric; PV, feixos vasculars; SZ, zona limitant. Barra=50µm.

Fig.1.-Secció longitudinal pròxima al pla cotiledonar i a través de l'eix embrionari. En aquesta secció s'observa l'inici de la formació de les gemmes laterals. Els primordis de les gemmes són visibles com a grups de cèl.lules més denses en el meristema perifèric (fletxes).

Fig.2.-Secció basal a través de l'eix embrionari i pròxima al pla cotiledonar. Observi's la seqüència de desenvolupament de les gemmes laterals basipetala (fletxes).

Fig.3.-Secció longitudinal pròxima al pla cotiledonar on s'observa, la zona limitant ("shell zone"), delimitant el meristema de la gemma. El pecíol cotiledonar s'observa a la dreta (P).

Fig.4.-Secció transversal d'un primordi d'una gemma lateral. Noti's que les cèl.lules de la zona limitant en contacte amb el procàmbium, es diferencien en cèl.lules connectores del procàmbium entre el meristema de la gemma i els feixos provasculars de l'eix embrionari (fletxes).



LÀMINA VII

Figures: 1 a 5

LÀMINA VII

Microfotografies al microscopi electrònic d'escànnig.
CT, teixit cotiledonar. Barra=50µm.

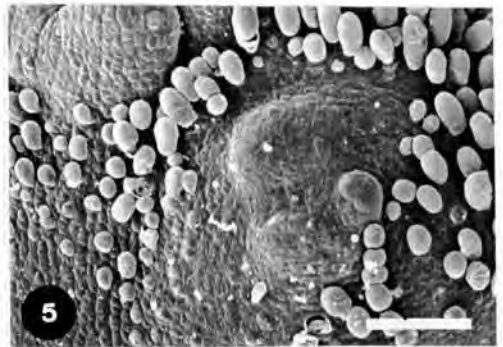
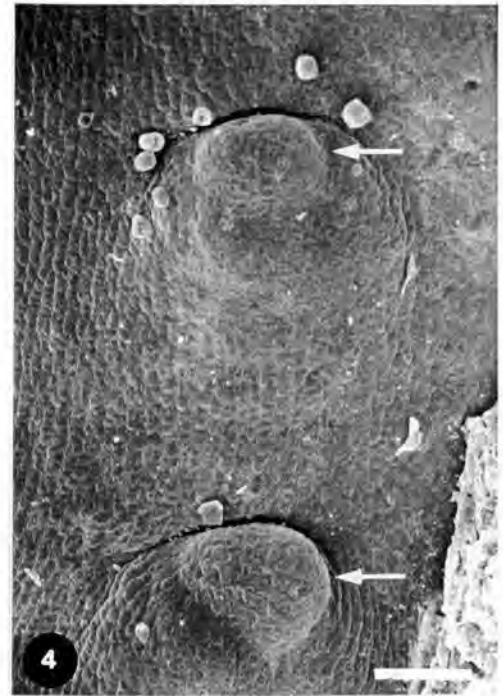
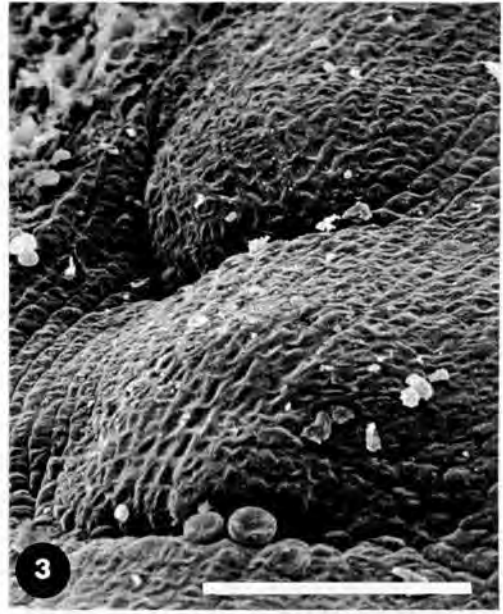
Fig.1.-Embrió madur en què s'observa la superfície axil·lar; en la zona de la porció apical de l'eix sense fusionar són visibles dos parells de gemmes, la resta de gemmes s'observen després d'haver extirpat el teixit cotiledonar. Noti's que la diferenciació de les gemmes laterals és basípeta.

Fig.2.-El primer signe extern de diferenciació és la formació d'un primordi foliar (fletxa).

Fig.3.-Detall de la fig. 2.

Fig.4.-A mesura que el primordi es desenvolupa es forma una protuberància arrodonida (fletxa).

Fig.5.-Grau màxim de maduració d'una gemma lateral abans de la germinació.



LÀMINA VIII

Figures: 1 a 3

LÀMINA VIII

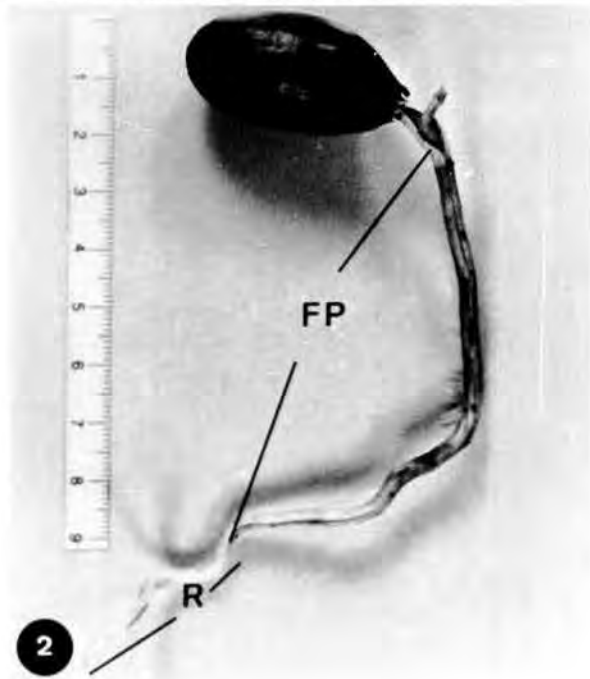
Plàntules de *Quercus suber*.

CP, pecíol cotiledonar; CT, teixit cotiledonar, B, gemma lateral; ES, superfície epidèrmica de l'eix embrionari; FP, porció fusionada del nus cotiledonar; R, arrel. Barra= 200µm

Fig.1.-Microfotografia al microscopi electrònic d'escànnning d'una plàntula de quinze dies. La porció superior sense fusionar de l'eix embrionari s'observa apresada entre els pecíols cotiledonars. Entre el teixit trencat dels pecíols cotiledonars s'observa la superfície epidèrmica de la porció fusionada de l'eix embrionari. Noti's la presència de gemmes laterals (fletxes).

Fig.2.- Plàntula d'uns 30 dies. L'àpex de l'embrió emergeix a través dels pecíols cotiledonars. La porció inferior fusionada del nus cotiledonar té una longitud d'uns 8 a 10cm, i la primera arrel està en desenvolupament. Els cotilèdons es mantenen en l'interior de la gla.

Fig.3.-Microfotografia electrònica d'escànnning d'una plàntula d'uns 25 dies, en la qual s'observa la porció sense fusionar i fusionada de l'eix embrionari. Noti's les gemmes axil.lars en la superfície de l'embrió. Una de les gemmes es localitza en el límit entre la porció fusionada i la porció sense fusionar (fletxa).



LÀMINA IX

Figures: 1 a 4

LÀMINA IX

Desenvolupament de l'epicòtil en plàntules.

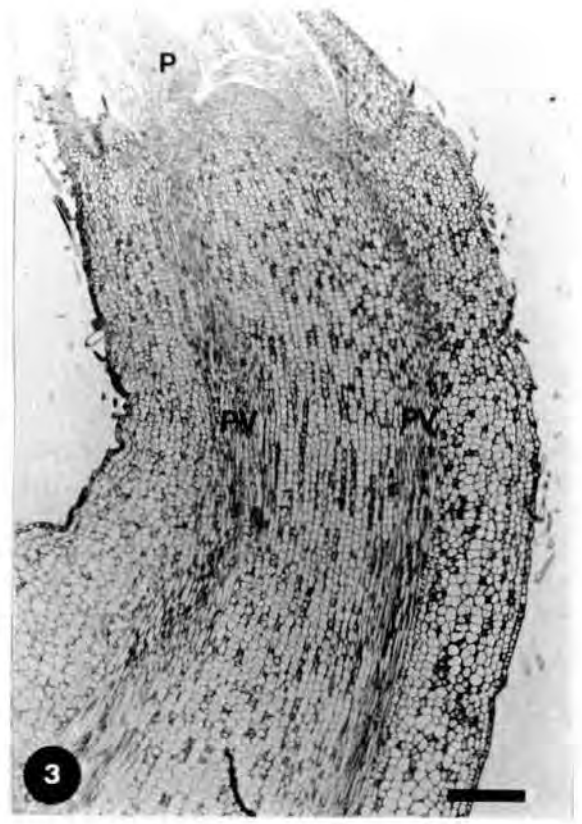
B, gemma lateral; LP, primordi foliar; PV, teixit provascular. Barra=200µm.

Fig.1.-Microfotografia electrònica d'escànnig de l'àpex caulinar d'una plàntula de quinze dies (detall de Làm.VIII-1). L'àpex caulinar mostra simetria dorsiventral.

Fig.2.-Microfotografia electrònica d'escànnig de l'àpex caulinar d'una plàntula d'uns 45 dies. La simetria de l'àpex caulinar esdevé radial. Noti's el desenvolupament de les esquames de les fulles amb abundants tricomes.

Fig.3.-Secció longitudinal quasi medial de l'epicòtil d'una plàntula de 15 dies, en la qual s'observa l'àpex caulinar i el desenvolupament dels primordis. Tinció: PA-Schiff.

Fig.4.-Secció obliqua de l'epicòtil d'una plàntula de 15 dies en què s'observa una gemma lateral en la base. Tinció: PA-Schiff.



LÀMINA X

Figures: 1 a 3

LÀMINA X

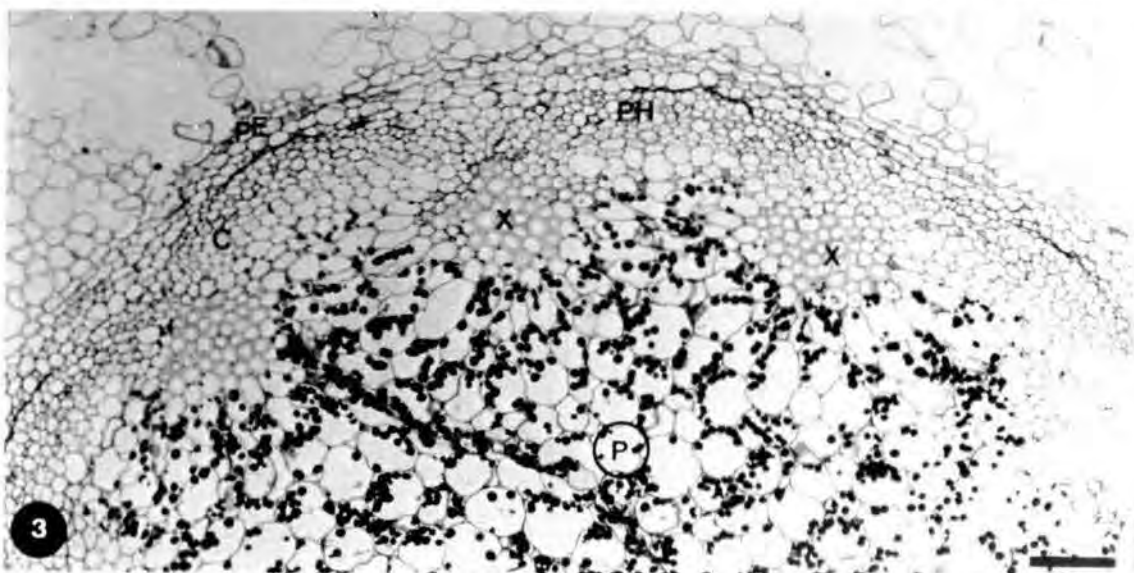
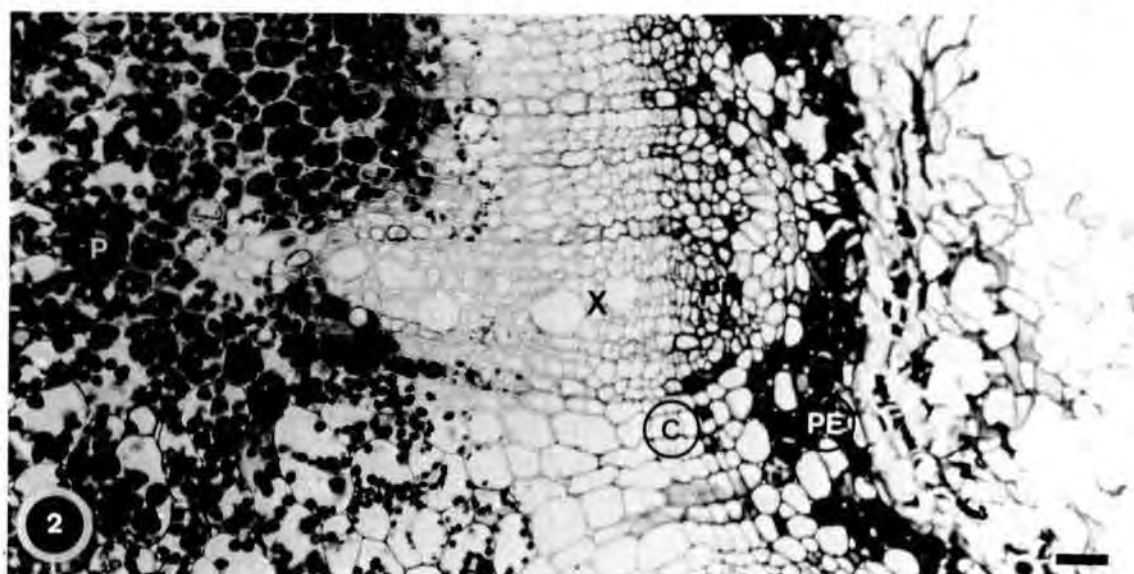
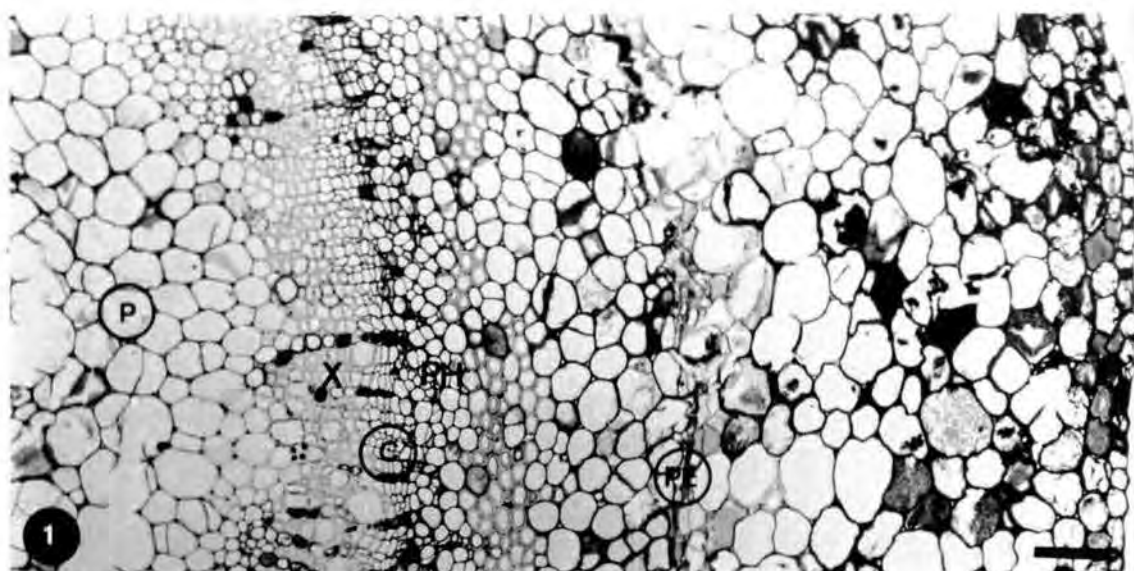
Secció transversal del brot, de la regió cotiledonar fusionada, i de l'arrel d'una plàntula de 2 mesos. Tinció: PA-Schiff.

C, càmbium; P, medul·la; PE, peridermis, PH, floema; X, xilema.
Barra=100µm.

Fig.1.-Brot per sobre els cotilèdons. Noti's l'absència de midó en la medul·la i el desenvolupament del càmbium vascular. La peridermis inicia el seu desenvolupament.

Fig.2.-Secció corresponen a la regió fusionada cotiledonar a 3cm per sota els cotilèdons. El càmbium vascular està ben format i la peridermis és rica en tanins. Noti's l'elevada quantitat de grànuls midó presents en les cèl·lules de la medul·la.

Fig.3.-Secció d'arrel uns 5cm de l'àpex, en què s'observa el desenvolupament altern dels feixos vasculars. Noti's la presència del càmbium i l'inici de la formació de la peridermis. Observi's la presència de midó en la medul·la.



LÀMINA XI

Figures: 1 a 4

LÀMINA XI

Plàntules en les quals s'observen gemmes en la porció superior sense fusionar de l'eix embrionari.

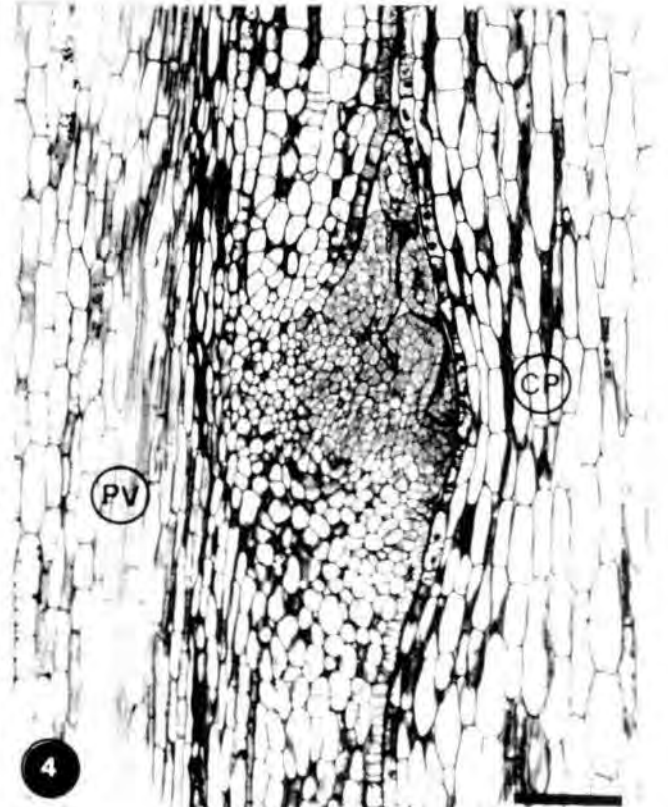
CP, pecíol cotiledonar; CT, teixit cotiledonar; ES, superfície epidèrmica; PV, feixos provasculars; S, esquames laminars planes. Barra=100µm.

Fig.1.-Gemma d'una plàntula de 45 dies. Noti's l'orientació cap amunt de la gemma. Les esquames laminars planes desenvolupen tricomes en els marges.

Fig.2.-Gemma lateral situada en la base de la porció sense fusionar d'una plàntula de 45 dies. Noti's la franja de teixit epidèrmic entre teixit cotiledonar alterat.

Fig.3.-Secció transversal d'una gemma lateral d'una plàntula de 30 dies. Tinció: PA-Schiff.

Fig.4.-Secció longitudinal de l'epicòtil d'una plàntula de 15 dies, en què els pecíols cotiledonar encara no s'han separat per donar pas a l'epicòtil. El pecíol cotiledonar s'observa a la dreta. Noti's que la gemma està orientada vertical i cap amunt. Tinció: PA-Schiff.



LÀMINA XII

Figures: 1 a 4

LÀMINA XII

Gemmes localitzades en la porció fusionada cotiledonar. La superfície epidèrmica de l'eix embrionari s'observa entre el teixit cotiledonar alterat.

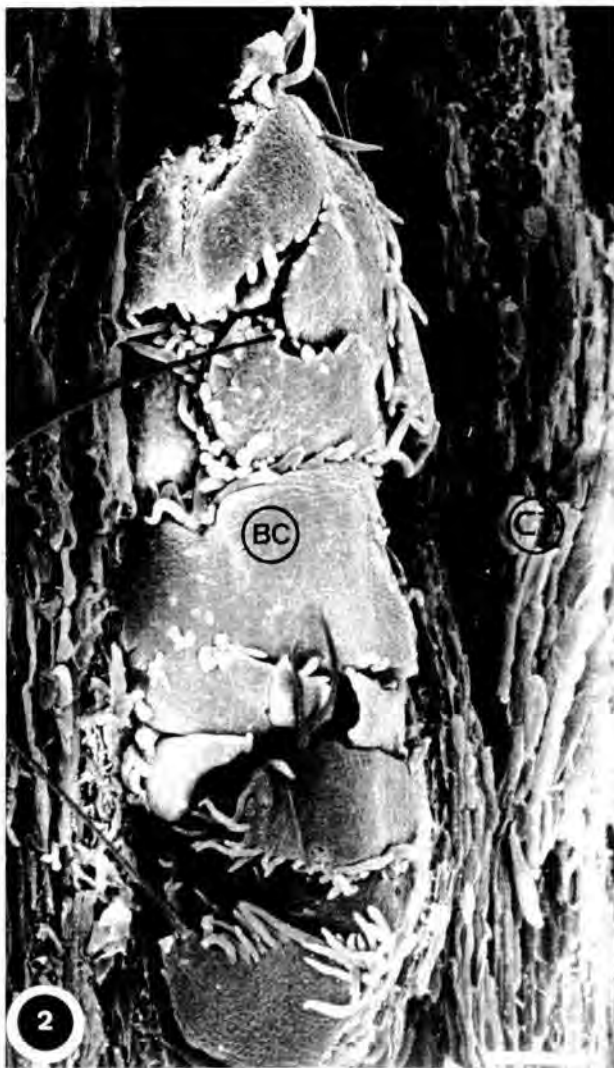
B, gemma lateral; BC, grup de gemmes; CT, teixit cotiledonar; ES, superfície epidèrmica de l'eix embrionari. Barra-100µm.

Fig.1.-Plàntula d'un mes. Observi's l'aspecte aplanat de la gemma.

Fig.2.-Plàntula de cinc mesos. Noti's la formació d'un grup de gemmes.

Fig.3.-Plàntula d'un mes. Igual que la Fig.2.

Fig.4.-Plàntula d'un mes. En la superfície epidèrmica de l'eix embrionari s'han desenvolupat tricomes (fletxes). S'observa una gemma lateral.



LÀMINA XIII

Figures: 1 a 4

LÀMINA XIII

Seccions transversals de la porció fusionada cotiledonar de plàntules de 2 a 3 mesos d'edat. Noti's l'elevada quantitat de grànuls de midó presents en la medul·la. Tinció: PA-Schiff.

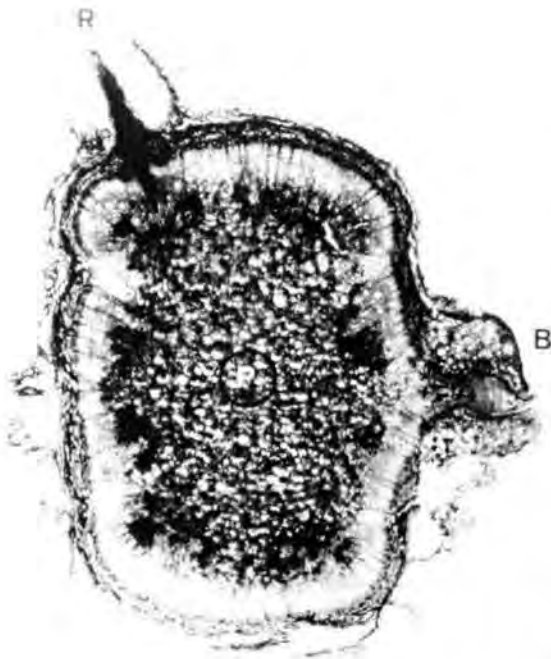
B, gemma lateral; R, arrel lateral; P, medul·la; S, esquames hipertrofiades; V, teixit vascular. Barra-100µm.

Fig.1-Fotografia general on s'observa una gemma lateral i una arrel lateral originades en el mateix nivell.

Fig.2.-Detall de la Fig.1 on s'observa una arrel lateral originada oposadament a un pol de protoxilema.

Fig.3.-Detall de la Fig.1 en què s'observa una gemma lateral d'origen exogen. Noti's la distribució del teixit vascular característic d'un brot.

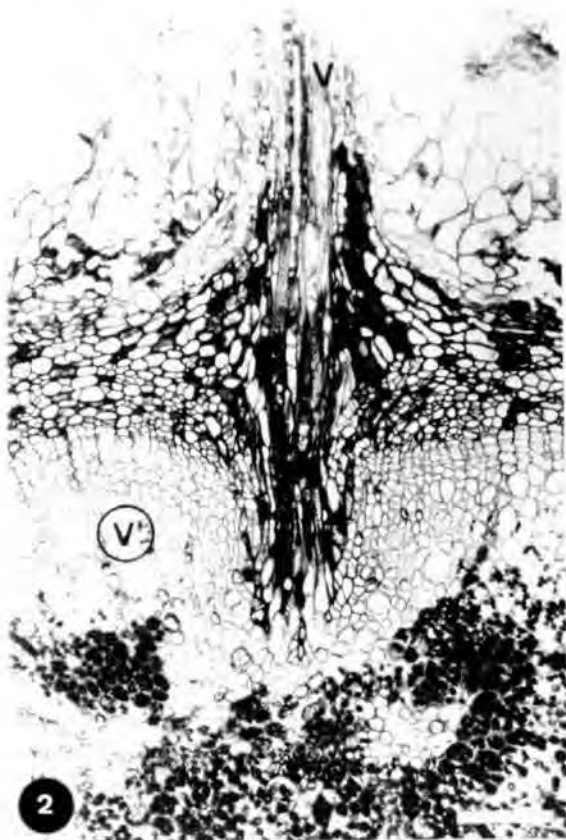
Fig.4.-Secció transversal d'una gemma amagada. Noti's el teixit vascular i les esquames hipertrofiades.



1



3



2



4

LÀMINA XIV

Figures: 1 a 3

LÀMINA XIV

Lignotúber en plàntules de *Quercus suber*.

Fig.1.-Planta d'un any. Després de seccionar la primera tija, les gemmes epicotiledonars s'han activat i tres nous brots s'observen en desenvolupament (dobles fletxes). Noti's la porció del nus cotiledonar amb grups de gemmes latents (fletxa). Aproximadament X2.

Fig.2.-Detall del lignotúber en una planta de 4 anys. Observi's una fila de gemmes en posició lateral. Aproximadament X3.

Fig.3.-Planta de 4 anys. Secció transversal d'un grup de gemmes laterals (fletxa). X2.

Fig.4.- Igual que la Fig.3. Secció transversal d'una arrel lateral. X2.



Maduració de l'embrió i desenvolupament de les gemmes

Els aconteixements ontogenètics, que tenen lloc durant la fase final de la maduració de l'embrió de l'alzina surera i condueixen a la diferenciació de varis parells de gemmes axil.lars en el nus cotiledonar, podrien relacionar-se amb la ràpida capacitat de rebrotar d'aquesta espècie. La interpretació realitzada d'aquestes característiques del desenvolupament donen suport a la teoria de la possible participació del nus cotiledonar en la formació del lignotúber en l'alzina surera. Estudis del desenvolupament del lignotúber han mostrat que la seva presència és ontogenèticament programada i no és el resultat de cap estres físic o ambiental (James, 1984). En l'eucaliptus existeix una clara connexió entre la posició de les gemmes latents en el nus cotiledonar i la capacitat de produir lignotúbers (Chattaway, 1958: Carr i col. 1984: Carter i Panton, 1985). Encara que, en certs eucaliptus, la capacitat de formar lignotúbers no està restringida al nus cotiledonar, és, també una propietat de les tiges que es formen a partir de les gemmes accessòries, suggerint un comportament depenent de la posició (Carr i col. 1982). També, el nus cotiledonar sembla jugar un paper important en la formació dels noduls o gemmes basals ("burl bud") en alguns arbres forestals (James, 1984). La dilatació de les tiges basals juntament amb la formació de noduls ("burl") es troben en el bedoll, *Betula populifolia*, on les gemmes latents apareixen en la part baixa i en el nus cotiledonar (Stone i Cornwell, 1968).

Els aconteixements ontogenètics que resulten de la formació de les gemmes laterals són similars al procés de formació de les gemmes axil.lars en les dicotiledònies. En les gemmes laterals, el meristema està separat del cilindre provascular axial per la zona limitant. Encara que la presència de la zona limitant ("shell zone") és un caràcter comú en les dicotiledònies, la seva funció no és del tot compresa. Shah i Patel (1972) suggereixen que un possible paper de la zona limitant és aïllar el meristema en formació per poder preservar les seves potencialitats morfogènètiques.

Encara que hi ha investigacions sobre el desenvolupament de l'òvul i de l'embrió en *Quercus* (Stairs, 1964; Mogensen, 1965; Sutton i Mogensen, 1970), les

etapes més avançades de la germinació no s'han descrit de forma detallada. Nosaltres hem trobat que en la maduració de l'embrió de l'alzina surera l'epicòtil passa de ser pla, a tenir forma de dom i porta de dos a quatre primordis foliars. Sutton i Mogensen (1970) han trobat una correlació entre la presència o absència de primordis foliars en l'embrió madur i el subgènere de *Quercus*. Totes les espècies americanes de *Lepidobalanus* examinades pels autors citats anteriorment tenen l'epicòtil en forma de dom i els primordis foliars es desenvolupen en l'embrió madur, mentre que en els *Erythrobalanus* i *Protobalanus* americans l'epicòtil és pla i no porta primordis foliars. L'alzina surera pertany al subgènere *Cerris*, el qual no es troba representat en Amèrica. Seria interessant examinar altres *Quercus* Europeus per establir una correlació d'aquests antecedents o altres criteris taxonòmics.

Lignotúber

Els nostres estudis ontogenètics mostren el model dinàmic de la regió cotiledonar i la seva funció com a lignotúber en les plàntules de *Q. suber*. Es considera que el lignotuber té una doble funció: com a font de gemmes protegides i com a òrgan de reserva. Aquest estudi confirma la presència en la regió cotiledonar de les plàntules de l'alzina surera de nombroses gemmes situades en la part subterrània de la planta a punt de ser activades després de qualsevol accident de la part aèria de la planta, també confirma la presència d'una elevada quantitat de midó en aquesta regió. Els esdeveniments que hem descrit mostren que des del principi de la germinació, les plàntules tenen mecanismes que els permeten rebrotar plenament. En les plàntules de l'alzina surera, el terme lignotúber pot ser correctament utilitzat per descriure la zona de transició de l'arrel-tija, la qual actua com una estructura ontogenèticament productora ja preparada per la regeneració vegetativa. Partint del fet que la pèrdua de la part aèria pot donar-se en qualsevol etapa, l'adaptació a aquest tipus d'accident ha d'estar present en qualsevol etapa del cicle de la planta. Malgrat però, l'elevada capacitat de rebrotar de l'alzina surera, volem emfasitzar que ni components de tipus lignotúber ni rizomes han estat identificats en el sistema hipogeu de l'alzina surera madura (Verdaguer i Molinas, 1992) (Veure Capítol IV). La representació del lignotúber en les plàntules i en el sistema radicular en els arbres madurs requereix de més investigació.

Groff i Kaplan (1988) analitzen les implicacions ecològiques de les diverses relacions topològiques de la tija i els sistema radicular. El tipus de connexions

entre la tija i l'arrel reflecteixen les condicions viscudes i la història evolutiva de les espècies. El potencial pel creixement clonal és realçat en les plantes amb arrels formades a partir de tiges i en les tiges formades a partir d'arrels. En l'alzina surera, les tiges formades a partir d'arrels apareixen relativament lluny del tronc principal després de les arrels hagin estat lesionades (Natividade, 1950). En les plàntules de l'alzina surera, el nus cotiledonar en expansió és una regió de transició entre la primera arrel i la primera tija i pot ser interpretada com un òrgan intermig amb capacitat per formar tant arrels com tiges. Un desenvolupament anatòmic semblant es dona en altres *Quercus* com *Q. pyrenaica* i *Q. ilex* (Muller, 1951).

Durant el creixement i diferenciació, l'embrió, l'arrel i la tija adquireixen gradualment les seves característiques distintives. La primera tija i la primera arrel de la surera concorden amb les característiques anatòmiques dels *Quercus*, *Q. alba* i *Q. velutina* i altres espècies americanes descrites per Mogensen (1967, 1969). Aquest autor també apunta que, en el moment de sortir del sòl, un parell de gemmes en les axil·les dels cotilèdons es desenvolupen i produeixen tiges elongades. Les gemmes descrites per Mogensen (1969) en *Q. alba* i *Q. velutina* corresponen a les gemmes localitzades en la porció superior de la regió no fusionada de l'eix embrionari de la surera. Mogensen no esmenta la presència de gemmes amagades o de gemmes desenvolupades formant grups o lignotúbers. Les nostres observacions amb embrions madurs d'altres quercínees mediterrànies també rebrotadores (*Quercus coccifera* L. i *Q. ilex* L. (subgènere *Esclerophyllodris*): *Quercus petraea* (Mattuschal Liebl. subsp. *huguetiana*, *Q. robur* L., *Q. humilis* Miller i *Q. faginea* Lam. (subgenerum *Quercus (Lepidobalanus)*)) (Verdaguer i Molinas, resultats no publicats), mostren que en totes les espècies mencionades només un parell de gemmes axil·lars per sobre l'inserció dels cotilèdons hi són presents. Les diferències en el grau de desenvolupament de les gemmes del nus cotiledonar i la seva relació amb la capacitat de rebrotar en els quercus, són característiques importants que requereixen de posteriors estudis.

CAPÍTOL II:
CARACTERITZACIÓ DE L'ARREL
PRIMÀRIA

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL BIOLÒGIC

S'han utilitzat arrels de plàntules de 25 a 45 dies crescudes en el laboratori segons el procediment especificat en el capítol I (pg.9).

MÈTODES

Per descriure l'arrel primària, s'ha utilitzat la tècnica histològica basada en l'observació al microscopi òptic de camp clar, i concretment, per identificar el centre quiescent en el meristema radicular, s'ha utilitzat una tècnica imunocitoquímica que per la seva complexitat metodològica es descriu en un apartat apart.

Processat de les mostres per ser observades al microscopi òptic (MO) de camp clar

Per a l'observació de les mostres en MO de camp clar s'han inclòs en glicol metacrilat i posteriorment seccionat. Veure capítol I (pg.12).

Mètode del glicol metacrilat (GMA)

Obtenció de mostres : Les mostres s'han obtingut tallant, amb un bisturí o fulla d'afaitar, petits fragments de teixit d'uns 3mm³ de la zona a estudiar. Tot seguit els fragments s'han introduït en la solució fixadora.

Fixació: Les mostres s'han fixat amb formol al 10% tamponat amb CaCO₃ pH 7, durant 24 hores, com a mínim. En aquest temps les mostres s'han mantingut sota una campana de buit amb un buit enèrgic.

Deshidratació: Les mostres s'han deshidratat en una sèrie isopropílica creixent (de 70°C a 100°C), transferit a una barreja d'alcohol isopropílic amb

butanol i, finalment, s'han portat a butanol 100%.

Inclusió: Les mostres ja deshidratades s'han inclòs en glicol metacrilat, seguint el mètode de polimerització en fred (Bonet i Molinas, 1983).

Microtòmia: Els blocs de GMA es seccionen un micròtom 1150-Autocut ReichertJung obtinguent talls de 4 a 6 µm.

Tinció: Veure Cap.I-pg13.

Generals i metacromàtiques:

-**Blau de toluïdina:** Veure capítol I, pg14.

-**Blau de toluïdina-PA.Schiff:** Reactius: blau de toluïdina al 2% en H₂O_d; reactiu de Schiff (Merck, 9033); àcid periòdic 1% en H₂O_d amb una gota d'àcid nítric (HNO₃).

Procediment: 1-Oxidat amb àcid periòdic durant 15minuts. 2-Rentar amb H₂O_c durant 10 minuts. 3-Tractar amb reactiu de Schiff durant 15 minuts. 4-Rentar amb H₂O_d durant 10segons. 5-Tenyir amb blau de toluïdina durant 30 segons. 6-Rentar amb H₂O_d de 2 a 3 minuts. 7-Assecat i muntar.

Resultats: nucleol blau intens; citoplasma blau-rosat; parets cel.lulars blau vermellós; granuls de midó granates; tanins vermells.

-**Tionina:** Veure capítol I, pg12.

Histoquímiques:

-**PA.Schiff:** Veure capítol I, pg14.

Observació i fotografia: Les observacions s'han fet en un fotomicroscopi Vanox (Olimpus) equipat amb epifluorescència. Per a la fotografia, s'ha utilitzat, per un costat, un filtre LBD i pel.lícula Ektacrome 100 ASA per a les diapositives en color; i, per l'altre, un filtre verd IF 550 i pel.lícula Kodak T MAX 100 ASA per a la fotografia en blanc i negre.

Detecció de proliferació cel·lular per incorporació de BrdU

Aquesta tècnica que permet detectar les cèl·lules en la fase S del cicle, s'ha utilitzat per identificar el centre quiescent del meristema radicular de l'arrel primària. El centre quiescent és una zona on la taxa de divisió cel·lular és inferior a la de les cèl·lules circumdants, per tant, al marcar-se les cèl·lules circumdants permet delimitar el centre quiescent.

Aquesta tècnica es basa en la incorporació d'un anàleg de la timidina, la 5-bromo 2'-deoxiuridina (BrdU), seguida d'una detecció per anticossos monoclonals. S'ha utilitzat el mètode basat en el kit "Cell Proliferation RPN-20" (Amersham).

S'han realitzat diferents proves de l'experiment introduint algunes variants respecte el protocol indicat per les cases comercials.

Cell Proliferation RPN-20 (Amersham)

Per incrementar la sensibilitat d'aquesta tècnica, les cèl·lules són exposades simultaneament a la BrdU i a la 5-fluoro-2'-deoxiuridina, un inhibidor de la timidilat sintetasa, que incrementa la incorporació de la BrdU reduint la competició amb la timidina endògena. En aquest procediment s'utilitza també una nucleasa que permet l'accés de l'anticòs anti BrdU al DNA sense fer necessari l'ús d'un pretractament químic àcid o alcalí massa dràstic. L'anticòs anti BrdU es detecta amb un anticòs anti Ig de ratolí marcat amb peroxidasa. Posteriorment la peroxidasa es fa polimeritzar amb diaminobencidina (DAB) en la presència de cobalt i níquel, donant una coloració negre-blabosa en els llocs on s'ha incorporat la BrdU.

Reactius i preparació de les solucions mare i de treball:

- 1- Marcador: Solució aquosa de 5-bromo-2'-deoxiuridina i 5-fluoro-2'-deoxiuridina (10:1). Se subministra en una solució concentrada de 3 mg de BrdU/ml que es pot diluir segons els requeriments del material emprat.
- 2- Anticòs monoclonal anti BrdU i DNA nucleasa en tampó tris-salí pH 7,6 amb albumina de serum boví al 1%, clorur de magnesi i preservatiu. Solució a punt per el seu us. En el kit utilitzat a la prova nº 5, l'anticòs i la nucleasa es troben en flascons separats i s'han de barrejar just abans de fer servir.

3- Anticòs anti Ig de ratolí conjugat amb peroxidassa en tampó fosfat salí pH 7,4 amb albumina de serum boví al 1% i preservatiu. Solució a punt pel seu us.

4- Substrat / intensificador: Solució aquosa amb peròxid d'hidrogen, clorur de cobalt i clorur de níquel.

5- DAB: Tetraclorur de 3,3'-diaminobencidina que s'ha de diluir en 20 ml de tampó fosfat 0,05 M pH 7,4 (pàg. 277) i guardar en alicuotes de 1 ml a -20° C.

Incubació amb BrdU: S'incuba la porció apical de l'arrel, l'últim cm.. La solució marcadora es dilueix amb aigua de l'aixeta en una proporció de 0,3 mg BrdU/ml i s'incuben els àpexs durant 24 h. Després del període d'incubació es processen els teixits per a la inbibició en parafina.

Detecció immunohistològica:

Processat histològic: Mètode de la parafina

Fixació: Les mostres s'han fixat amb formol al 10% tamponat amb CaCO₃ pH 7, durant 24 hores, com a mínim. En aquest temps les mostres s'han mantingut sota una campana de buit amb un buit enèrgic.

Deshidratació i inclusió: Les mostres s'han deshidratat en sèrie etílica, s'han aclarit i inclòs en parafina:

Procediment: 1- A 70% durant tota la nit. 2- A 96%, 2 canvis de 1/2 h cada un. 3- AA, 3 canvis de 1/4 h cada un. 4- Xilol, 3 canvis de 1/2 h cada un. 5- Xilol-parafina, de 1 h a 40° C. 6- Parafina, 2 canvis de 1 h a 58° C. 7- Realització dels blocs.

Els passos amb els alcohols de baixa graduació s'han fet sota una campana de buit i amb temps llargs.

A l'hora de fer la inclusió en parafina s'ha de tenir en conte que per la preservació dels teixits i dels antigens no s'ha d'exedir de 58° C. S'ha utilitzat parafina plastificada pF56-58° C Panreac o bé medi d'imbibició de teixits pF 52° C DDM, Medim-Plast 52" (taula III).

Microtomia: A partir dels blocs obtinguts es realitzen talls de 7-8 µm de gruix, es deixen en un bany a 35° C, es recullen en portes gelatinats i es deixen assecar uns 20 min. a 35° C.

Abans de la detecció immunohistològica es procedeix a la desparafinació i rehidratació dels talls:

Procediment: 1- Submergir els portaobjectes en xilol de 2 a 3'. 2- Realitzar 2 canvis de xilol fresc. 3- Realitzar 2 canvis AA. 4- Realitzar 1 canvi A 96%. 5- Realitzar 1 canvi A 70%. 6- Realitzar 3 canvis de PBS

Detecció immunològica

El protocol seguit és el següent:

Procediment: 1-Assecar el PBS del voltant de l'especimen. 2-Afegir suficient AC anti BrdU per cobrir l'especimen. 3-Incubar a temperatura ambient en cambra humida i a les fosques. 4-Rentar amb 3 canvis de PBS de 3minuts cada un. 5-Eixugar al voltant de l'especimen. 6-Afegir suficient AC anti Ig marcat amb peroxidasa per cobrir l'especimen. 7-Incubar a temperatura ambient en cambra humida. 8-Preparar 1ml de DAB en 50ml de tampó fosfat pH7'4, 0'05M per cada 10 portaobjectes. 9-Rentar amb 3 canvis de PBS de 3 minuts cada un. 10-Afegir substrat/intensificador al DAB fent servir 5 gotes per cada 50ml i agitar durant l'adició. 11-Sumergir els portaobjectes en la solució colorant de 5 a 10minuts. 12-Rentar amb 3 canvis d'H2O_d. 13-Contrastar amb eosina alcohòlica. 14-Deshidratar, aclarar i muntar amb Entellan.

Els temps d'incubació dels anticossos primari i secundari recomenats en el protocol Amersham són de 1 hora i 30 minuts respectivament.

Modificacions del protocol

Per reduir l'activitat peroxidasa endògena es pot fer, previ a la detecció immunohistològica, un tractament amb peròxid d'hidrogen al 2% en metanol durant 30min - 1h rentant posteriorment amb PBS.

Una absència de marcatge de nuclis pot vindre donada per dos motius, que es poden intentar sol.lucionar de diferents maneres:

- a) no incorporació de BrdU
 - augmentar la concentració
 - augmentar el temps d'incubació
- b) no lligament amb l'AC anti BrdU/ insuficient digestió del DNA
 - augmentar el temps d'incubació
 - fer una desparafinació més acurada

- fer una desnaturalització complementària del DNA amb un agent químic.

Per intentar solventar una possible insuficient digestió del DNA es pot fer un tractament amb ClH, just abans de la incubació amb l'anticòs primari (Del Rio i Soriano, 1989).

Es submergeixen els portes en ClH 2 N durant 30 minuts a temperatura ambient. Per neutralitzar el ClH es renten acuradament per immersió en tampó borat 0,13 M, pH 8,5 i seguidament amb PBS.

Tampons i solucions:

Tampó Borat pH8,5 0,13M (Hale, 1965).

Solució A: 12,404g H₃B₃ + 100ml. NaOH 1N/1L H₂O. Solució B: HCl 0,1N.

A 65ml. de solució A s'afegeixen 35ml de solució B per obtenir 100ml de tampó borat pH 8,5 0,13M.

Tampó fosfat pH7,4 0,05M

Na₂ HPO₄ 5,75g; NaH₂PO₄.2H₂O 1,48g.

Enrasar a 1L. amb H₂O destil.lada.

Tampó fosfat salí (PBS) 0,1M pH 7,4

Na₂ HPO₄ 11,5g; NaH₂PO₄.2H₂O 2,96g; NaCl 5,84g.

Enrasar a 1L. amb H₂O destil.lada.

Tampó fosfat salí (PBS) 0,05M pH 7,4

Na₂ HPO₄ 5,75g; NaH₂PO₄.2H₂O 1,48g; NaCl 5,84g.

Enrasar a 1L. amb H₂O destil.lada.

CAPÍTOL II.a:

ÀPEX RADICULAR I HISTOGÈNESI DEL SISTEMA VASCULAR

INTRODUCCIÓ

La caracterització anatòmica de l'arrel primària és un pas essencial per comprendre el desenvolupament del sistema radicular, ja que es pot considerar que el sistema radicular està format per múltiples unitats o mòduls estructuralment anàlegs a l'arrel primària (fitòmers) (Lyndon, 1990). Tenint en compte la manca de qualsevol estudi anatòmic centrat en l'arrel primària de *Q.suber*, ens proposem, per una banda, descriure l'organització del meristema radicular amb la identificació de les poblacions de cèl.lules inicials i del centre quiescent i, per una altra, descriure el patró de diferenciació vascular.

Des de la dècada dels 60, l'organització del meristema radicular ha estat objecte de nombrosos treballs, principalment anatòmics, amb la finalitat d'aportar informació sobre els factors que intervenen en la morfogènesi i en la regulació del creixement. En les angiospermes, com a principals regions tisulars del meristema es defineix el centre quiescent, en posició distal, i el meristema proximal envoltant-lo; a continuació s'observen els teixits derivats del meristema proximal que formen el cilindre central i el còrtex i, finalment, en posició terminal la caliptra (Feldman, 1984).

El centre quiescent es localitza en la zona distal del cilindre central i del còrtex en contacte amb la caliptra, i està constituït per un conjunt de cèl.lules amb un cicle cel.lular extremadament més llarg que el de les cèl.lules veïnes; les cèl.lules del centre quiescent es troben la major part del temps en fase G1. En *Zea mays*, Clowes (1981) utilitzant "colchicina", constata que el temps potencial de duplicació de les cèl.lules del centre quiescent és entre 11 i 20 vegades inferior al de les cèl.lules adjacents. També s'ha observat que utilitzant timidina tritiada i posterior autoradiografia, el nombre de cèl.lules que formen el centre quiescent no és constant. El nombre de cèl.lules sembla variar segons l'activitat de l'arrel (Wilcox, 1962; Byrne i Heimsch, 1970b; Raju i col. 1976) i, també, segons les condicions a què està sotmesa, per exemple en condicions de fred (Clowes i Stewart, 1967) o irradiació (Clowes, 1970). La modificació del tamany del centre quiescent, quan entren en divisió algunes de les cèl.lules que el constitueixen, s'ha relacionat amb el control del patró de desenvolupament

tisular al modificar-se, paral·lelament, el tamany del meristema proximal. Segons Feldman i Torrey (1975), i Feldman (1984), una de les funcions del centre quiescent seria la de controlar directament o indirectament la complexitat del cilindre central variant el nombre de feixos vasculars. Altres funcions que s'atribueixen al centre quiescent són la d'actuar com un reservori de cèl·lules per mantenir o reemplaçar les cèl·lules inicials actives mitòticament (Barlow, 1976); també, es relaciona amb la producció d'hormones, per exemple s'ha observat que el contingut en citoquinines és alt (Feldman, 1975).

En base a les poblacions de cèl·lules inicials que formen el centre quiescent, els meristemes radiculars de les angiospermes es classifiquen en meristemes tancats o oberts (Clowes, 1961). Segons Clowes (1981), el meristema obert és aquell en què les cèl·lules subjacents al pol del cilindre central no són vertaderament quiescents, dividint-se periòdicament en secció transversal i essent impossible separar el còrtex de la periferia de la columnel·la. En canvi, considera que el meristema és tancat quan les cèl·lules subjacents al pol del cilindre central són quiescents i les rares divisions que hi tenen lloc són longitudinals en la seva majoria. A conseqüència d'aquestes diferències, la caliptra en els àpexs amb meristema tancat és discreta i, en canvi, en els meristemes oberts no, produint-se una continuïtat entre les cèl·lules del còrtex i les de la regió perifèrica de la columnel·la.

Dels diversos processos histogenètics que es produeixen en l'àpex radicular, l'estudi de la diferenciació i maduració del sistema vascular és bàsica per comprendre la funció del transport. El patró de diferenciació dels elements vasculars ha estat estudiada en diverses espècies, principalment herbàcies, per ex. *Hordeum vulgare* (Heimsch, 1951; Luxovà, 1989, 1990); *Pisum sativum* (Popham, 1954; Rost i col. 1988); *Cassia* (Hayat i Heimsch, 1963), essent més escassa la informació existent en les llenyoses. En aquest cas destaquem els treballs de Wilcox en *Abies procera* (1954) i *Libodecedrus decurrens* (1962), i en el grup de les quercínees el treball de Mogensen (1967) sobre *Q.alba* i *Q.velutina*. Aquests treballs s'han centrat, essencialment, en determinar el nivell en què els diferents elements vasculars es diferencien i el nivell en què maduren, relacionant-se, en algun cas, la conductivitat hidràulica de l'arrel amb l'estructura del sistema vascular i les dimensions dels elements vasculars (*Hordeum vulgare* (Luxovà, 1989 i 1990)).

RESULTATS

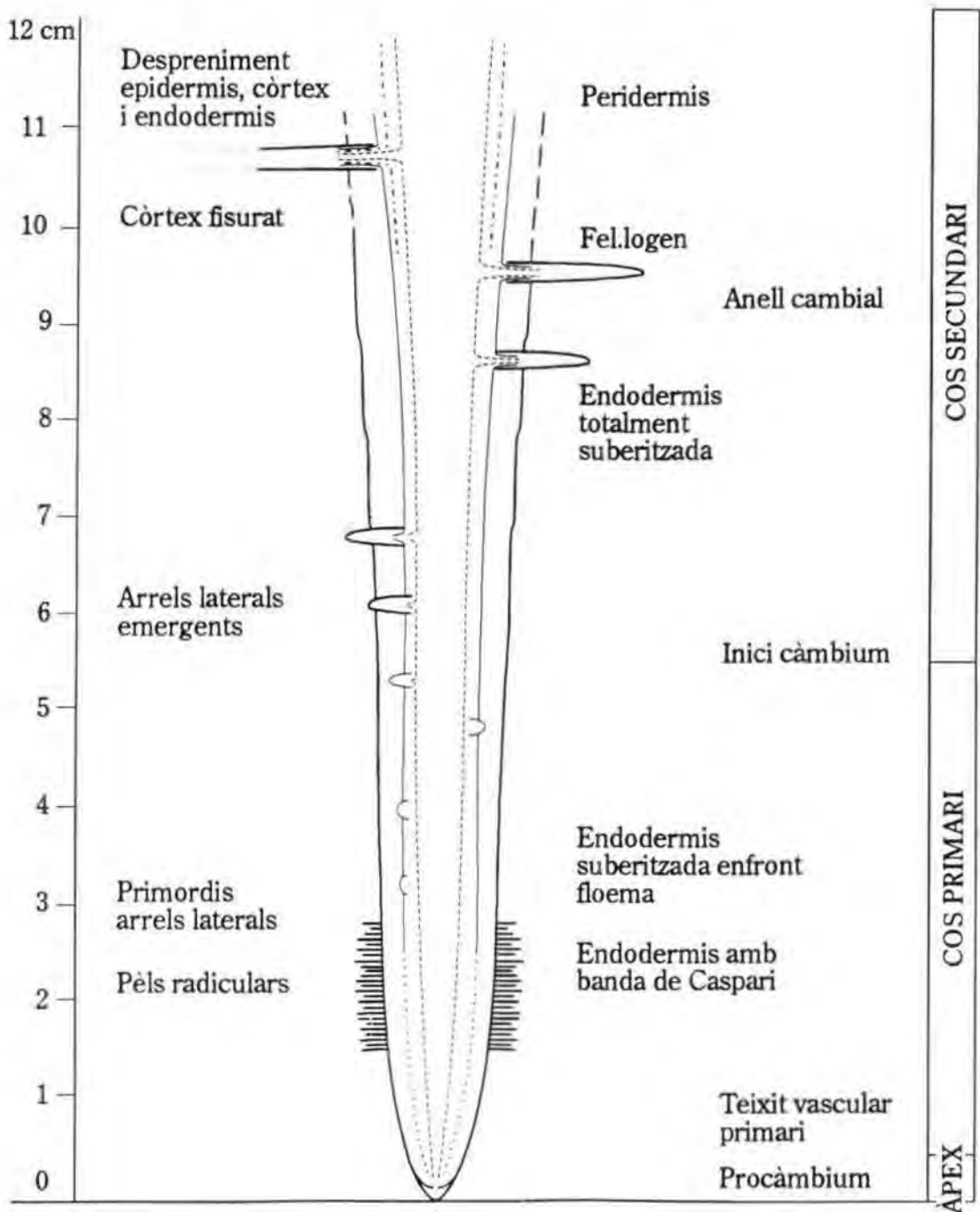
CARACTERITZACIÓ DE L'ARREL PRIMÀRIA

Unes 24h després d'iniciar-se la germinació, l'eix embrionari experimenta un intens elongament, i passa de mesurar uns 2mm quan la gla és madura a uns 13cm als 12-15 dies d'haver germinat. En aquest moment, l'eix finalitza l'expansió i entra en activitat el meristema radicular començant el desenvolupament de l'arrel primària, que al cap de 15 dies ja ha assolit altres 13cm de longitud. Així, al mes d'iniciar-se la germinació, la part hipogea de les plàntules consta d'una porció basal d'uns 13cm derivada de l'eix embrionari i una porció distal, també d'uns 13cm, originada a partir de l'activitat del meristema radicular i que constitueix pròpiament l'arrel. En aquesta fase l'organització histològica de l'arrel queda establerta i és possible distingir-hi tres zones: l'àpex o zona apical, de 2'5-3mm de longitud; el cos primari que s'estén fins a 5-7cm; i el cos secundari que segueix a continuació (Esq.1). L'àpex i el cos primari tenen aparença turgent i color blanquinós; en canvi, el cos secundari destaca pel to marronós dels teixits.

L'àpex comprèn la caliptra en posició terminal i el meristema radicular en posició subterminal. A l'àpex de l'arrel té lloc el creixement apical per divisió i elongació cel.lular, i l'inici de la diferenciació dels teixits primaris. Externament es troba recobert per una substància mucilaginosa o mucigel produïda per les cèl.lules de la caliptra.

En la zona del cos primari es completa la divisió i l'elongació cel.lular, i la diferenciació amb la maduració dels teixits primaris, constituint-se el sistema vascular, el còrtex i l'epidermis. En el cilindre vascular, en secció transversal, s'observen els feixos de xilema i floema disposats de forma alterna que deixen en el seu interior un teixit parenquimàtic medullar. Enfront els feixos de floema, a uns 3-3'5cm de l'àpex, es localitzen les primeres cèl.lules suberitzades de l'endodermis; uns 2 cm després s'observa l'exodermis. A aquest nivell també té lloc l'inici de la formació dels primordis de les arrels laterals. La zona pilífera es localitza a 1'5-2'5cm de l'àpex, essent la seva longitud variable.

El cos secundari s'inicia amb la diferenciació dels meristemes laterals. El cambium vascular comença a formar-se a la cara interna dels feixos de floema i, després, a la cara externa als feixos de xilema, originant-se un anell cambial continu, a uns 9cm de l'àpex. El fellogen es forma internament a l'endodermis, a uns 9-10cm de l'àpex. Externament destaca l'aspecte fisurat de l'escorça i la progressiva emergència de les arrels laterals.



Esq.1. Esquema que mostra la histogènesi de l'arrel primària.

ÀPEX RADICULAR

Caliptra

La caliptra està formada per tres regions: una regió central o columnel·la d'uns 700 a 1000µm de longitud; una regió lateral que es perllonga sobre els teixits de l'arrel fins definir-se amb l'epidermis a uns 2,5-3,5mm; i, una regió perifèrica en el límit situat entre la regió lateral i la columnel·la.

La columnel·la està formada per 3-4 files de cèl·lules contínues que abarquen des de la part proximal a la distal de la caliptra, amb predomini de divisions transversals i, rarament, longitudinals. Aquestes cèl·lules són força vacuolitzades i presenten polaritat respecte la posició dels orgànuls. En el pol superior es localitza el nucli, en general petit, i en el pol inferior els amiloplasts (Làm.II-3). La regió lateral està formada per cèl·lules més o menys isodiamètriques amb el nucli en posició central, observant-se divisions tant transversals com obliqües i algunes, també, longitudinals. La regió perifèrica està formada per unes 4 fileres de cèl·lules amb alguna divisió longitudinal i que, a diferència de la columnel·la, no solen estendre's fins a la zona distal de la caliptra (Làm.I-3).

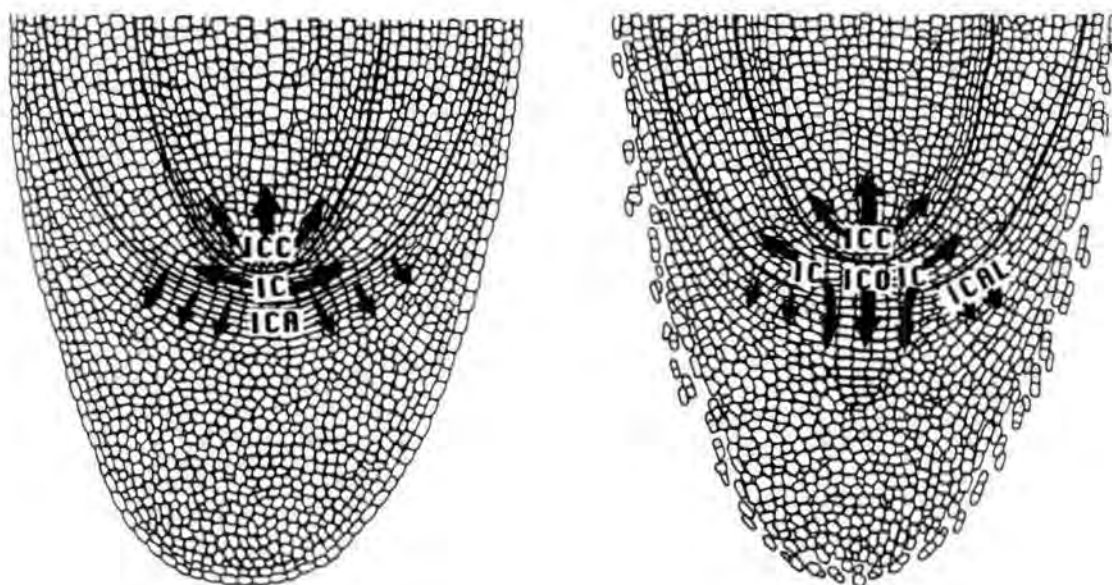
Organització del meristema apical de l'arrel primària.

Les seccions longitudinals medials de l'àpex mostren en el meristema apical, quatre grups de cèl·lules: les inicials del cilindre central; les inicials de la columnel·la; les inicials del còrtex que també ho són de la regió perifèrica de la columnel·la; i les inicials de la regió lateral de la caliptra (Làm.I-1 a 4; Esq.2). El terme "inicials" indica, en aquest cas, el grup de cèl·lules més distals pròpies de cadascuna d'aquestes regions histològiques.

Les inicials del cilindre central es localitzen en el pol distal del cilindre que està en contacte amb les inicials de la columnel·la. Els dos grups es distingeixen per l'aspecte morfològic i per l'aparent solució de continuïtat que hi ha entre elles (Làm.I-1 a 3). Les inicials del cilindre s'orienten paral·lelament a l'eix de l'arrel mentre que les inicials de la columnel·la ho fan en sentit perpendicular (Làm.III-1). Les primeres es diferencien en direcció basípeta mentre que les segones ho fan en direcció acròpeta. En alguns casos, però, la delimitació dels dos grups d'inicials és difícil, especialment quan en la zona central les inicials del cilindre i les de la columnel·la queden alineades sense separació aparent

(Làm.I-4). Les inicials del còrtex envolten la columnel.la en la zona proximal, contribuint a la formació de les 3-4 files de cèl.lules que la circumden separant-la de la regió lateral (Làm.II-1-4).

Altres observacions que s'han realitzat en l'embrió en procés de maduració, permeten observar una organització diferent a la de l'arrel. En l'embrió s'identifiquen tres grups d'inicials: les del cilindre, les del còrtex i les de la caliptra disposades en capes, sense observar-se la participació de les cèl.lules del còrtex en la formació de la caliptra, que no presenta columnel.la (Làm.II-3 i 4; Esq.2). Si considerem aquestes característiques es pot concloure que el meristema de l'arrel primària és de tipus obert i, en canvi, el de la radícula tancat.



Esq.2. Esquema de l'organització del meristema de la radícula de tipus tancat (esquerra) i de l'arrel primària de tipus obert (dreta). ICC, cèl.lules inicials cilindre central; IC, cèl.lules inicials còrtex; ICO, cèl.lules inicials columnel.la; ICAL, cèl.lules inicials caliptra lateral; ICA, cèl.lules inicials caliptra.

Les inicials de la regió lateral de la caliptra limiten la capa més externa de les inicials del còrtex. La seva identificació, moltes vegades, esdevé difícil, especialment en la zona propera a la columnel.la. Aquestes inicials es divideixen repetidament en sentit periclinal per formar la zona lateral de la caliptra (Làm.I-1 a 4). La seva relació amb la diferenciació de l'epidermis no s'ha pogut establir.

Presència d'un centre quiescent

En algunes de les seccions longitudinals-medials de l'àpex de les arrels primàries que s'han estudiat, en la part més distal del cilindre, en la zona de les inicials, s'hi distingeixen un grup de cèl.lules amb disposició lenticular que es pot identificar amb el centre quiescent de l'arrel (Làm.III-1 i 2). Es tracta d'un grup de cèl.lules isodiamètriques, no alineades ni amb les cèl.lules del cilindre vascular ni amb les de la columnel.la, amb poca afinitat pels colorants àcids i, frequentment, limitades per parets cel.lulars més gruixudes (Làm.III-2). Les cèl.lules més distals del cilindre central formen part d'aquest conjunt, en canvi, no sembla que hi participin ni les inicials del còrtex ni les de la columnel.la.

Els resultats obtinguts de les proves d'incorporació amb dBrU confirmen la presència d'un nucli de cèl.lules quiescents doncs s'observa una zona on no es detecta marcatge en posició distal. Aquesta zona queda limitada per la columnel.la i, també, per les cèl.lules del còrtex i del cilindre central que presenten marcatge (Làm.III-3 i 4).

HISTOGÈNESI DEL SISTEMA VASCULAR

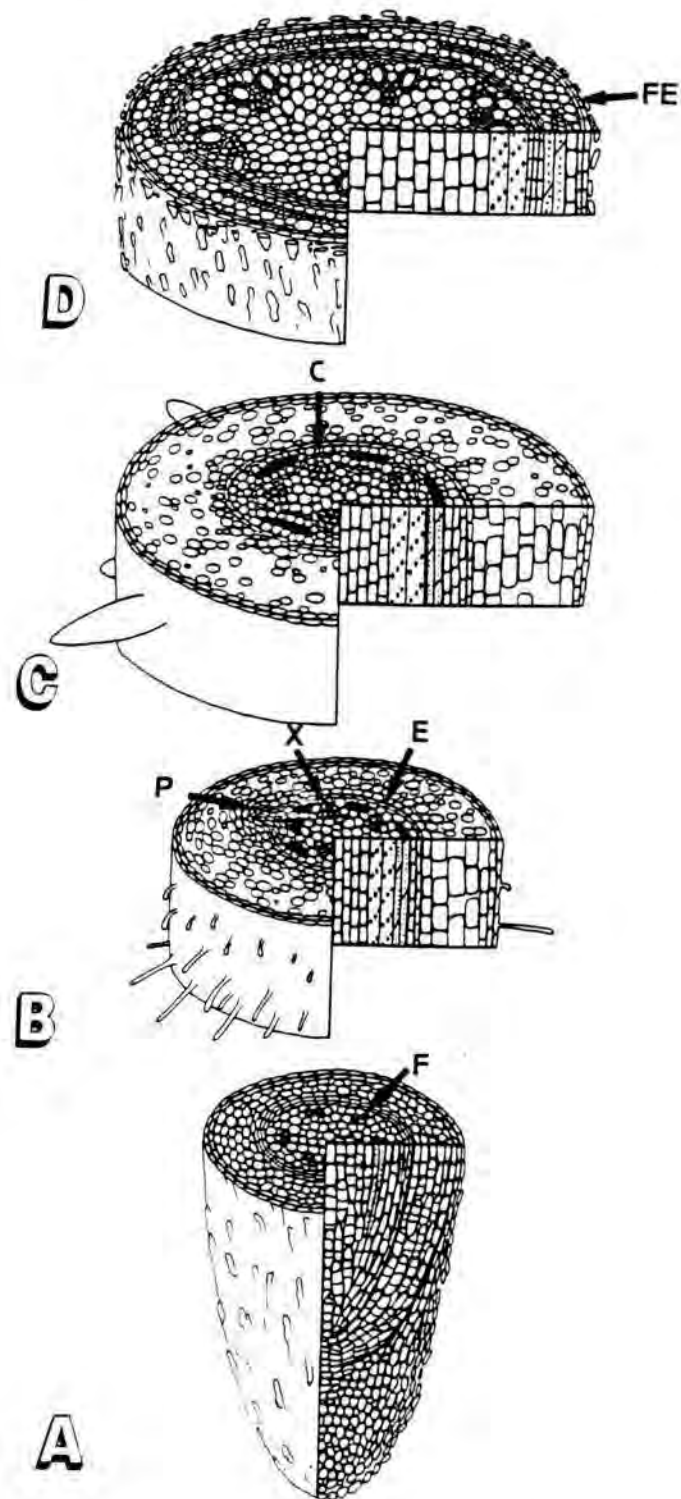
Xilema i floema primaris

A 30-70µm de les cèl.lules inicials, les cèl.lules del procàmbium es distingeixen de les del meristema fonamental que formaran el còrtex per ser més petites i menys vacuolitzades. Alhora, el procàmbium deixa en el seu interior un àrea medul.lar on les cèl.lules són lleugerament més vacuolitzades i més grans que les primeres (Làm.IV-1 i 2).

Els primers signes de diferenciació en el procàmbium són visibles a uns 100µm de les cèl.lules inicials, quan es fan evidents uns grups de cèl.lules que corresponen als futurs pols de floema. Aquests grups es distribueixen equidistants i es distingeixen per observar-s'hi, d'una banda, més mitosis que en les restants zones del procàmbium i, d'altra, per l'acusada extensió que sofreixen les 2-3 cèl.lules més externes (Làm.V-2 i 3). Progressivament s'hi fan visibles els elements cribrosos (Làm.IV-3), la maduració dels quals és centrípeta i es dona de forma sincronitzada en les diferents àrees. El primer element cribrós de cada àrea madura a uns 600µm de les cèl.lules inicials; el segon a uns 800µm; i, el tercer, aproximadament a 1mm (Làm.IV-4 a 5; Esq.3 A). Seguidament el nombre d'elements cribrosos augmenta en ràpida successió i la seva disposició lateral determina que el feix creixi en sentit tangencial (Làm.IV-

6; Làm.VI-1 a 4). Els elements cribrosos es distingeixen: per l'aspecte buit del citoplasma; per la paret cel·lular lleugerament més gruixuda, que es tenyeix intensament amb la reacció de PA-Schiff; i per les seves parets anguloses (Làm.V-1, 2 i 4). El diàmetre màxim dels 2-3 primers elements cribrosos oscil·la entre 11 i 19 μ m mentre que el dels últims elements diferenciats està comprès entre 5 i 9 μ m (Làm.VI-1 a 3). No es distingeixen cèl·lules acompanyants. Les àrees de floema contrasten progressivament amb les cèl·lules parenquimatoses del pericicle per ser més vacuolitzades. El pericicle en la cara externa dels feixos de floema està format per 2 capes, les cèl·lules de la capa externa adjacent a l'endodermis, són lleugerament elongades en sentit tangencial i poden presentar tanins, en canvi, les cèl·lules de la capa interna en contacte amb els elements cribrosos són més circulars, molt extenses, i a voltes s'hi observa algun grànul de midó (Làm.V-2). En les regions interfloemàtiques el pericicle està format per 3-4 capes de cèl·lules més isodiamètriques i, en general, bastant uniformes (Làm.V-3).

Els primers signes de maduració del xilema s'observen a 1'5-2 mm de l'àpex, en les cèl·lules en contacte amb la capa més interna del pericicle de les regions interfloemàtiques; a aquest nivell es fan visibles els primers 2-3 elements vasculars (Làm.IV-6; Esq.3-B). Els primers elements pertanyen al protoxilema, el seu diàmetre màxim oscil·la entre 5 i 10 μ m i tenen les parets cel·lulars més gruixudes que les restants cèl·lules de la medul·la. Les parets cel·lulars de les cèl·lules del protoxilema desvien la llum polaritzada a uns 1'5cm de l'àpex. Successivament i en direcció centripeta, maduren altres elements vasculars el diàmetre dels quals augmenta gradualment (Làm.VI-1 a 3). Els últims elements, que formen part del metaxilema, tenen el diàmetre màxim comprès entre 16-21 μ m. A uns 5cm, les parets cel·lulars de la majoria de cèl·lules del feix xilemàtic presenten birefringència. Les àrees de xilema, a diferència de les de floema, s'expansionen cap a l'interior de l'arrel, ocupant parcialment la perifèria de la medul·la i formant àrees de base triangular (Làm.VI-3; Esq.3-C). En la majoria de les arrels estudiades, el nombre d'elements de cada feix fluctua entre 25 i 35 elements, tot i que en algun cas se n'han comptabilitzat uns 60. El nombre de feixos té tendència a augmentar en direcció basípeta; és freqüent observar noves àrees de xilema en la cara interna d'algun feix de floema o pròximes als flancs dels feixos de xilema preexistents (Làm.VI-3); També el nombre de feixos varia entre arrels, a 2-3cm de l'àpex: les arrels amb un diàmetre de 1-2'5mm presenten de 5 a 11 pols vasculars, essent 6 el nombre més freqüent.



Esq. 3. Esquema que mostra els canvis descrits durant el procés de maduració de l'arrel primària. A-(àpex fins a ± 0.1 mm), apex radicular, maduració dels primers elements cribrosos. B-(± 2.5 cm de l'àpex), inici d'arrels laterals, s'observen elements del xilema madurs. Endodermis amb banda de Caspari. C-(± 7 cm de l'àpex), formació del cambium i aparició dels primers elements vasculars secundaris. D-(± 11 cm de l'àpex), Xilema i floema secundaris, formació del fel·logen. C, cambium; E, endodermis; F, floema; FE, fel·logen; P, primordi arrel lateral.

Histogènesi de l'estructura secundària

La formació del càmbiu té lloc generalment a uns 6cm, si bé en alguns exemplars s'ha localitzat més pròxim, a uns 5cm o, a més distància, a 7-8cm. El càmbiu es localitza primer a la cara interna dels pols de floema, seguidament entre les zones interfasciculars i davant els pols de xilema, observant-se, a uns 9cm de l'àpex, en secció transversal, una zona cambial de forma estel·lar. Posteriorment, la formació més ràpida de xilema secundari davant els pols de floema determina que la zona cambial prengui forma circular (Làm.VI-4). Les cèl·lules cambials que originen els elements vasculars són més elongades en sentit tangencial que les que formaran el parènquima radial i axial (Làm.VI-4). Els elements traqueals tenen el diàmetre més gran comprès entre 33-43 μ m i el petit entre 25-15 μ m. El parènquima axial és paratraquel. La producció centrípeta de nous elements floemàtics determina l'obliteració del floema primari. Els elements cribrosos tenen el diàmetre més gran comprès entre 11-15 μ m i el petit entre 4-7 μ m. Davant cada àrea de floema, en la zona en contacte amb el pericicle, es formen compactes grups de fibres esclerenquimatoses (Esq. 3-D).

LÀMINA I

Figures: 1 a 4

LÀMINA I

Fotografies al MO de seccions longitudinals-medials d'apexs d'arrels primàries en creixement d'uns 25-30cm de longitud.

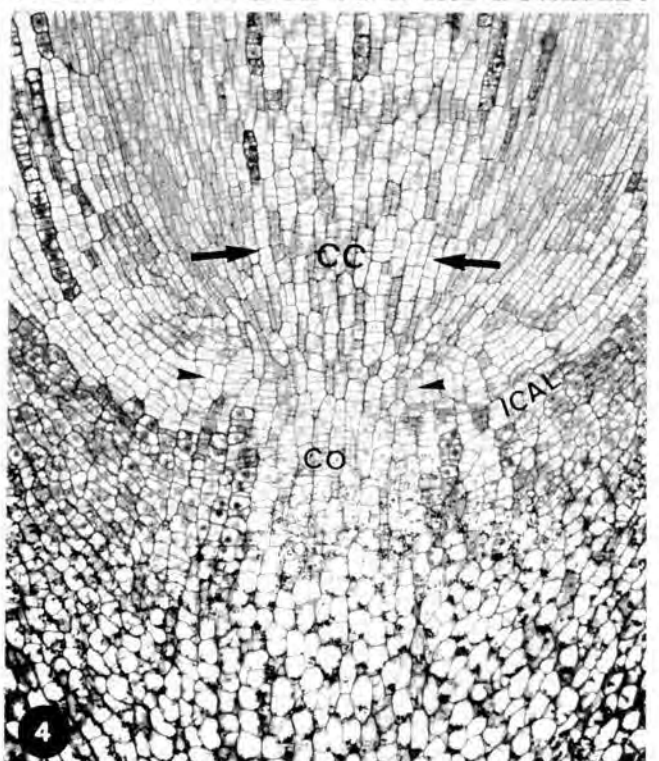
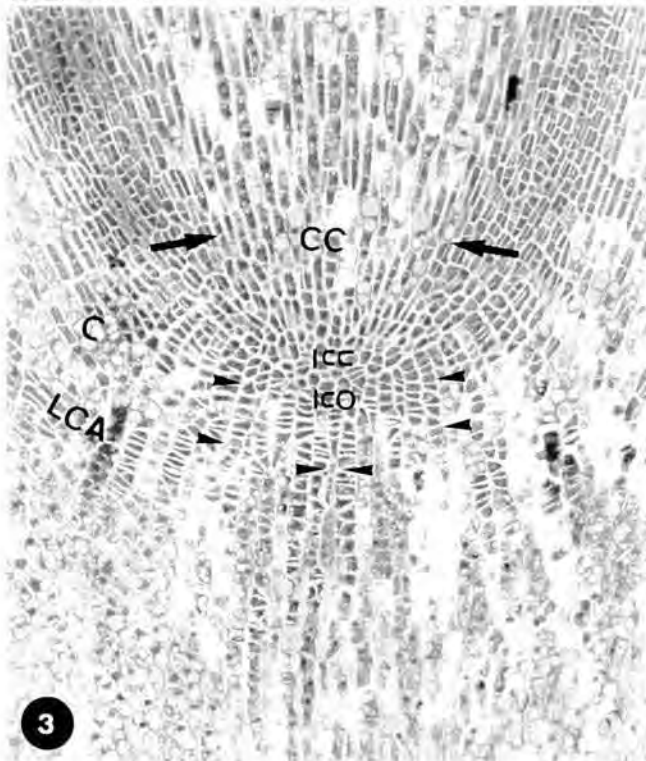
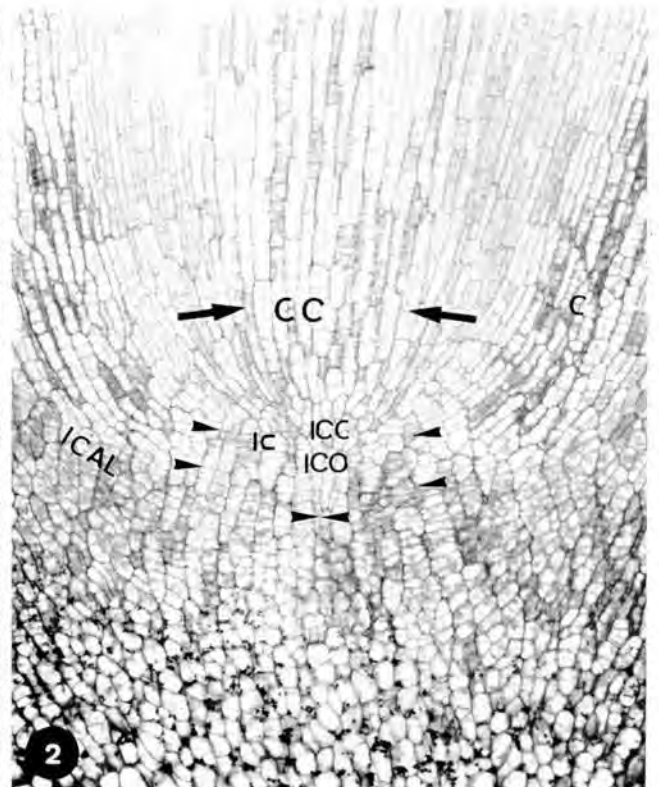
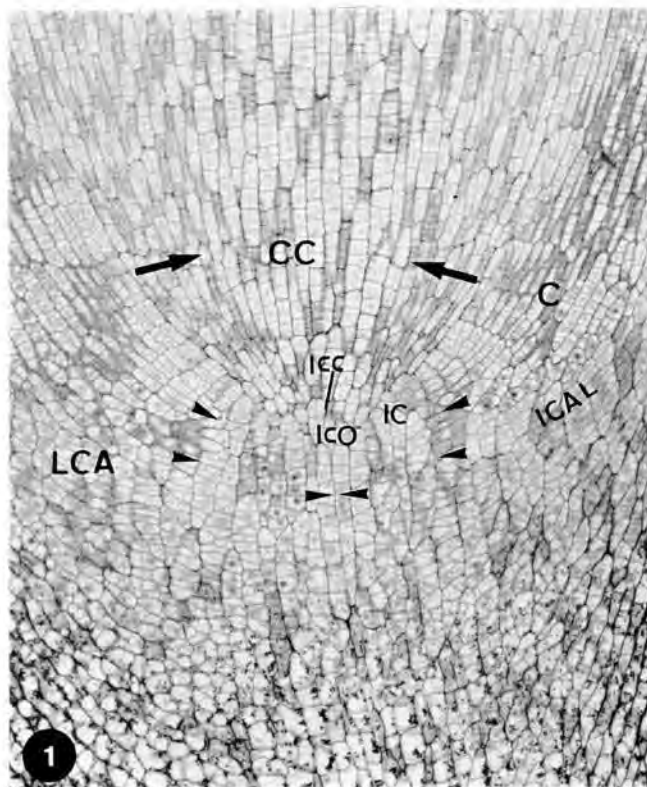
C, còrtex; CA, caliptra; CC, cilindre central; CO, columnel.la; LCA, lateral caliptra; IC, cèl.lules inicials del còrtex; ICC, cèl.lules inicials del cilindre central; ICO, cèl.lules inicials de la columnel.la; ICAL, cèl.lules inicials de la caliptra lateral.

Fig.1-Observi's els quatre grups de cèl.lules inicials localitzats en la part més distal de cada teixit: cilindre central, còrtex, columnel.la i caliptra. Les inicials del còrtex també originen les 3-4 files de cèl.lules de la perifèria de la columnel.la (caps de fletxa). Tinció: PA-Schiff. X139..

Fig.2-Igual que la fig.1. Observi's les cèl.lules inicials del cilindre en contacte amb les de la columnel.la. La columnel.la està formada per 4 files de cèl.lules. Tinció: PA-Schiff. X139..

Fig.3-Observi's el cilindre central delimitat pel futur pericicle. Les parets tangencials del pericicle són més gruixudes excepte en la zona distal del cilindre en contacte amb la columnel.la. Noti's que les cèl.lules més distals del còrtex mostren continuïtat amb les cèl.lules de la perifèria de la columnel.la. Tinció: FeSO4-Eritrosina. X139.

Fig.4-Observi's la continuïtat entre les files de cèl.lules més distals del cilindre i de la columnel.la. Tinció: PA-Schiff-blau de toluïdina. X139.



LÀMINA II

Figures: 1 a 4

LÀMINA II

Figs.1 i 3. Fotografies al MO d'àpexs d'arrels primàries en creixement d'uns 25-30cm de longitud. Fig.2 i 4. Fotografies al MO de radícules d'embrions immadurs.

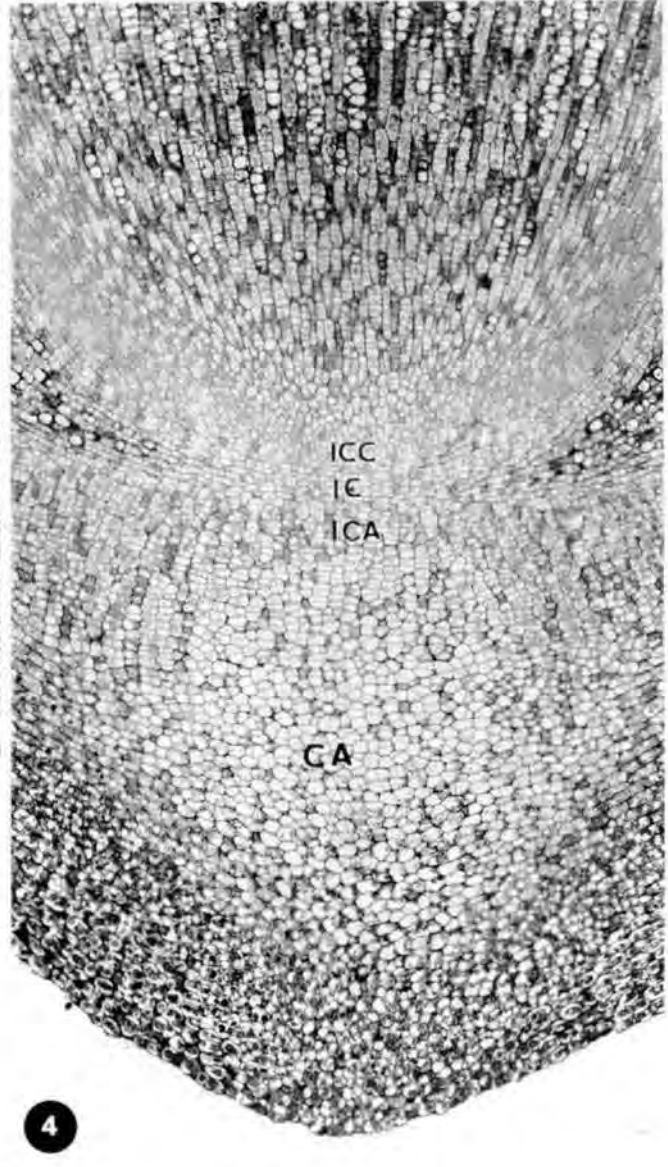
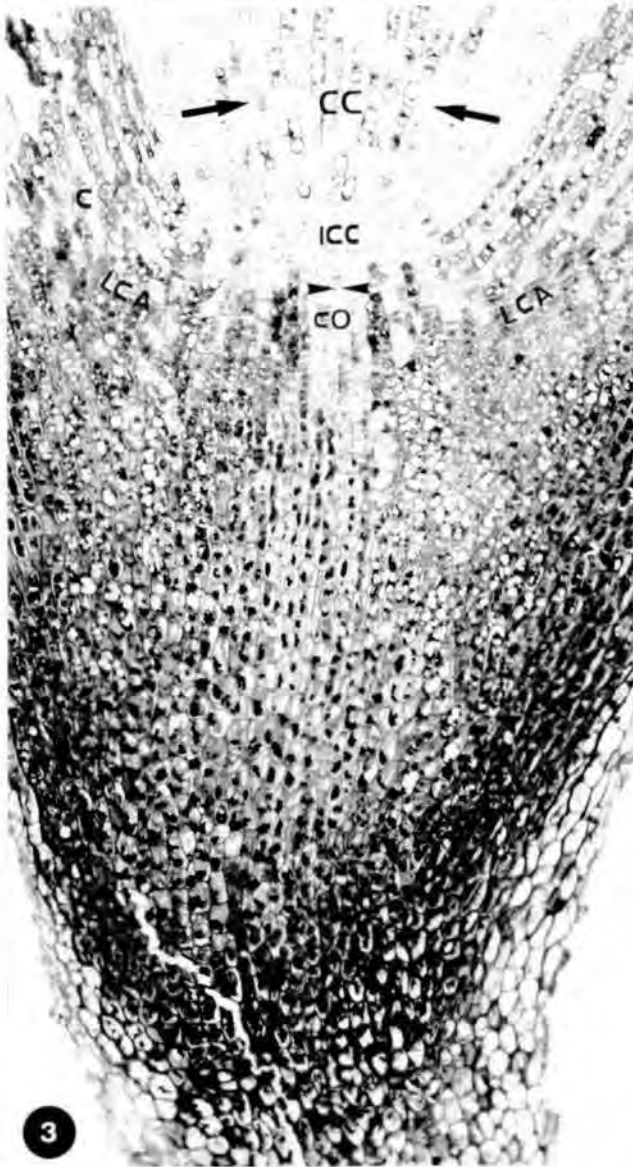
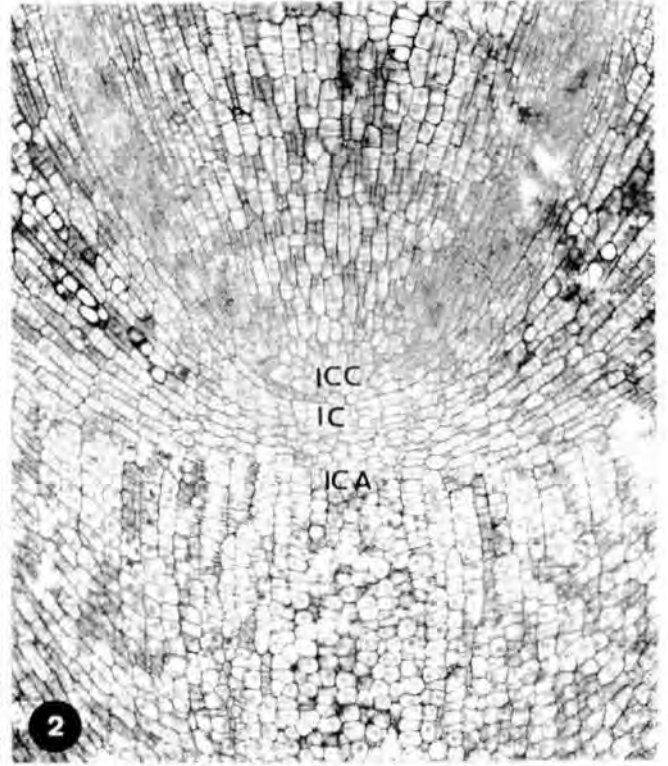
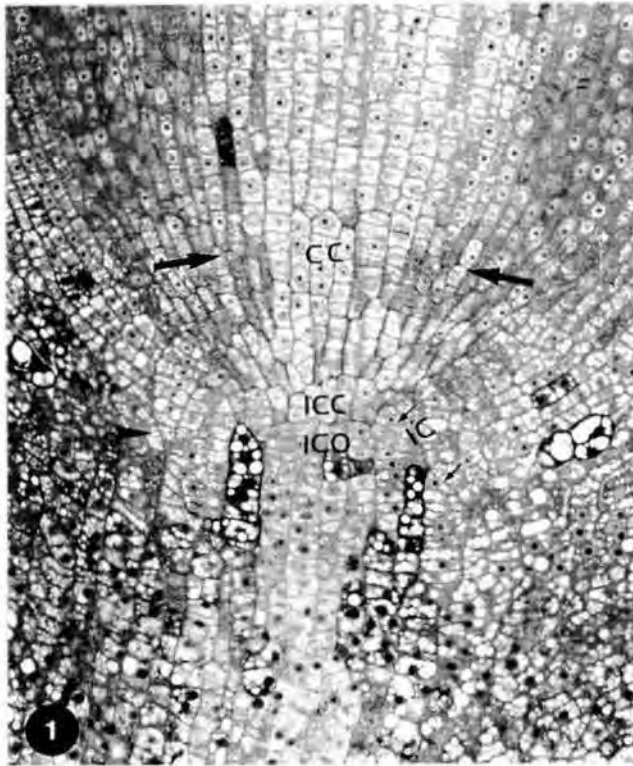
C,còrtex; CA, caliptra; CC, cilindre central; CO, columnel.la; LCA, lateral caliptra; IC, cèl.lules inicials del còrtex; ICA, cèl.lules inicials de la caliptra; ICC, cèl.lules inicials del cilindre central.

Fig.1-Àpex arrel primària, secció longitudinal quasi medial. Observi's la contribució de les cèl.lules inicials del còrtex en la formació de les 3-4 files de cèl.lules perifèriques a la columnel.la (cap de fletxa). Fixi's amb les cèl.lules del còrtex de forma triangular, situades en la zona de les inicials (fletxetes). Noti's que les cèl.lules inicials del cilindre central estan en contacte amb les inicials de la columnel.la. Es tracta d'un meristema de tipus obert. Tinció: tionina. X210.

Fig.2-Radicula, secció longitudinal quasi medial. Les cèl.lules inicials del còrtex es situen entre les inicials del cilindre i de la caliptra. Noti's que no s'observa continuïtat entre les inicials del còrtex i de la caliptra. Es tracta d'un meristema de tipus tancat. Tinció: PA-Schiff. X139.

Fig.3-Àpex arrel primària, secció longitudinal quasi medial. En la caliptra es distingeix la zona central o columnel.la i la zona lateral. Fixi's amb l'acusada polaritat que presenten els orgànuls de les cèl.lules de la columnel.la; els amiloplasts es troben agrupats en la part latero-basal de la cèl.lules. Tinció: FeSO₄-PA-Schiff. X105.

Fig.4-Radicula, secció longitudinal quasi medial. La caliptra no presenta columnel.la. Fixi's que de 4 a 5 capes de cèl.lules formen les inicials del còrtex i no intervenen en la formació de la caliptra. Tinció: PA-Schiff. X105.



LÀMINA III

Figures: 1 a 4

LÀMINA III

Fotografies al MO de seccions longitudinals-medials d'apexs d'arrels primàries en creixement d'uns 25-30cm de longitud.

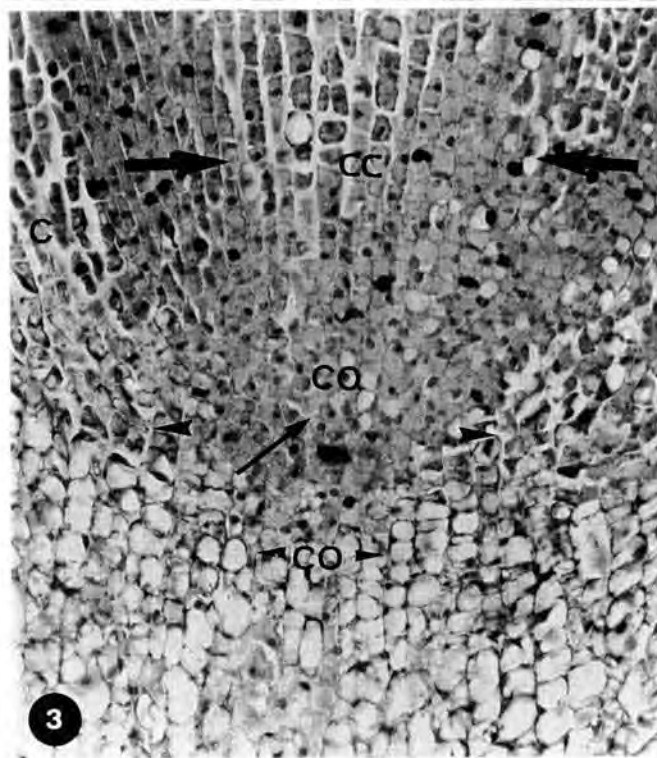
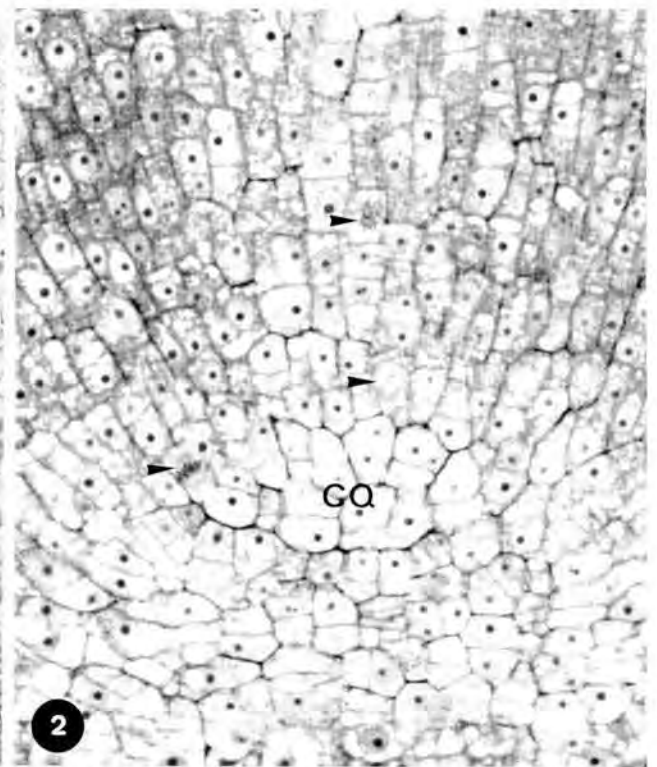
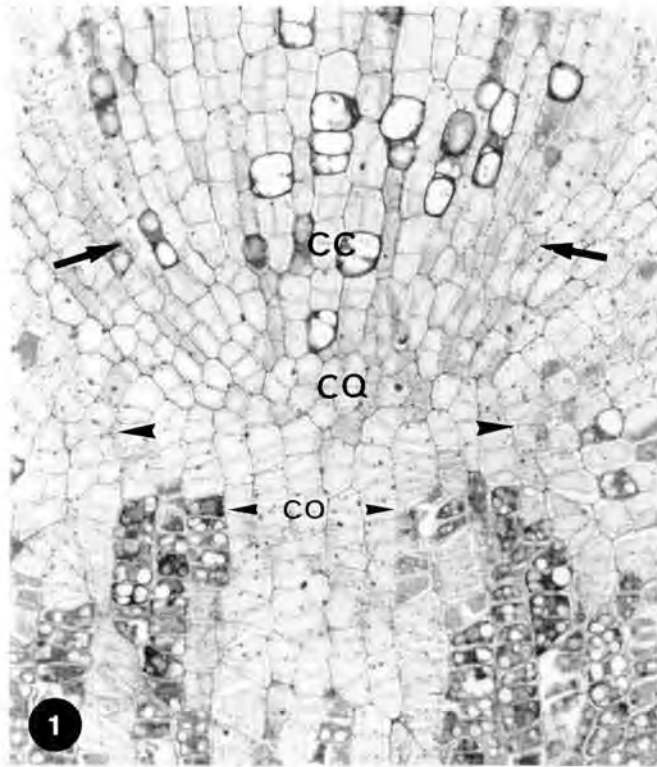
CC, cilindre central; CO, columnel.la; CQ, centre quiescent; LCA, zona lateral de la caliptra.

Fig.1-Observi's en la zona distal del cilindre central un grup de cèl.lules no contínues ni amb les del cilindre ni amb les de la columnel.la i de forma isiodiamètrica, que identifiquem com el centre quiescent. Els caps de fletxa assenyalen la zona perifèrica de la columnel.la. Tinció: FeSO₄-PA-Schiff. X210.

Fig.2-Secció longitudinal-tangencial. Fixi's amb el centre quiescent format per un nucli de cèl.lules delimitades per parets cel.lulars lleugerament més gruixudes . Vàries figures mitòtiques s'observen circumdant el centre quiescent (caps de fletxa). Tinció: tionina. X420.

Fig.3-Secció d'un àpex tractat amb deoxibromouridina i marcat amb antiBrdU que mostra un nucli de cèl.lules no marcades en la part més distal del cilindre, que identifiquem com el centre quiescent (fletxa). Tinció: Hematoxilina-eosina. X277.

Fig.4-Igual que la Fig.3. Fixi's amb les tres cèl.lules marcades de la zona proximal de la columnel.la. Tinció: Hematoxilina-eosina. X210.



LÀMINA IV

Figures: 1 a 6

LÀMINA IV

Fotografies al MO d'una arrel primària d'uns 25-30cm de longitud.

C, còrtex; CA, caliptra; CC, cilindre central; E, endodermis; F, floema; FE, fellogen; LCA, zona lateral de la caliptra; M, medul·la; MA, meristema apical; P, pericicle; PC, procàmbium; PF, protofloema; X, xilema

Fig.1-Secció longitudinal-medial dels 4mm últims de l'arrel. Observi's en posició terminal la caliptra, en posició subterminal el meristema radicular, i a continuació la zona de diferenciació i maduració tissular. Tinció: tionina. X55.

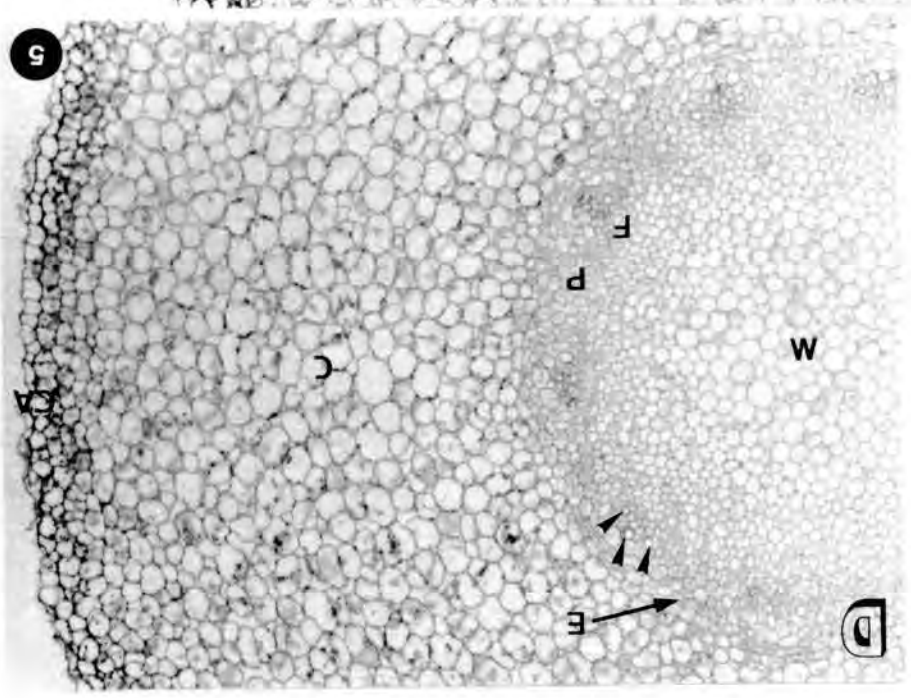
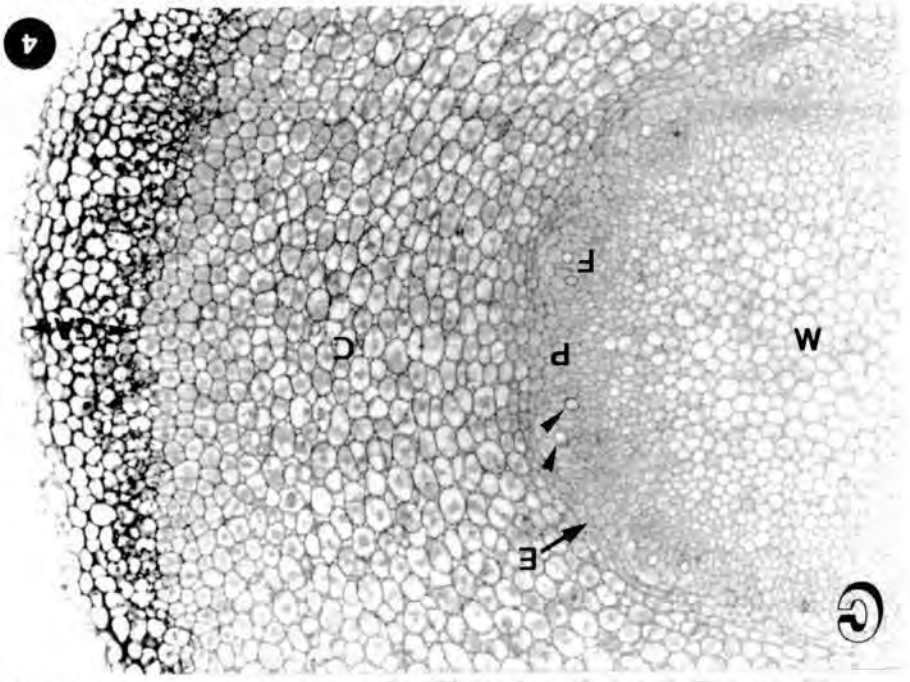
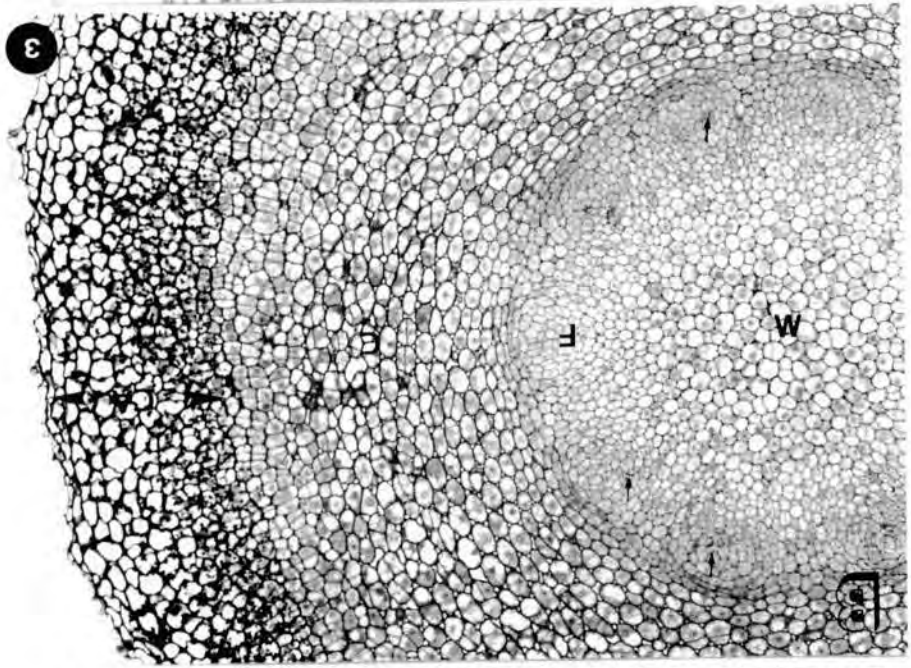
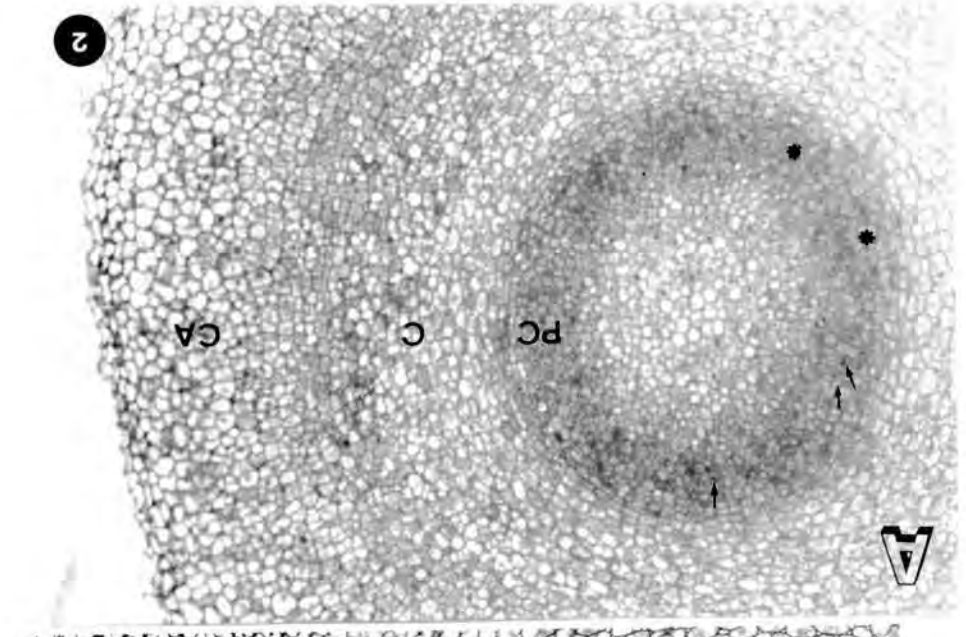
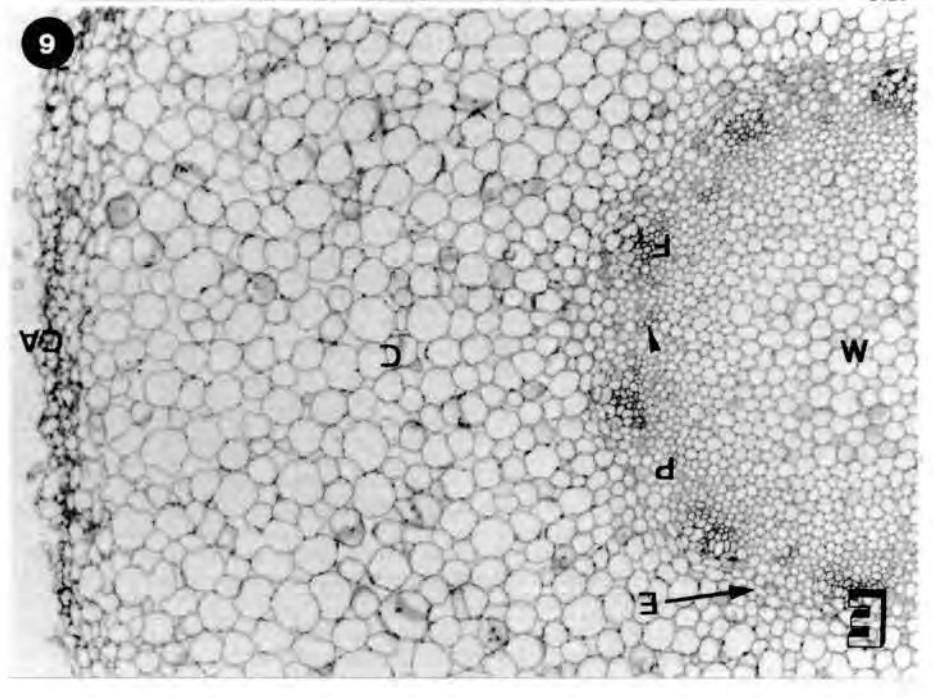
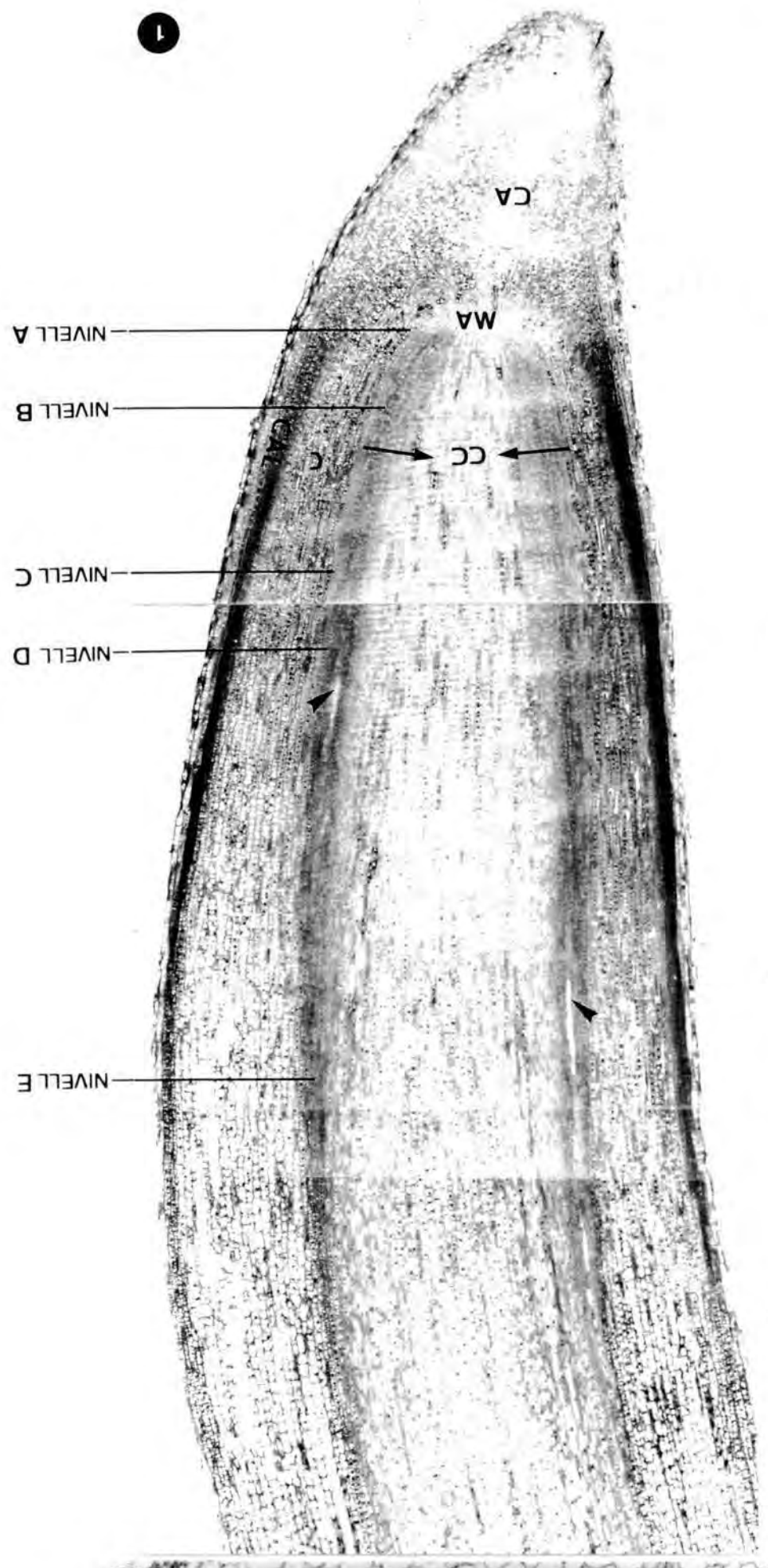
Fig.2-Secció transversal a unes 70µm de les inicials. En el procàmbium s'observen unes zones de cèl·lules sensiblement més basòfiles que corresponen a les futures àrees de floema (asteriscs); fixi's amb les figures mitòtiques (fletxetes). Observi's també que el procàmbium deixa en el seu interior una conspicua medul·la. A aquest nivell és difícil determinar el límit entre el còrtex i la caliptra lateral. Tinció: Hematoxilina. X139.

Fig.3-Secció transversal a unes 300µm de les inicials on s'observen les futures àrees de floema; continuen observant-se moltes figures mitòtiques (fletxetes). Vegi's el ja evident límit entre el còrtex extern i la caliptra. Tinció: PA-Schiff. X139.

Fig.4-Secció transversal a unes 800µm de les inicials. Observi's en les àrees de floema dos elements del protofloema (caps de fletxa). Tinció: PA-Schiff. X139.

Fig.5-Secció transversal a unes 1000µm de les inicials. Observi's de 3 a 4 elements del protofloema en cada àrea de floema (caps de fletxa). Tinció: PA-Schiff. X139.

Fig.6-Secció transversal a unes 2300µm de les inicials. Fixi's que el nombre d'elements del floema ha augmentat considerablement i que en les zones interfloemàtiques en contacte amb el pericicle comencen a observar-se els primers elements del protoxilema (cap de fletxa). Tinció: PA-Schiff. X139.



LÀMINA V

Figures: 1 a 4

LÀMINA V

Fotografies al MO d'una arrel primària d'uns 25-30cm de longitud.

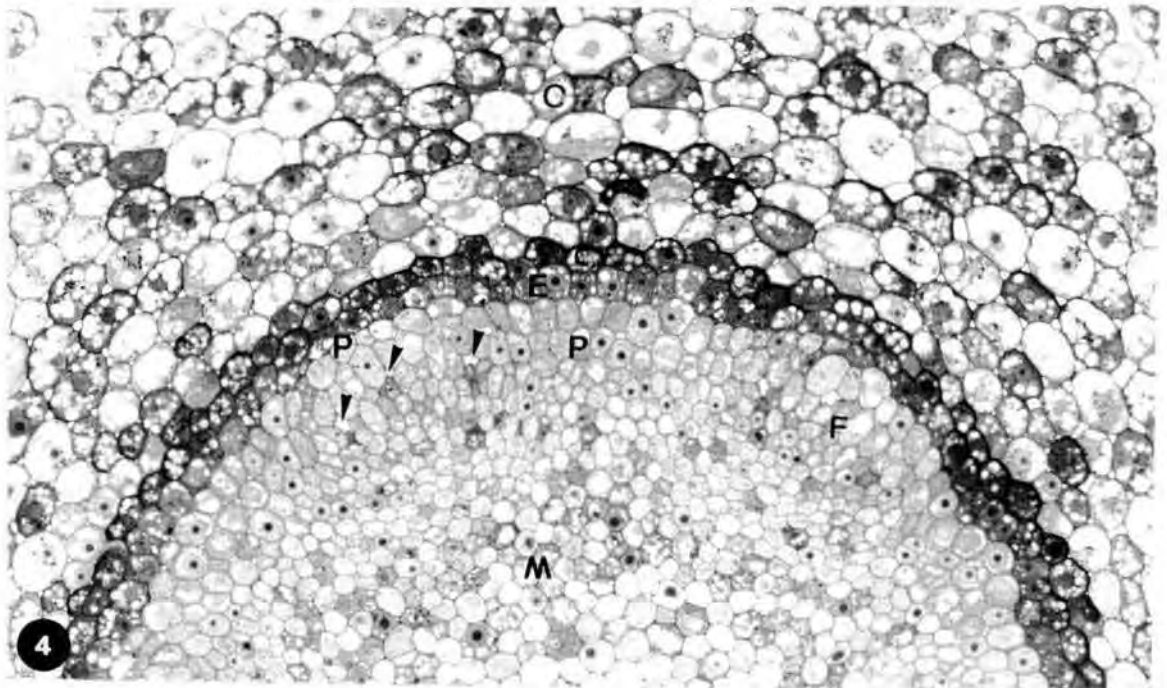
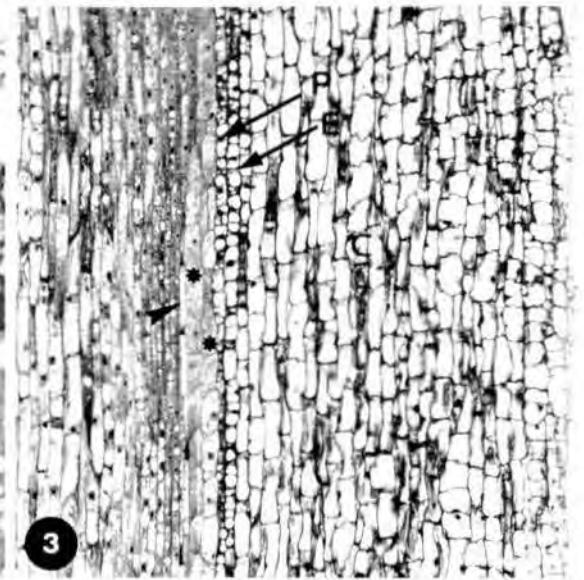
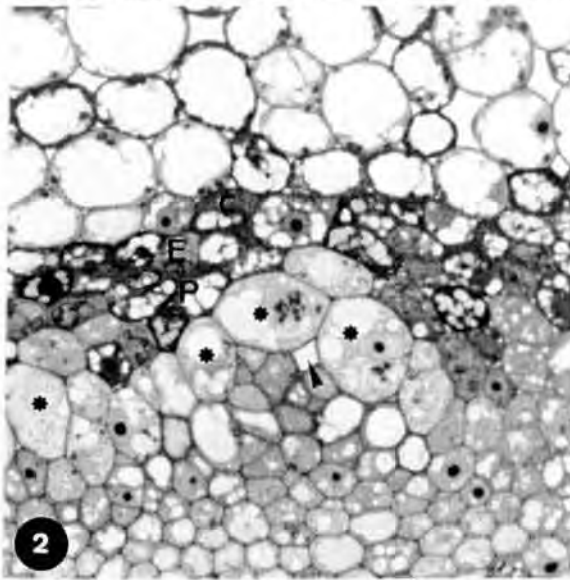
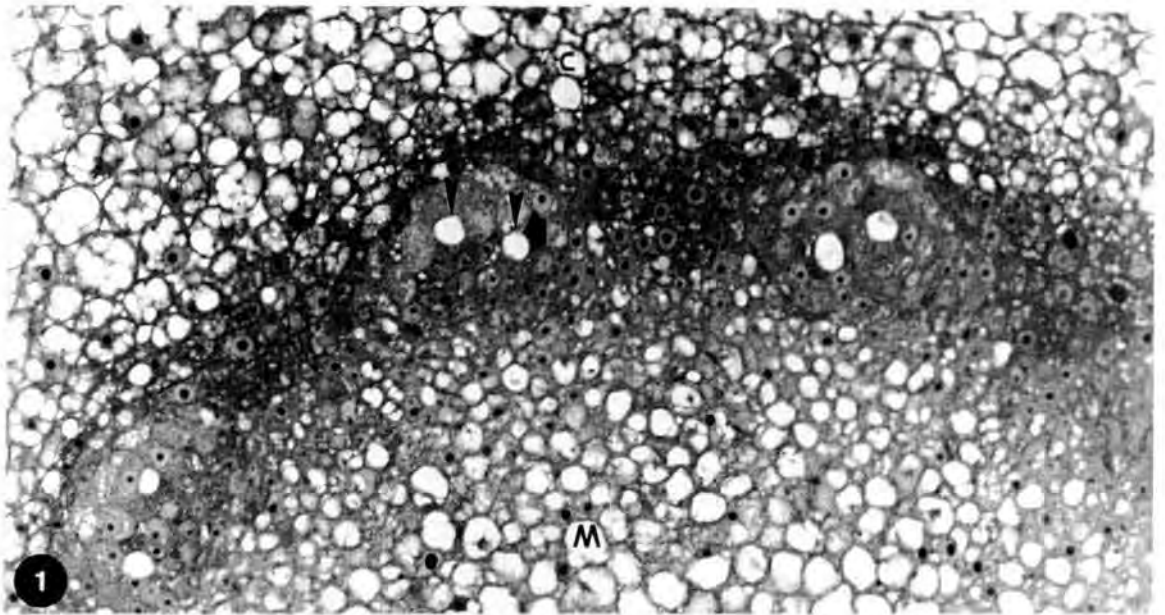
C, còrtex; E, endodermis; F, floema; M, medulla; P, pericicle; PF, protofloema; X, xilema.

Fig.1-Secció transversal a unes 850µm de les cèl.lules inicials. Observi's en cada àrea de floema dos elements del protofloema que contrasten per l'aspecte buit del citoplasma (caps de fletxa). Tinció: tionina. X336.

Fig.2-Secció transversal a unes 1000µm de les cèl.lules inicials. Fixi's amb el tamany de les cèl.lules del pericicle (asteriscs) que envolten parcialment els elements del protofloema (caps de fletxa). Observi's que les cèl.lules de la endodermis i algunes cèl.lules del pericicle (capa externa) i còrtex adjacent presenten tanins. Tinció: Blau metil. X139.

Fig.3-Secció longitudinal a unes 1000µm de les cèl.lules inicials. Observi's els elements del protofloema, d'aspecte buit (caps de fletxa), i les cèl.lules més extenses del pericicle (asterisc). Tinció: tionina. X105.

Fig.4-Secció transversal a unes 1500µm de les cèl.lules inicials. Observi's el cilindre central delimitat per les cèl.lules de l'endodermis i de la capa adjacent del còrtex, que presenten tanins. Noti's que en les àrees de floema el pericicle està format per dues capes de cèl.lules mentre que en les zones interfloemàtiques per 3-4 capes. En cada àrea de floema s'observen 3 elements del protofloema (caps de fletxa). Tinció: blau de metil. X277.



LÀMINA VI

Figures: 1 a 4

LÀMINA VI

Fotografies al MO de seccions transversals a diferents nivells d'una arrel primària d'uns 25-30cm de longitud.

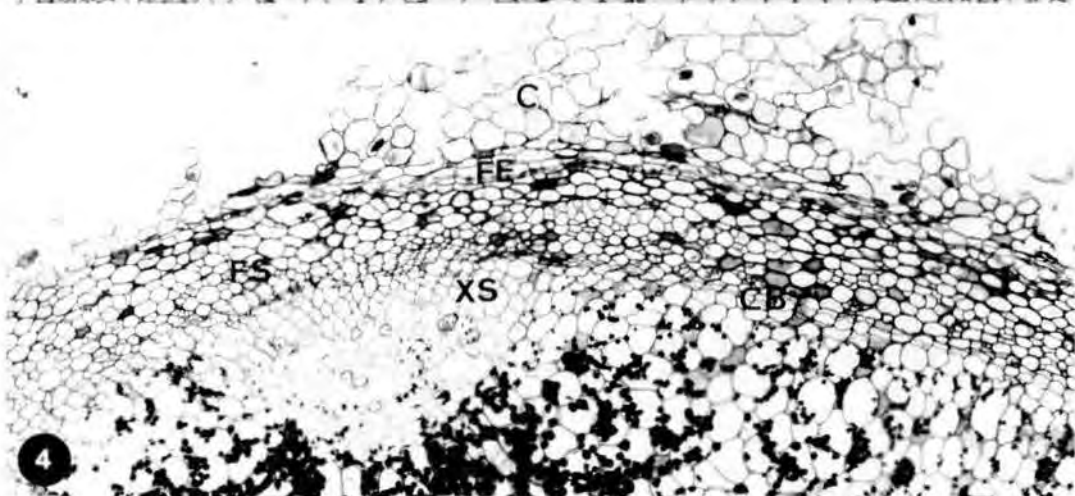
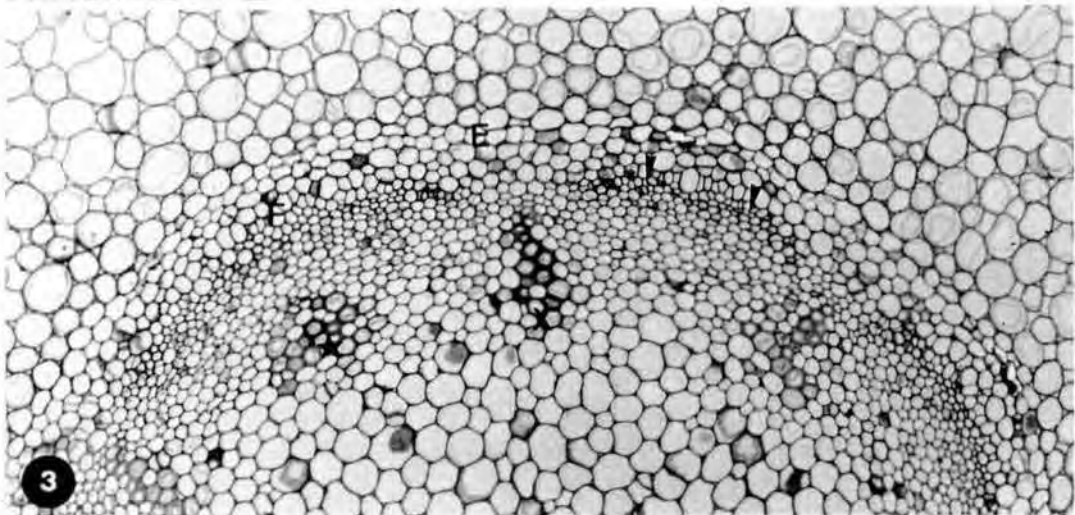
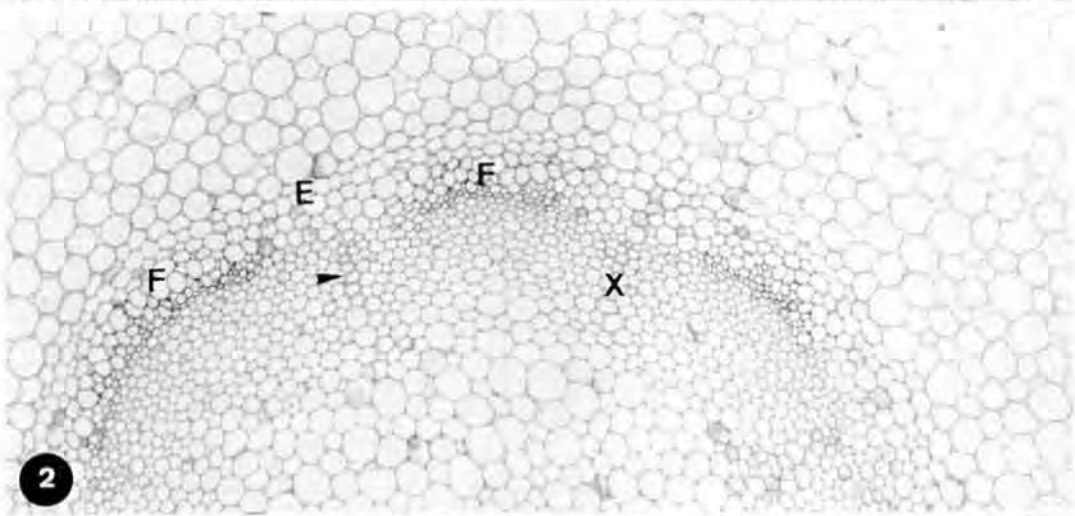
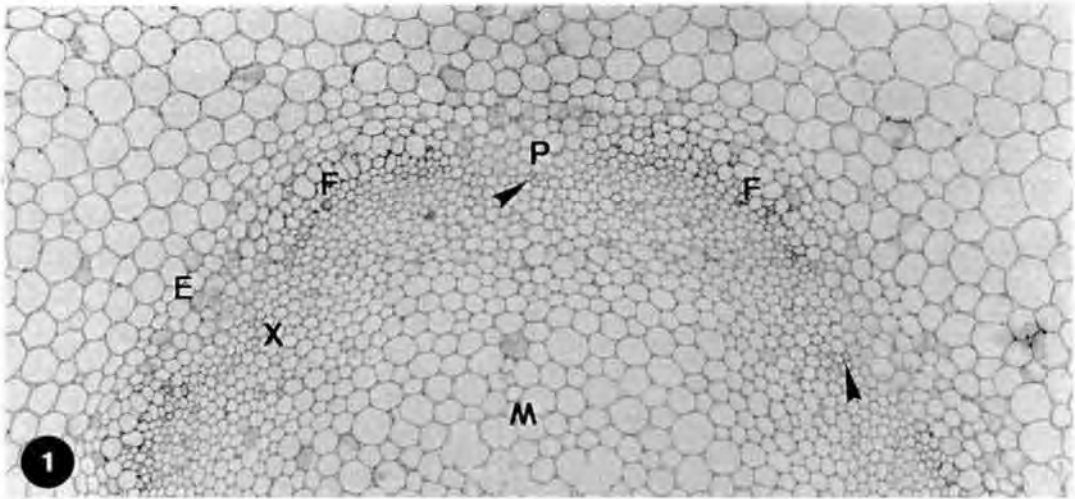
C, còrtex; CB, càmbium; CC, cilindre central; E, endodermis; F, floema; FE, fel.logen; FS, floema secundari; M, medul.la; P, pericicle; X, xilema; XS, xilema secundari.

Fig.1-Secció a uns 1'5cm del meristema apical. Observi's els pols de floema alternats amb els de xilema. En els pols de xilema s'observen de 2 a 3 elements protoxilemàtics (caps de fletxa). Noti's la forma apaisada que prenen els feixos de floema degut a la diferenciació dels elements en sentit tangencial. Tinció: PA-Schiff. X139.

Fig.2-Secció a uns 2cm del meristema apical. Observi's la maduració d'altres elements del xilema en direcció centrípete. Tinció: PA-Schiff. X139.

Fig.3-Secció a un 3,7cm del meristema apical. Observi's en les àrees de floema la maduració de nombrosos elements del metafloema de menor diàmetre (caps de fletxa), i en les àrees de xilema d'elements del metaxilema de major diàmetre. Fixi's amb la formació de nous feixos de xilema internament a les àrees de floema (estrella). Tinció: PA-Schiff. X139.

Fig.4-Secció transversal a uns 12cm de l'àpex. Observi's la diferenciació de xilema secundari i de floema secundari a partir del càmbium. Fixi's en l'estat degradat del còrtex que progressivament es va desprenent. Noti's la presència de midó en les cèl.lules de la medul.la. Tinció. PA-Schiff. X139.



DISCUSSIÓ

Organització del meristema radicular

La formació de l'arrel primària comporta en *Q.suber* a l'igual que en altres espècies com *Ipomoea purpurea* (Seago, 1971), *Malva sylvestris* (Byrne i Heimsch, 1970a), i, en general, en les espècies del gènere convolvulaceae (Seago i Heimsch, 1969) la reorganització del meristema radicular. El meristema radicular de *Q.suber* que durant la fase de maduració de l'embrió manifesta una organització de tipus tancat -tres capes de cèl.lules inicials-, esdevé obert durant el creixement de l'arrel gràcies a les cèl.lules del còrtex que contribueixen en la formació de la regió perifèrica de la caliptra. En algunes espècies es relaciona la reorganització del meristema amb l'estat de creixement de l'arrel, observant-se, de nou, la reversió del meristema a tancat, quan l'arrel ha assolit una certa longitud; en altres espècies, en canvi, sembla mantenir-se el tipus d'organització present en l'embrió durant tot el desenvolupament de l'arrel (Armstrong i Heimsch, 1976). La transició del meristema de tancat a obert també pot tenir lloc a l'inversa, és el cas, per exemple, de *Zea mays*, que presenta el meristema obert en estat embrionari i, en canvi, tancat quan l'arrel està desenvolupant-se (Clowes, 1981).

Els resultats per indentificar el centre quiescent en *Q.suber*, obtinguts mitjançant la incorporació de la BrdU coincideixen amb els obtinguts en altres espècies -per exemple *Euphorbia esula* (Raju i col., 1976)- utilitzant timidina tritiada i posterior autoradiografia amb el mateix temps d'incubació. En canvi, la tècnica immunocitoquímica emprada en aquest treball presenta certs avantatges enfront de la radioactiva: necessita menys utilitatge, requereix menys temps per obtenir-se els resultats (s'estalvia el revelat, ± 1 mes) i, també, perquè s'eviten possibles alteracions provocades per lesions en les cèl.lules a conseqüència de la radiació emesa per l'isòtop radioactiu (Clowes, 1961).

Els resultats del marcatge amb Ac, que permeten identificar el centre quiescent, coincideixen amb les observacions morfològiques; si bé, segons el

marcatge amb Ac més cèl.lules del cilindre central formarien part del centre quiescent. Possiblement, aquesta variació sigui atribuïble al temps d'incubació i a la durada del cicle cel.lular. D'acord amb Phillips i Torrey (1971), suposem que existeix una gradació en la durada del cicle cel.lular entre les cèl.lules situades en el centre i en la perifèria del meristema; així, probablement, el nucli de cèl.lules situat en el centre del meristema correpon a les cèl.lules amb el cicle cel.lular més llarg i que s'identifiquen més fàcilment per la seva morfologia com a centre quiescent. En canvi, les cèl.lules perifèriques a aquest nucli tenen, possiblement, el cicle cel.lular més curt però, alhora, suficientment llarg per no incorporar BrdU amb el temps d'incubació utilitzat i per això, també, es detecten com constituents del centre quiescent. Seria interessant comprovar si amb temps d'incubació superiors a 24h els resultats obtinguts amb el marcatge amb Ac, s'ajusten totalment amb les observacions morfològiques.

Però, al menys pel que nosaltres hem pogut observar, només les cèl.lules inicials del cilindre central i algunes derivades semblen formar part del centre quiescent, ni les cèl.lules del còrtex ni de la columna contribuirien en la seva formació. Ara bé, no descartem la possibilitat que a l'igual que en altres espècies (com *Cucurbita pepo* (Clowes, 1982), o *Malva sylvestris* (Byrne i Heimsch, 1970b)) el tamany del centre quiescent variï amb el creixement de l'arrel.

Diferenciació i maduració vascular

El patró general de diferenciació del sistema vascular en l'arrel de crit en *Q.suber*, és similar al d'altres plantes estudiades, tant monocotiledònies com dicotiledònies per ex.: *Hordeum vulgare* (Heimsch, 1951), *Cassia* (Hayat i Heimsch, 1963) i *Pisum sativum* (Torrey, 1955), i en algunes gimnospermes com *Abies procera* (Wilcox, 1954) o *Libodcedrus decurrens* (Wilcox, 1962). La diferenciació dels elements vasculars té lloc en direcció acròpeta, els primers elements del floema, protofloema, maduren més aprop de l'àpex que els del xilema i la maduració és centripeta. En el grup de les quercínees s'han dut a terme estudis similars en les quercínees californianes *Q.alba* i *Q.velutina* (Mogensen, 1967), observant-se una gran similitud amb el patró de diferenciació vascular del *Q.suber*, principalment en el cas de *Q.alba*. A diferència de *Q.velutina*, en *Q.alba* i en *Q.suber* destaca l'alternança dels feixos de floema i xilema, i la variació en el nombre d'aquests tant a diferents nivells d'una mateixa arrel com en arrels diferents. Segons Luxová (1991), es tendeix a reduir

el nombre de feixos en direcció acròpeta, degut a la disminució de les divisions longitudinals en el meristema apical. Per Luxová (1991), aquesta reducció no comporta la disminució de la conductivitat hidràulica a l'augmentar paral·lelament el diàmetre dels elements vasculars. Així mateix, Feldman (1984), relaciona la variació del nombre de feixos amb el diàmetre del cilindre vascular que alhora vindria regulat pel tamany del centre quiescent i del meristema proximal.

CAPÍTOL II.b:
FORMACIÓ D'ARRELS LATERALS

INTRODUCCIÓ

La complexitat del sistema radicular augmenta progressivament a mesura que la planta creix, per proporcionar-li una base de sosteniment apropiada i per tal d'optimitzar la relació nutricional amb el sòl. El desenvolupament de les arrels laterals seguint un patró característic, porta a la formació d'una arquitectura de les arrels pròpia de l'espècie (Fitter, 1991).

L'anatomia del sistema radicular en les quercínees ha estat objecte d'estudi per diversos autors. Entre ells destaquen l'exhaustiu treball de Lyford (1980) en *Q. rubra*, el de Harmer (1990) en *Q. robur*, i el de Holch (1931) en *Q. macrocarpa* (vegi's capítol IV). En canvi, a nivell histològic les aportacions són pràcticament inexistentes si s'exceptua l'estudi de El Alaqui (1978) sobre plàntules de *Quercus suber* que inclou una breu descripció de les arrels laterals de primer ordre i, el treball de Beissalah i col. (1988) en *Q. ilex* dirigit a estudiar les arrels de regeneració i en el que també inclou una breu descripció de l'ontogènesi de les arrels laterals.

D'altra banda, la formació de les arrels laterals en el conjunt de les plantes vasculars ha motivat nombrosos treballs i ha estat objecte de revisió per McCully (1975), Peterson i Peterson (1986) i Charlton (1991). Les arrels laterals s'originen en sentit acrópeta i a diferent distància del meristema apical en funció de la taxa de creixement de l'arrel. Els primordis es localitzen principalment enfront els feixos vasculars seguint, en moltes espècies, un patró preestablert. En les plantes dicotiledònees d'arrel poliarca, els primordis solen situar-se enfront dels feixos de xilema, mentre que en les monocotiledònies ho fan enfront del floema. Els primordis de les arrels laterals es formen bàsicament a partir del pericicle, ara bé en moltes espècies també s'observa la participació de l'endodermis encara que, generalment, amb caràcter transitori. Finalment, és important remarcar que s'estableix una perfecte connexió anatòmica i fisiològica de l'arrel lateral i l'arrel mare, destacant la continuïtat del sistema vascular i de l'endodermis.

En aquest capítol ens proposem estudiar la histogènesi de les arrels laterals de primer ordre del *Quercus suber*, amb especial atenció a l'origen i desenvolupament dels primordis i a la connexió dels teixits de l'arrel lateral amb l'arrel mare.

RESULTATS

Arrels de primer ordre

Les arrels laterals de primer ordre emergeixen a 5-6 cm de l'apex de l'arrel primària en direcció perpendicular. Són de color blanquinós i turgents, i amb el temps esdevenen marronoses i fràgils. En les plàntules de 30 a 45 dies, el diàmetre de les arrels laterals és inferior al mil·límetre i la seva longitud oscil·la entre 2 i 4 cm, encara que, algunes poden sobrepassar els 6cm (Làm.I-1). La distribució sol ser en grups de 2 a 4 arrels, generalment alternats i distanciat al voltant d'un centímetre. Els grups d'arrels solen coincidir amb les zones convexes de les suaus ondulacions de l'arrel principal (Làm.I-3). Entre els grups també s'observa alguna arrel sola.

Durant els primers 3-4 mesos no s'observen en la plàntula arrels de primer ordre que dominin sobre les restants (Làm.I-1). Únicament quan l'apex de l'arrel primària es deteriora o és seccionat experimentalment s'originen en la zona lesionada de 3 a 5 arrels codominants de diàmetre superior a 1 mm i, en general, amb la mateixa orientació que l'arrel primària (Làm.I-2). Les arrels de primer ordre originen arrels de segon ordre amb un diàmetre que oscil·la entre 0,05 i 0,5 mm i d'una longitud de 1 a 10mm (Làm.I-1).

Les arrels laterals tenen de 4 a 6 feixos vasculars alternats, si bé la majoria són tetraques (Làm.II-1). Els elements del metaxilema ocupen tota la zona central del cilindre i no s'observa parènquima medul·lar. El pericicle és mono o diseriàt enfront els feixos de xilema, i monoseriàt enfront el floema. L'endodermis no presenta diferències en relació a l'arrel primària (Làm.II-2) (Veure capítol III). Interiorment a l'epidermis, que presenta nombrosos tricomes, s'observa l'exodermis que també es suberifica (Làm.II-1). En conjunt, l'estructura de les arrels laterals en l'estat de plàntula no difereix substancialment de la de l'arrel primària.

Ontogènesi

Els primordis de les arrels laterals es formen en sentit acròpeta i es comencen a observar a 2'5-3'5 cm de l'apex. En aquest nivell, el cilindre vascular de l'arrel

primària consta de proto i metaxilema, i proto i metafloema; el pericicle és diseriatiat enfront el floema i tri o tetraseriat enfront el xilema. En general, s'observen en una mateixa secció de 2 a 3 primordis en estadis de maduració pròxims i enfront feixos de xilema consecutius (Làm.III-1).

Per descriure la formació de la nova arrel lateral distingim 3 estadis: el primer, abasta des de l'inici de les primeres divisions del pericicle fins a la formació d'una petita protuberància hemisfèrica; en el segon, el primordi s'estén adquirint forma piramidal; i en el tercer, l'arrel assoleix més de la meitat del seu recorregut pel còrtex, essent l'etapa de més intensitat histogenètica. Finalment l'arrel lateral emergeix.

Primer estadi:

Els primordis es formen a partir de les cèl.lules adjacents del pericicle i l'endodermis localitzades enfront els pols de xilema on s'originen. Inicialment, les cèl.lules del pericicle s'estenen i passen de mesurar 14-19µm a 19-24µm radialment, esdevenen més basòfiles i el nucli es fa més conspicu. Comencen a dividir-se principalment en sentit periclinal, encara que algunes es divideixen obliquament o anticlinalment (Làm.III-2). Tot seguit les cèl.lules de l'endodermis registren un lleuger increment de la basofília, augmenten de tamany de manera similar a les cèl.lules del pericicle i també es divideixen, principalment les cèl.lules centrals, amb predomini de les divisions periclinals (Làm.III-3). Alhora, les cèl.lules del pericicle es divideixen novament, ara en sentit anticlinal, formant-se per cada cèl.lula inicial grups de quatre cèl.lules (Làm.IV-1). En aquest moment s'ha format una petita protuberància que consta de 4-6 capes de cèl.lules derivades del pericicle i orientades radialment, i 2 capes de cèl.lules derivades de l'endodermis i orientades tangencialment (Làm.IV-1). Algunes cèl.lules del còrtex adjacent (de dues a tres en secció transversal), principalment les que estan localitzades a la punta del primordi, també esdevenen més basòfiles i en alguns casos és difícil delimitar amb precisió les capes d'origen endodèrmic. La formació de la protuberància provoca la progressiva compressió de les cèl.lules del còrtex adjacent (Làm.III-3; IV-1).

Segon estadi:

Quan el primordi s'ha allargat fins a una tercera-quarta part del còrtex, es comença a manifestar una relativa organització hística amb diferències entre les parts basal i apical (Làm.IV-2).

A la part basal les cèl.lules són més vacuolitzades i, principalment les centrals, són més allargades en sentit radial. En canvi, a la part apical, les cèl.lules són més basòfiles, tenen el citoplasma dens, gairebé no estan vacuolitzades i, principalment les més centrals, presenten un nucli conspicu amb un nucleol molt aparent. En general, les cèl.lules de la part apical són més isomètriques i el seu tamany és inferior al de les cèl.lules de la part basal. Les dues (2-3) capes de cèl.lules més externes de la part apical presenten una gran abundància de grànuls PA-Schiff positius, negatius pel blau de Coomasie i pel naftol blue black-negrosin per proteïnes, possiblement es tracta de les 2-3 capes de cèl.lules derivades de l'endodermis. En el còrtex adjacent s'observen nombroses cèl.lules colapsades (Làm.IV-2).

Tercer estadi:

Quan el primordi s'ha allargat fins a ocupar més de la meitat del còrtex l'organització dels teixits es fa més evident. En aquest estadi es distingeixen una part basal, una medial i una apical (Làm.V-1 a 3).

Les cèl.lules de la part basal estan molt vacuolitzades i, principalment les situades al centre, són més estretes, més allargades i es troben disposades en files. Aparentment aquestes cèl.lules queden en continuïtat amb alguns elements del feix de xilema enfront el que s'han originat (Làm.V-3).

En la part medial destaca una zona central o futur cilindre vascular de cèl.lules estretes i elongades radialment, algunes de les quals es divideixen en sentit anticlinal, que queda delimitada, per cada banda, per 1 fila de cèl.lules més estretes i basòfiles (Làm.V-2)

En la part apical ja es distingeix la caliptra, formada per 10-13 capes de cèl.lules que progressivament, en sentit centrípet, acumulen grànuls PA-Schiff positius i es van vacuolitzant. En secció transversal, aquestes capes queden separades de la resta del primordi per 1 o 2 capes de disposició convexa i formades per cèl.lules més basòfiles que es divideixen repetidament en sentit periclinal afegint noves capes a la caliptra (Làm.V-1). Interiorment a la caliptra, es localitzen de 2 a 3 capes de cèl.lules, isomètriques de nucli prominent, que es continuen amb les cèl.lules laterals de la part medial, constituint probablement les inicials del còrtex. Finalment, es distingeix un grup de 3-4 cèl.lules també isomètriques i basòfiles, que per la seva posició central semblen correspondre's amb les inicials del cilindre vascular.

Revestint externament la caliptra i la zona medial es distingeixen 2-3 capes de cèl.lules d'aspecte buit i bastant distorsionades derivades,

provablement, de l'endodermis (Làm.V-1). En el còrtex s'observen nombroses restes de cèl.lules colapsades.

Finalment, l'arrel lateral emergeix uns 3-4 dies després d'haver-se iniciat la seva formació. En el moment d'emergir, les capes que formen el cilindre vascular, -el còrtex, el meristema apical i la caliptra encara no estan completament delimitades. Les cèl.lules de les 2-3 capes més externes que cobrien la caliptra es desprenen progressivament amb les restes de cèl.lules colapsades del còrtex.

Connexió dels teixits de l'arrel lateral amb els de l'arrel primària

L'arrel lateral es connecta al feix de xilema enfront del qual s'origina i als dos feixos de floema situats lateralment. La connexió vascular comença a fer-se evident aproximadament quan el primordi ha assolit més de la meitat del seu recorregut a través del còrtex. En aquest moment, principalment al voltant del protoxilema i, també, dels primers elements del metaxilema, algunes cèl.lules del parènquima vascular de l'arrel primària o provinents de les cèl.lules derivades del pericicle, esdevenen basòfiles i en algunes el nucli es fa més conspicu (Làm.VI-1, Là.m.VI-2). En una fase més avançada, s'observa que les parets d'aquestes cèl.lules es fan més gruixudes i es tenyeixen metacromàticament la qual cosa indica un augment de substàncies pèctiques en la paret cel.lular (Làm.VI-2). Pròximes als elements del floema de l'arrel primària també s'observen algunes cèl.lules més basòfiles i amb un conspicu nucli que formen un continu amb els futurs elements del floema de la nova arrel lateral, aquestes cèl.lules són possiblement les cèl.lules connectores del floema (Làm.VI-1 i 3).

Quan l'arrel primària presenta creixement secundari, la connexió es realitza també amb els elements derivats del cambium, observant-se cèl.lules connectores associades amb elements del xilema secundari (Làm.VII-1 i 3). En algun cas s'observa la maduració prèvia de les cèl.lules connectores procedents de les cèl.lules cambials (Làm.VII-1). En arrels laterals de 2-3cm de longitud s'observen elements de connexió madurs. La connexió amb el xilema té lloc a través de vasos curts, amb engruiximents escalariformes o escalariformes-reticulats i perforacions simples (Làm.VII-1, 2 i 3). La connexió amb el floema es fa a través d'elements cribrosos de petit tamany (Làm.VII-1). A mesura que

la primera arrel creix en gruix els elements vasculars de l'arrel lateral queden inclosos en els de l'arrel primària (Làm.VII-3).

En estat de primordi no hem observat continuïtat entre l'endodermis de l'arrel primària i de l'arrel lateral (Làm.VIII-1); però quan l'arrel lateral ha assolit més de la meitat del seu recorregut pel còrtex, s'observen de 4 a 6 cèl.lules de tipus parenquimàtic situades a la base de l'arrel lateral que semblen unir l'endodermis de l'arrel primària i la de l'arrel lateral (Làm.VIII-2). Posteriorment, quan l'arrel lateral té de 2 a 3 cm, s'ha observat que aquestes cèl.lules presenten suberina en les seves parets i, efectivament, formen un continu entre l'endodermis de l'arrel primària i la de l'arrel lateral (Làm.VIII-3 i 4).

LÀMINA I

Figures: 1 a 3

LÀMINA I

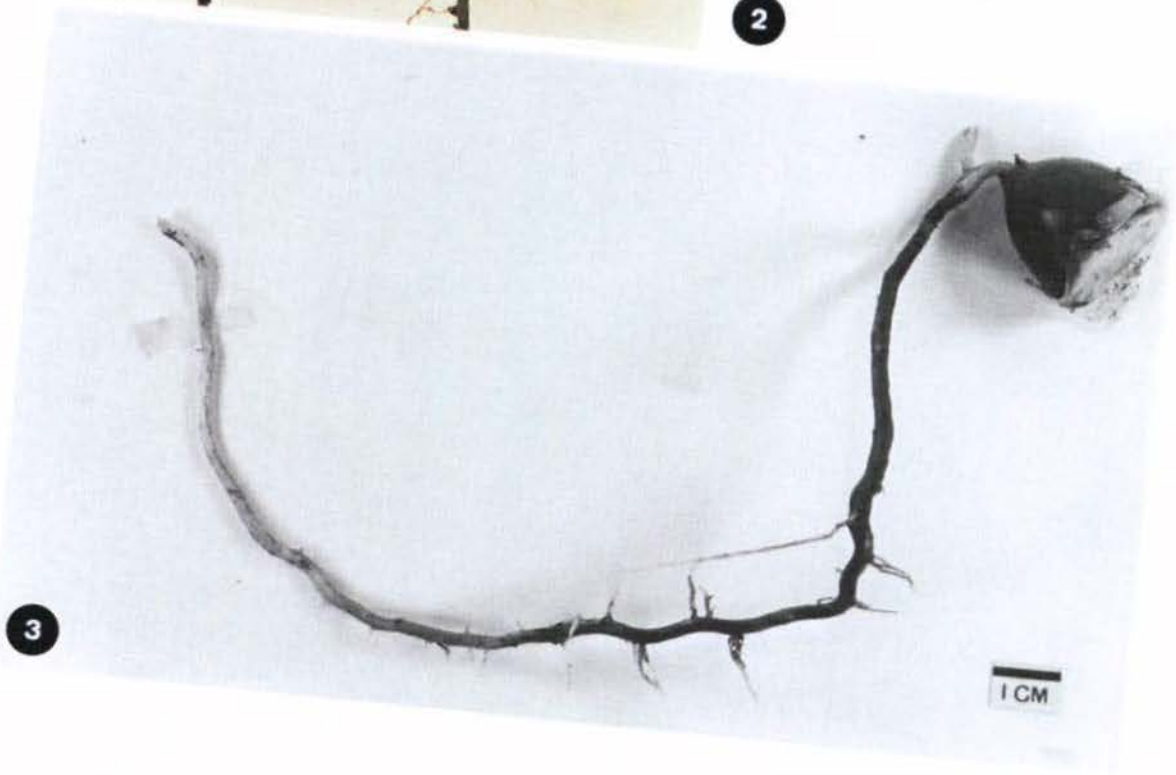
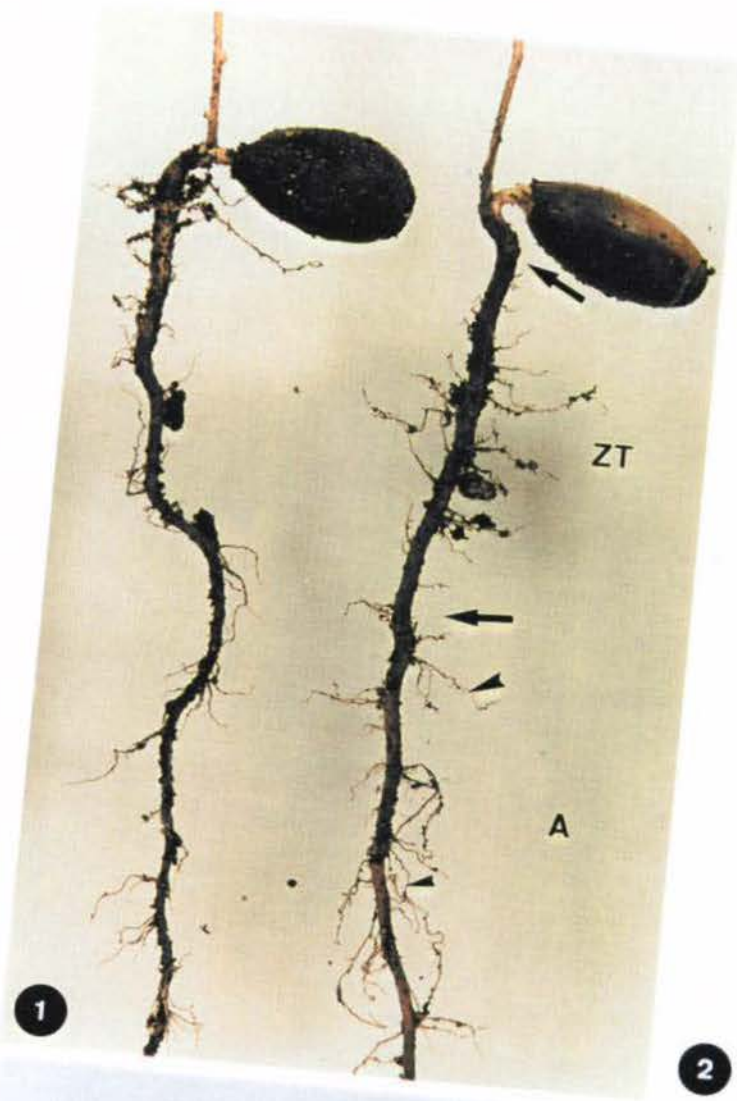
Fotografies a ull nu de plàntules de *Q.suber*.

ZT, zona de transició; A, arrel.

Fig. 1- Porció proximal del sistema radicular d'una plàntula d'uns 30 dies. Fixi's amb la dominància de l'arrel primària sobre les arrels laterals. Observi's que les arrels laterals de primer ordre han desenvolupat arrels laterals de segon ordre (caps de fletxa). X 1/2.

Fig. 2- Arrels de regeneració originades després de lesionar-se l'arrel primària. Fixi's en el gruix i la direcció, gravitropisme positiu, que presenten les dues arrels de regeneració més distals (fletxes). X 1'5

Fig. 3- Plàntula d'uns 15-20 dies on s'observa la formació de les arrels laterals en grups de 2 a 4 arrels. Fixi's que la situació dels grups d'arrels coincideix principalment amb les zones convexes de les suaus ondulacions de l'arrel primària. X2



LÀMINA II

Figures: 1 i 2

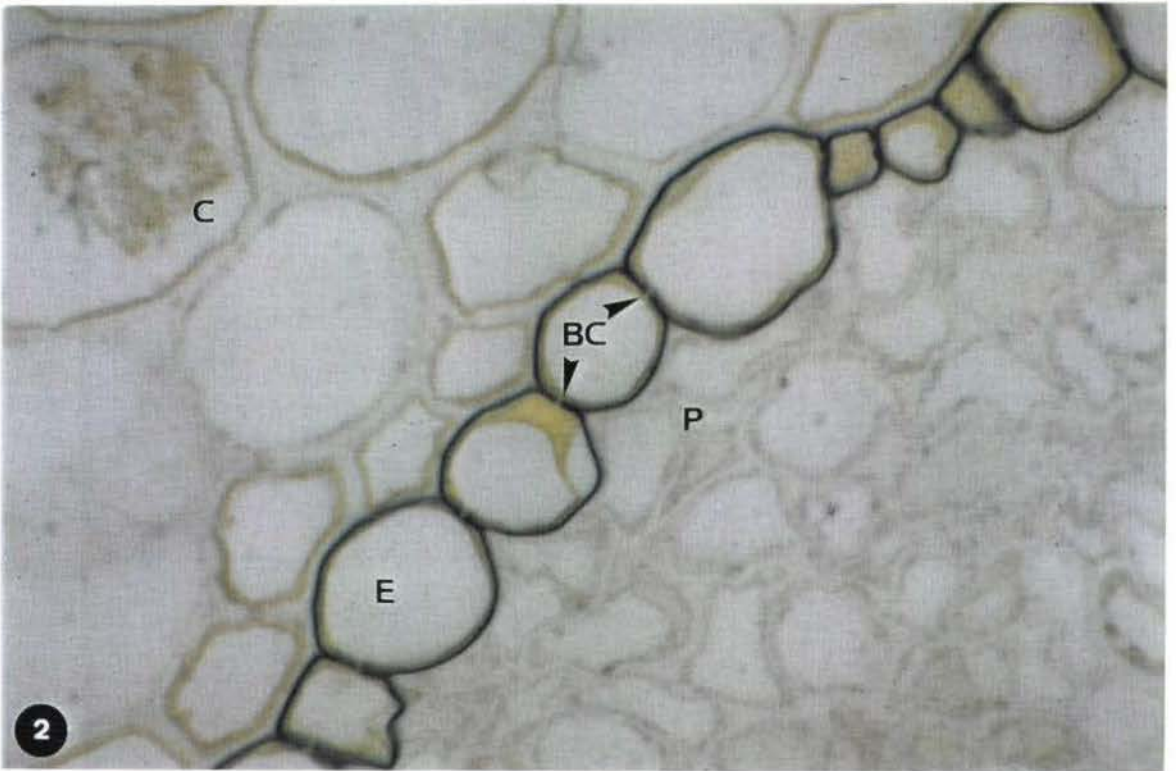
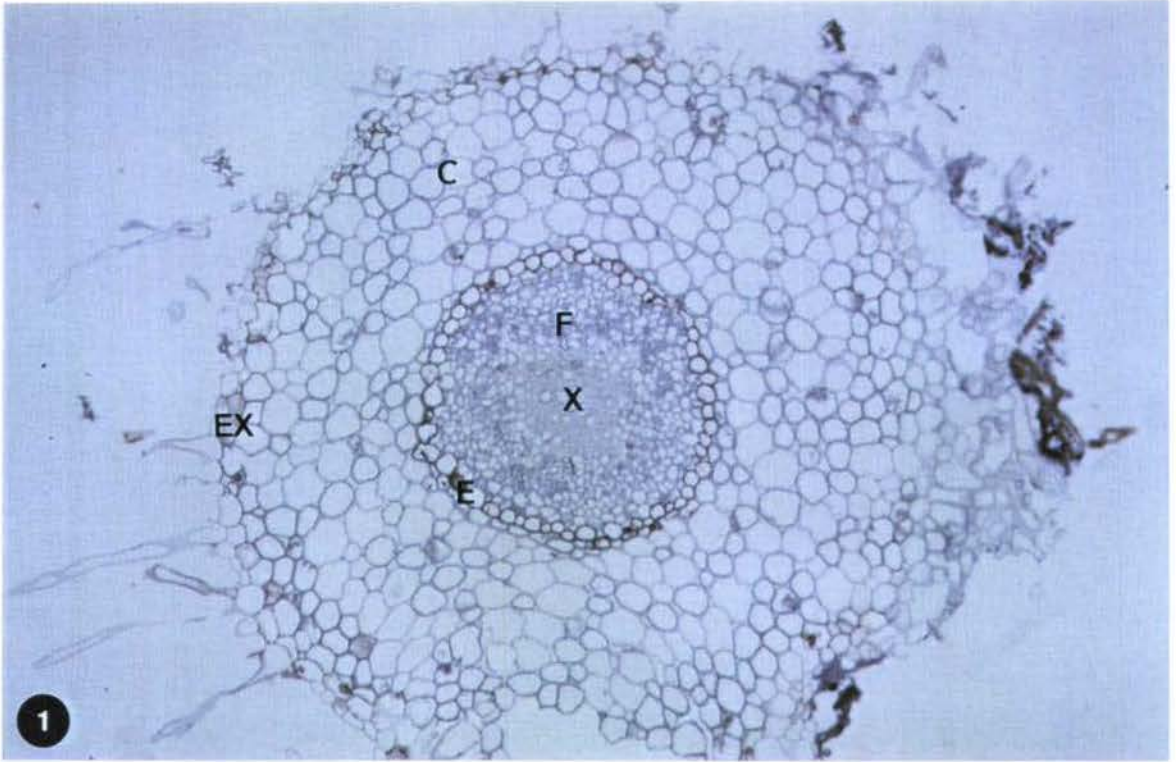
LÀMINA II

Fotografies al MO de seccions transversals d'una arrel lateral de primer ordre d'uns 2 cm de longitud.

BC, banda de Caspari; C, còrtex; E, endodermis; EX, exodermis; F, floema;
P, pericicle; X, xilema

Fig. 1- Noti's la disposició alternada dels feixos de xilema i floema, i l'ocupació de l'espai medullar pels elements del xilema. Fixi's que tant l'endodermis com l'exodermis reaccionen positivament amb el vermell de Sudà, indicant la presència de suberina en les parets. En l'epidermis s'observen tricomes. Tinció: vermell de Sudà/hematoxilina de Harris. X 157

Fig.2- Detall de l'endodermis amb les parets suberitzades on destaca, a l'igual que l'endodermis de l'arrel primària, la manca de dipòstis de suberina en la zona on es localitza la banda de Caspari (fletxes). Tinció: negre de Sudà. X1250



LÀMINA III

Figures: 1 a 3

LÀMINA III

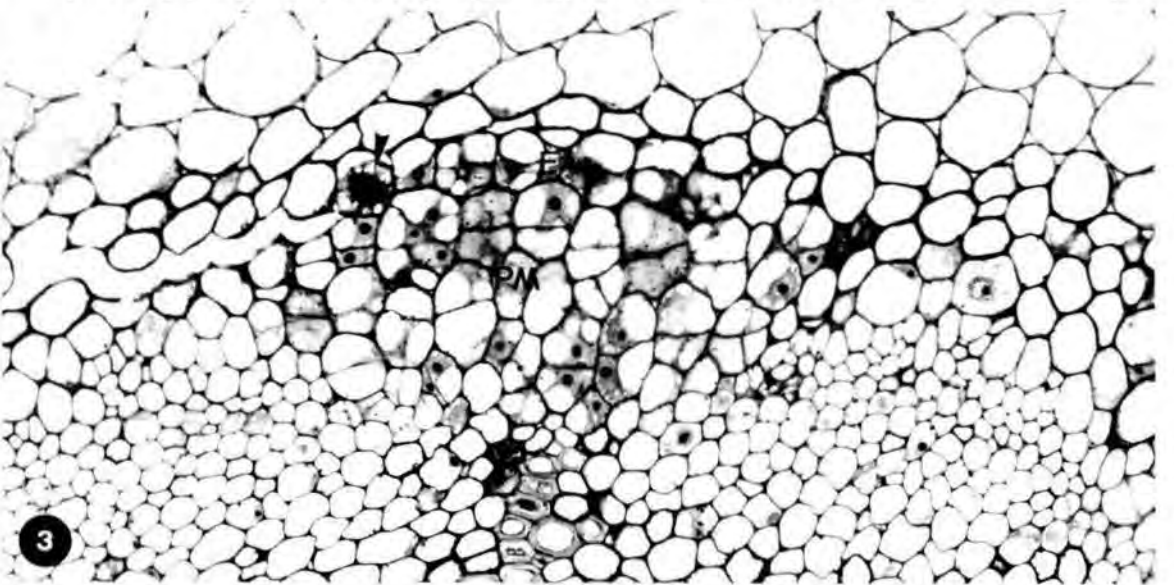
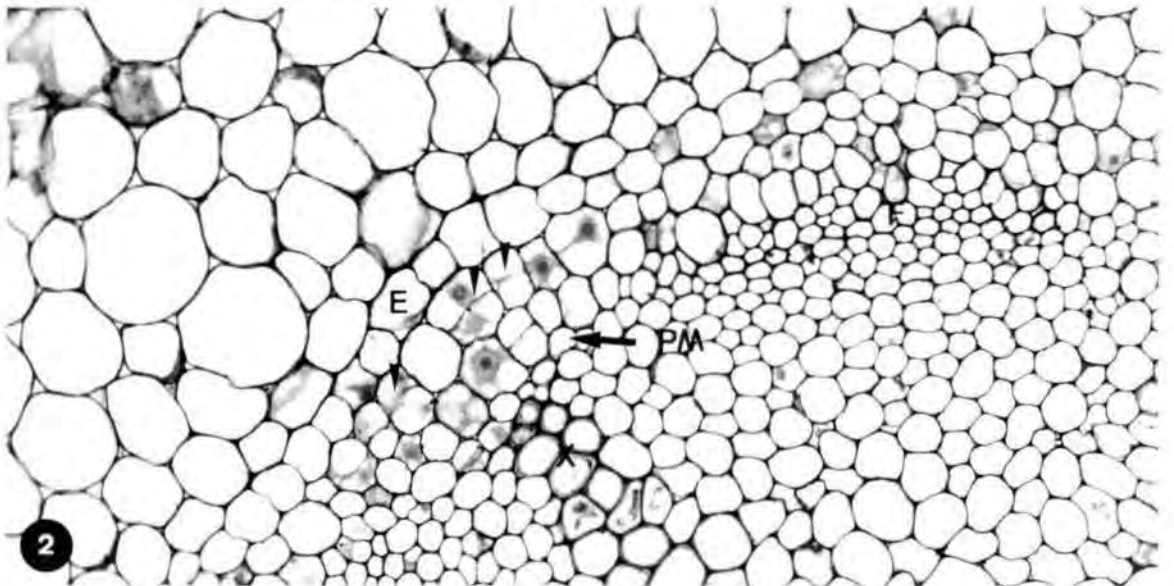
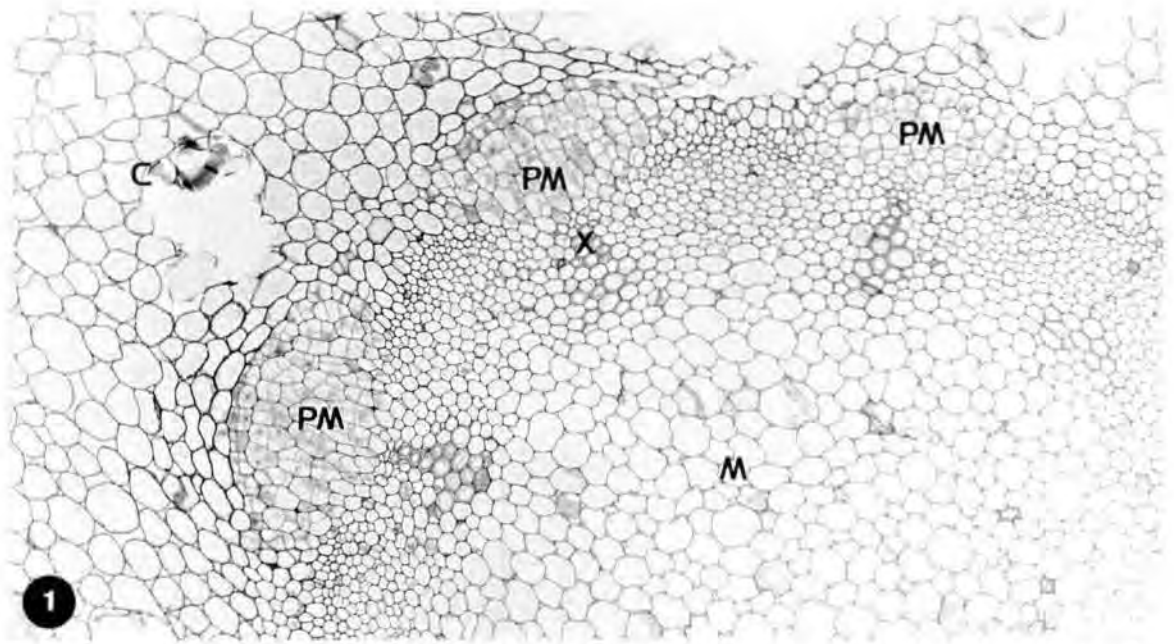
Fotografies al MO de seccions transversals d'arrel primària entre 2'5 i 3'5cm de l'àpex de plàntules de *Q.suber*.

C, còrtex; E, endodermis; P, pericicle; PM, primordi d'arrel lateral; M, medulla; X, xilema; F, floema.

Fig.1- Observi's els tres primordis d'arrel lateral en estats de desenvolupament pròxims i localitzats en feixos de xilema contigus. Tinció: PA-Schiff. X139

Fig.2- Primer estadi en què s'observa, enfront un pol de xilema, l'inici del desenvolupament d'un primordi. Fixi's en les primeres divisions periclinals que tenen lloc en les cèl.lules del pericicle de la capa més externa (cap de fletxa). Tinció: PA-Schiff/blau de toluidina. X420

Fig.3- Primordi en un estat més avançat de desenvolupament on continuen dividint-se les cèl.lules del pericicle, mentre que les de l'endodermis esdevenen més basòfiles i algunes també comencen a dividir-se (cap de fletxa). Tinció: PA-Schiff/blau de toluidina. X277



LÀMINA IV

Figures: 1 i 2

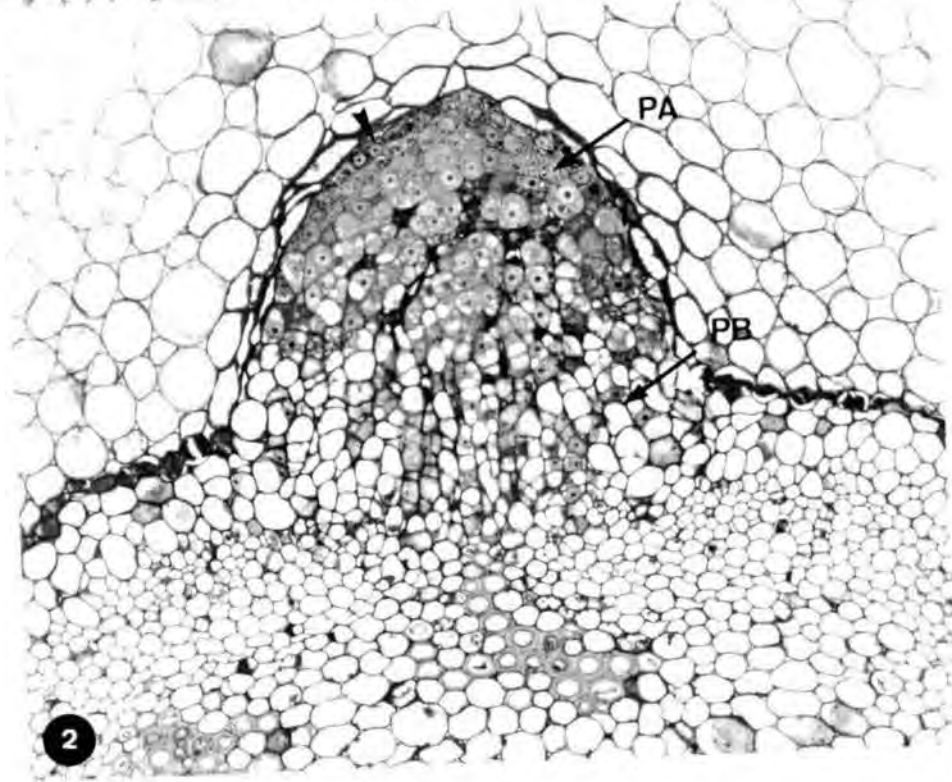
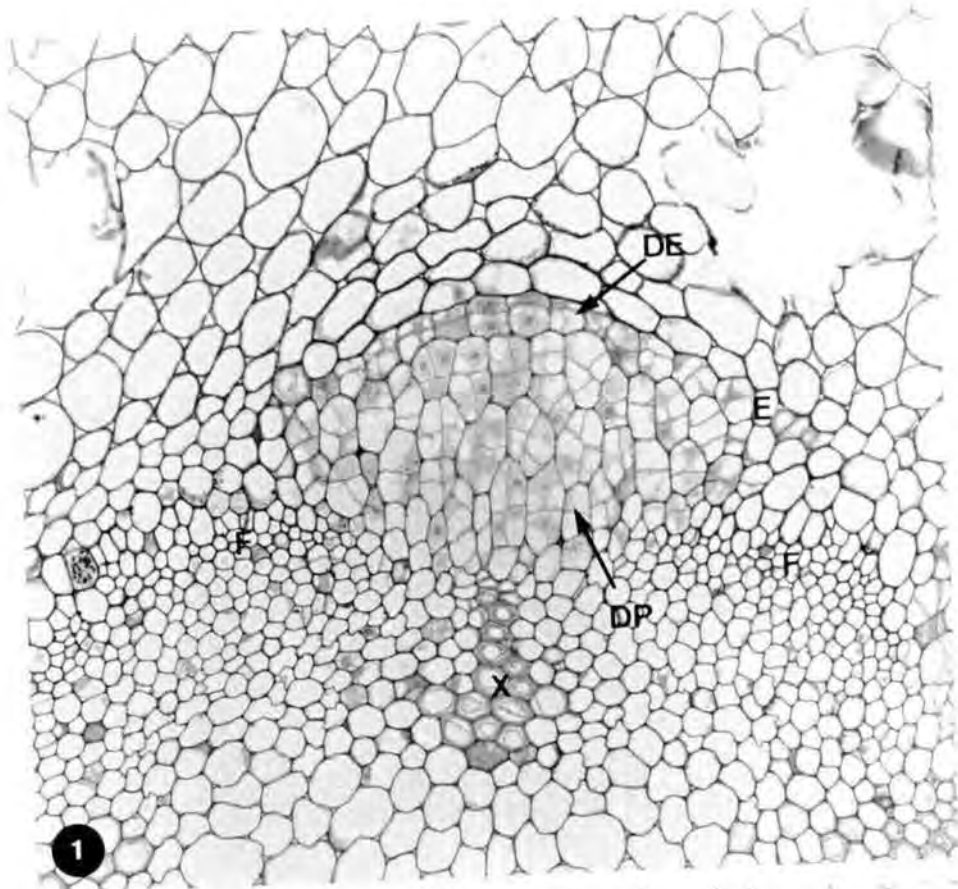
LÀMINA IV

Fotografies al MO de seccions transversals d'arrel primària de plàntules de *Q.suber*.

C, còrtex; CA, caliptra; DE, cèl.lules derivades de l'endodermis; DP, cèl.lules derivades del pericicle; E, endodermis; P, pericicle; PA, part apical; PB, part basal; PM, primordi d'arrel lateral; M, medul.la; X, xilema; F, floema.

Fig.1- Secció transversal de 2'5 a 3'5cm de l'àpex on s'observa una protuberància formada per 4-6 capes de cèl.lules derivades del pericicle i orientades radialment, i 2 capes de cèl.lules derivades de l'endodermis i orientades tangencialment. Noti's també que la majoria de cèl.lules derivades del pericicle es troben formant grups de quatre originats per una divisió periclinal seguida de divisió anticlinal d'una única cèl.lula inicial. Tinció: PA-Schiff. X 210

Fig.2- Segon estadi en què es distingeix en el primordi una part basal, més vacuolitzada i amb cèl.lules més elongades radialment, i una part apical molt més basòfila. Fixi's també amb les 2-3 capes més externes del primordi en què les cèl.lules inicien l'acumulació de grànuls PA-Schiff positius (cap de fletxa). Observi's que el colapse de les cèl.lules del còrtex adjacents al primordi ja és evident. Tinció: Tionina. X210



LÀMINA V

Figures: 1 a 3

LÀMINA V

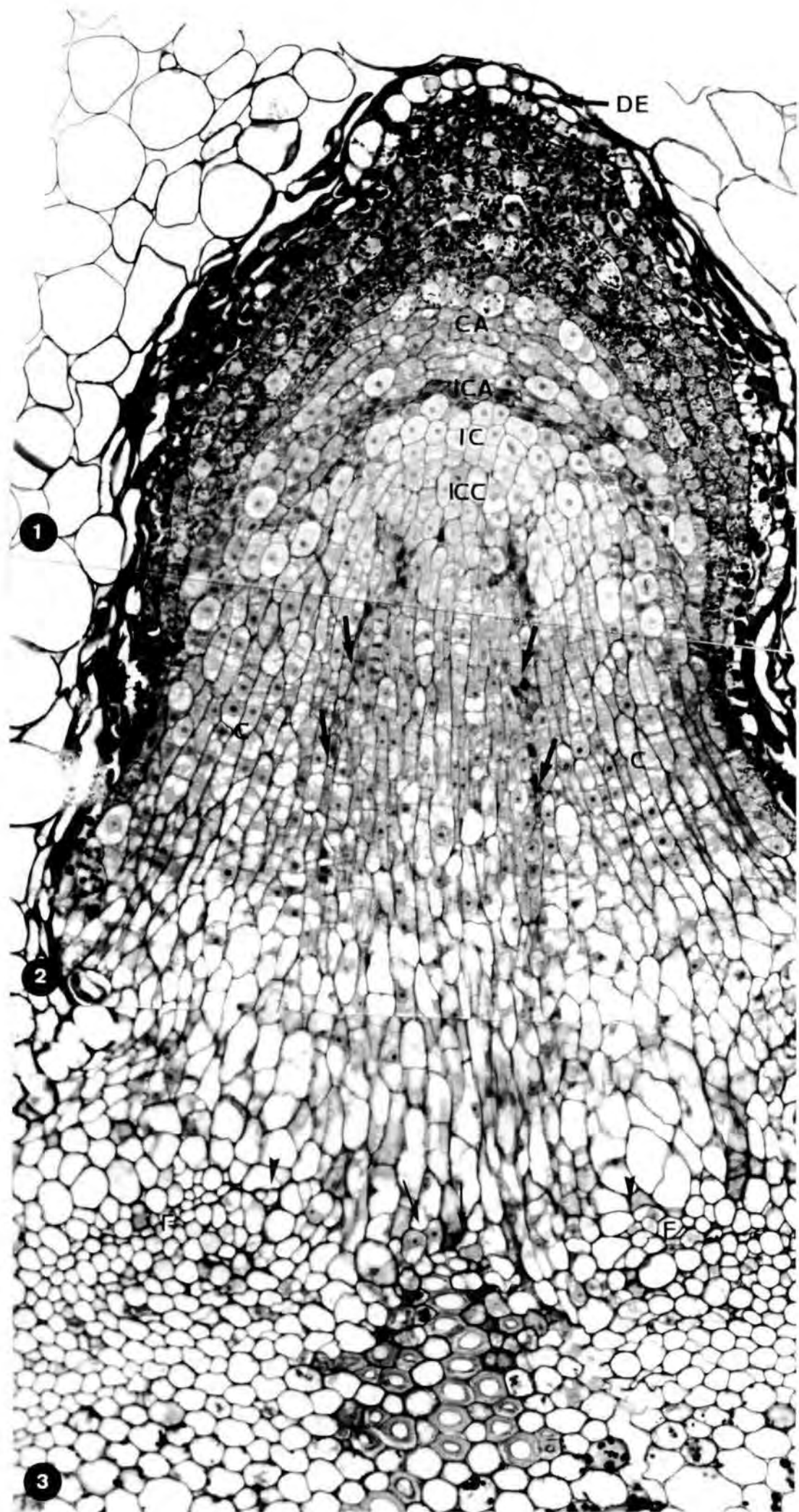
Fotografies al MO d'una secció transversal d'un primordi d'arrel lateral prèvia emergència. Tinció: PA-Schiff/blau de toluidina. X

C, còrtex; CA, caliptra; DE, cèl.lules derivades de l'endodermis; F, floema; IC, cèl.lules inicials del còrtex; ICA, cèl.lules inicials de la caliptra; ICC, cèl.lules inicials del cilindre central; X, xilema;

Fig.1- Part apical on s'evidencia l'organització del futur meristema apical. Fixi's en la capa convexa de cèl.lules més basòfiles que, aparentment, limata la caliptra de la resta de teixits (ICA). Fixi's també que les 2-3 capes de cèl.lules situades interiorment a la caliptra es continuen amb les cèl.lules laterals de la part medial (IC), i que un nucli de cèl.lules centrals es continua amb les futures cèl.lules del cilindre central (ICC). Observi's les 10-13 capes de cèl.lules que formen la caliptra i que s'observa, en direcció centrípeta, una progressiva acumulació de granuls de midó.

Fig.2- Part medial. La zona central o futur procàmbium, queda delimitada a cada banda per una capa de cèl.lules lleugerament més basòfiles (fletxes).

Fig.3- Part basal. Les cèl.lules estan més vacuolitzades i principalment les centrals mostren certa continuïtat amb el elements més externs del feix de xilema enfront el que s'ha format (fletxes) i amb els elements del floema dels feixos més propers (caps de fletxa).



LÀMINA VI

Figures: 1 a 3

LÀMINA VI

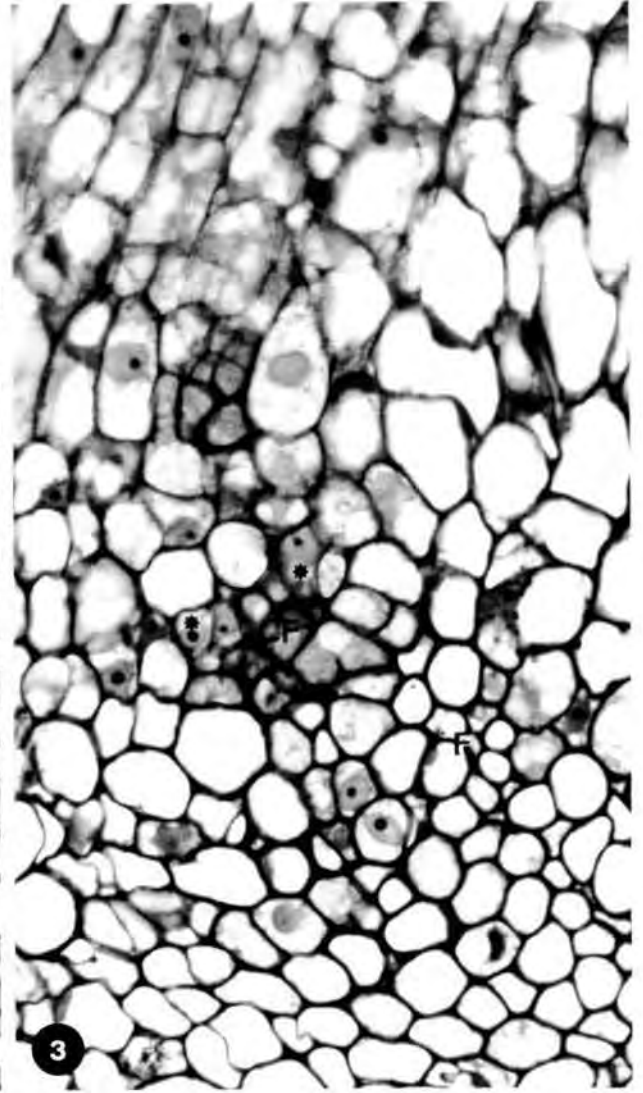
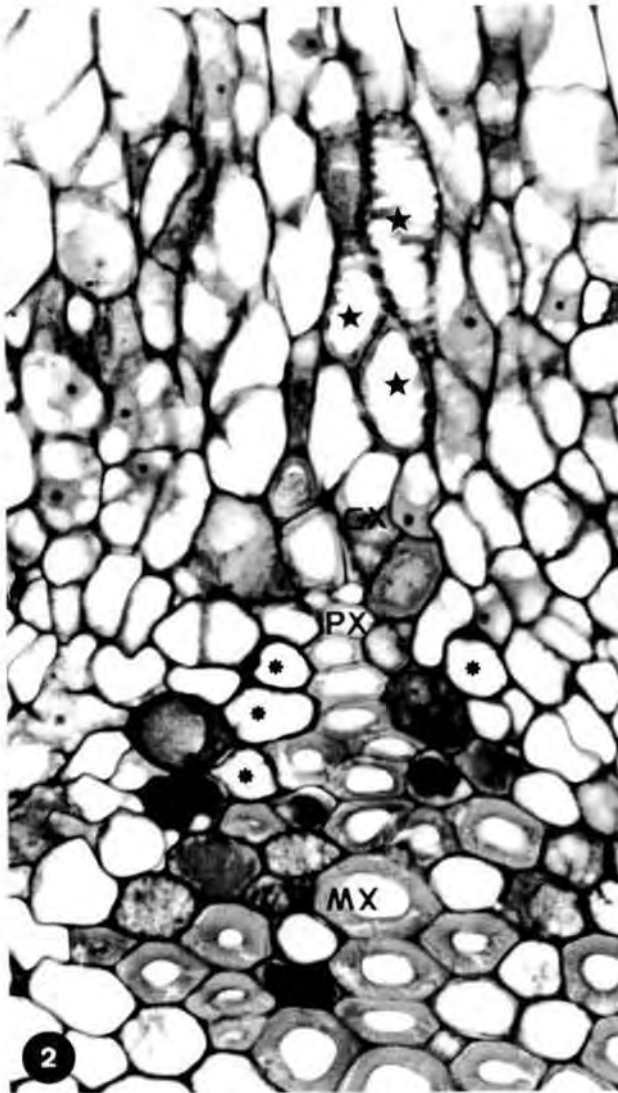
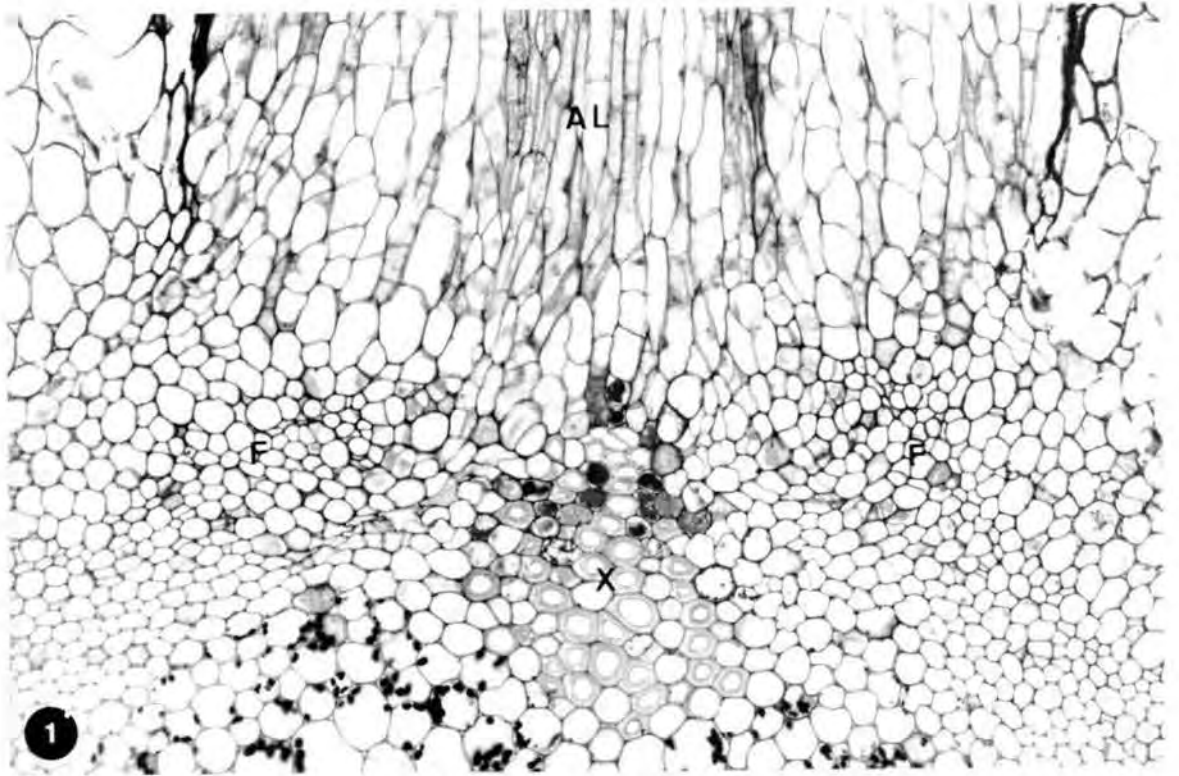
Fotografies al MO de seccions transversals d'una arrel primària a nivell de la connexió d'una arrel lateral . Tinció: PA-Schiff/blau de toluidina.

AL, arrel lateral; C, còrtex; CF, cèl.lules connectores del floema; CX, cèl.lules connectores del xilema; F, floema; MX, metaxilema; PX, protoxilema; X, xilema.

Fig.1- Aspecte general de la part basal del primordi d'una arrel lateral abans de fer-se visible externament. Fixi's que l'arrel lateral es connecta amb el feix de xilema enfront el que s'origina i amb els dos feixos de floema laterals. X277

Fig.2- Detall de la connexió del xilema de l'arrel primària amb l'arrel lateral. Observi's algunes cèl.lules adjacents al protoxilema amb la paret cel.lular lleugerament engruixida (asterisc) i també un elevat nombre de cèl.lules al voltant del protoxilema i dels elements del metaxilema més extern que acumulen tanins. Fixi's així mateix, amb les 3, 4 cèl.lules connectores adjacents als primers elements del protoxilema (cap de fletxa) que es troben en contacte amb 3-4 cèl.lules amb engruiximents de la paret de tipus escaleriforme de l'arrel lateral (estrella). X554

Fig.3- Detall de la connexió del floema de l'arrel primària amb l'arrel lateral. Fixi's amb les cèl.lules connectores del floema, molt basòfiles i algunes amb un conspicu nucli (asterisc). X554



LÀMINA VII

Figures: 1 a 3

LÀMINA VII

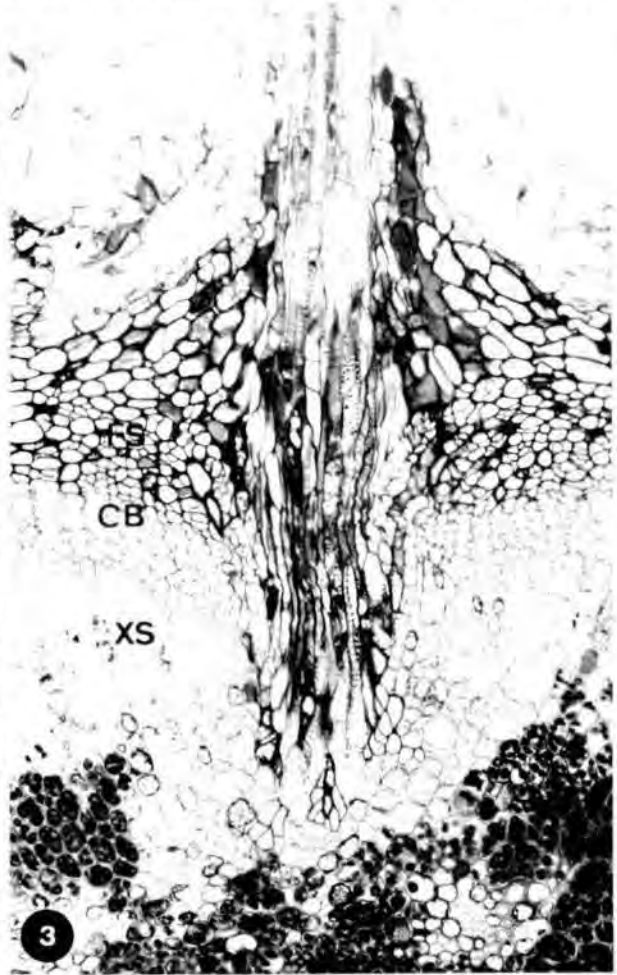
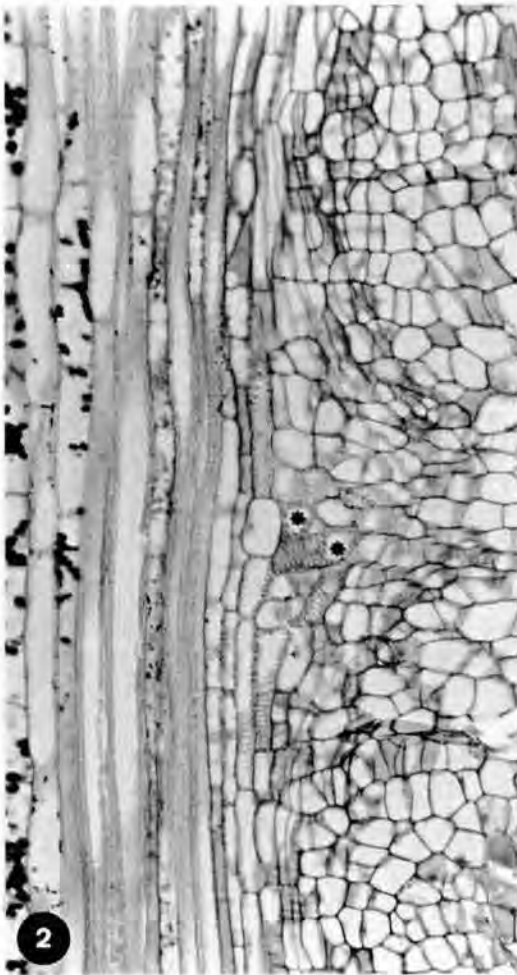
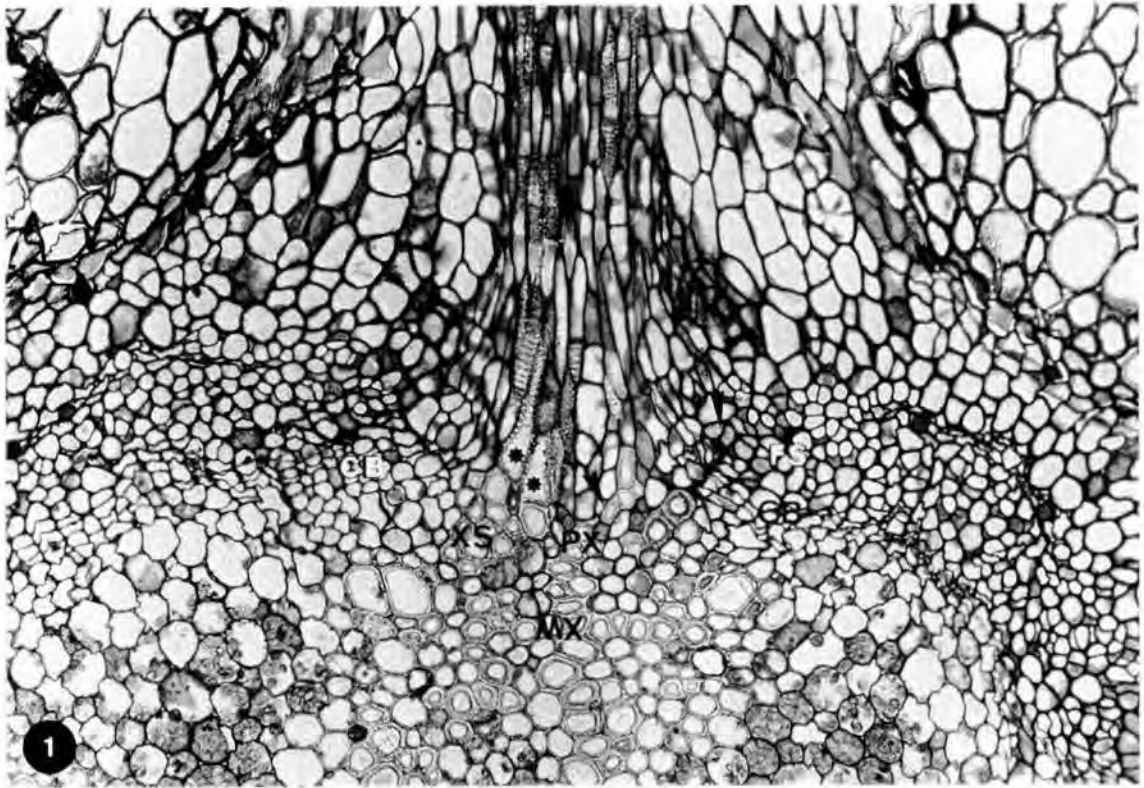
Fotografies al MO d'arrels primàries a nivell de l'arrel lateral.

C, còrtex; CB, càmbium; CF, cèl.lules connectores del floema; CX, cèl.lules connectores del xilema; F, floema; FS, floema secundari; MX, metaxilema; PX, protoxilema; X, xilema, XS, xilema secundari.

Fig.1- Secció transversal d'una arrel primària a nivell d'una arrel lateral d'uns 2cm de longitud. Observi's alguns elements connectors madurs adjacents al protoxilema (cap de fletxa) i també alguns elements connectors derivats del càmbium (asterisc). En la connexió del floema també intervenen elements connectors derivats del càmbium (cap de fletxa). Tinció: vermell de Sudà/hematoxilina de Harris. X.210

Fig.2- Secció longitudinal d'una arrel primària a nivell d'una arrel lateral. Observi's en la base de l'arrel lateral els elements connectors del xilema madurs. Aquests són elements curts i presenten engruiximents escalariformes o escalariformes-reticulats (asterisc). Tinció: PA-Schiff. X210

Fig.3- Secció transversal d'una arrel primària amb creixement secundari. Observi's que els elements vasculars de l'arrel lateral queden englobats en els de l'arrel primària. Tinció: PA-Schiff. X.168



LÀMINA VIII

Figures: 1 a 4

LÀMINA VIII

Fotografies al MO de seccions transversals d'arrels primàries a nivell d'una arrel lateral

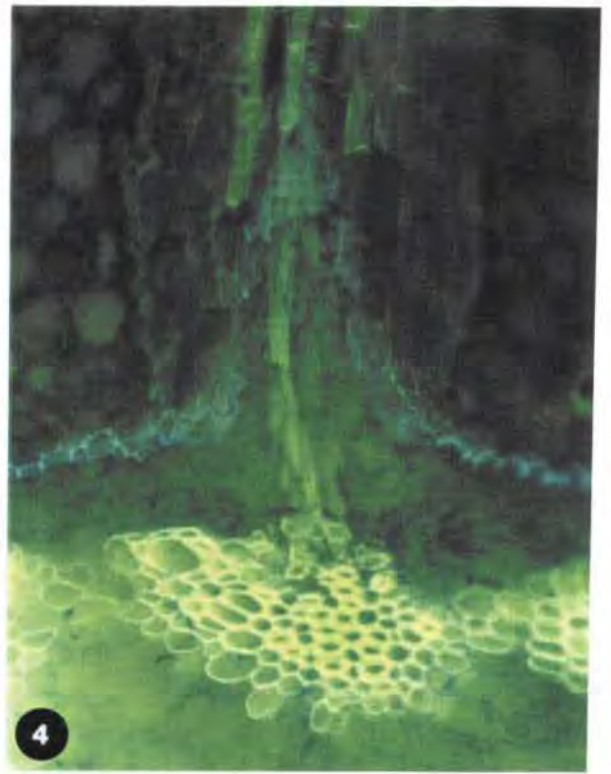
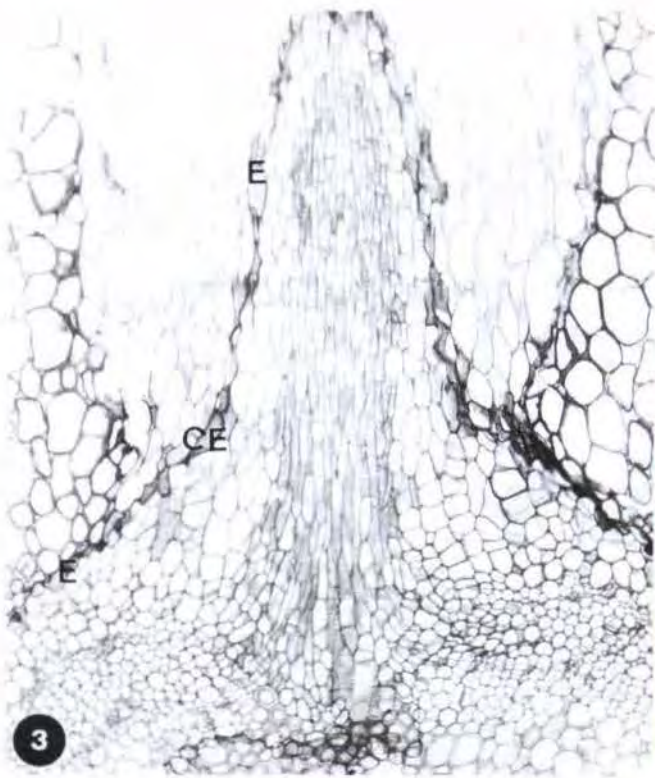
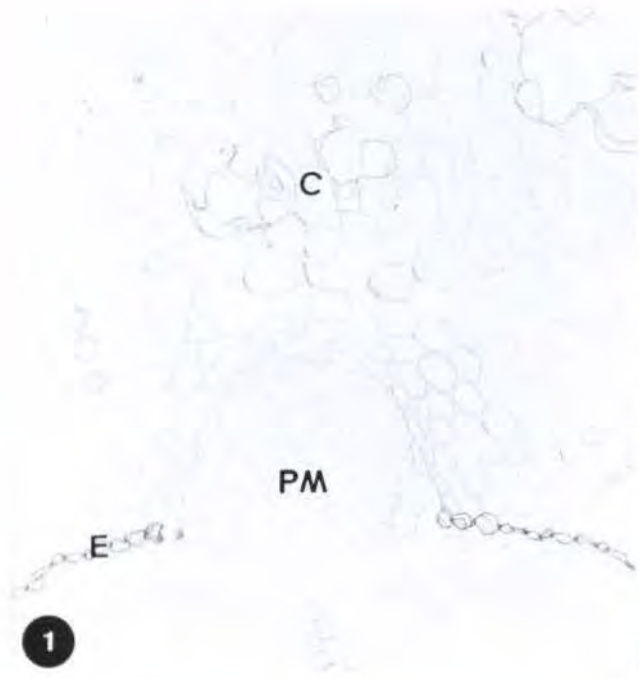
C, còrtex; CE, cèl.lules connectores endodermis; E, endodermis; F, floema; PM, primordi; X, xilema.

Fig.1- Arrel lateral en estat de primordi. Observi's la discontinuïtat que presenta l'endodermis de l'arrel primària a nivell de la part basal del primordi. Tinció: vermell de sudà. X139

Fig.2- Arrel lateral prèvia emergència. Observi's en la part basal de 4 a 5 cèl.lules que aparentment connecten l'endodermis de l'arrel primària i la de la futura arrel lateral (fletxes). Tinció: PA-Schiff/blau de toluidina.X105

Fig.3- Base de l'arrel lateral on s'observa la connexió de l'endodermis de l'arrel primària i de la nova arrel. Obsevi's que les cèl.lules connectores reaccionen positivament amb vermell de sudà el que indica la presència de suberina en les seves parets. Tinció: vermell de sudà. X139

Fig.4- Arrel lateral en un estat de maduració similar el de la figura 3 en que s'observa l'emissió de fluorescència blava per part de les cèl.lules connectores de l'endodermis confirmant, així, la presència de suberina en les seves parets. Tinció: berberine/blau d'anilina. X.127



DISCUSSIÓ

Arrels laterals i estructura del sistema radicular

L'organització en l'estat de plàntula del sistema radicular de *Q.suber* és similar a l'observada en altres quercínees, com *Q. macrocarpa* (Holch, 1931), *Q. rubra* (Lyford, 1980), *Q. ilex* (Beissalah i col., 1988), o *Q. robur* (Riedacker i Belgrand, 1983; Harmer, 1990). En totes elles s'hi han descrit una arrel pivotant i nombroses arrels laterals curtes i de petit diàmetre, que si bé són importants per a la fisiologia de la plàntula no són determinants per a l'arquitectura del sistema radicular.

En diverses espècies s'ha observat que la distribució de les arrels laterals sembla obeir un patró. Mallory i col (1970), treballant amb angiospermes que desenvolupen els primordis aprop de l'àpex, van constatar que quan menor és el nombre de feixos de l'arrel primària, més regular és la distribució de les arrels laterals, mantenint-se, inclús, certa regularitat en aquelles arrels en què el nombre de feixos és alt. En moltes plantes també es descriu la tendència a originar les arrels en petits grups més o meys distanciats (Mallory i col. 1970) com és el cas de *Q.suber*, on s'observen, freqüentment, de 2 a 3 primordis en pols de xilema contigus. Pulgarín i col. (1988) consideren que la formació d'arrels laterals en grups podria ser deguda a un factor estimulador transportat asimètricament pel sistema vascular de l'arrel mare i alliberat a un cert nivell de l'àpex, augmentant regionalment la seva concentració i afavorint la formació de primordis.

Coincidint amb els nostres resultats, El Alaqui (1978) va observar que les ferides provocades en l'àpex de la primera arrel estimulaven la formació de noves arrels diferents de l'arrel de primer ordre. Aquestes arrels també s'han descrit en altres espècies com *Betula papyrifera* (Horsley, 1971) o *Q. ilex* (Beissalah i col., 1988), i són anomenades arrels de regeneració. Beissalah i col., (1988) consideren que les arrels de regeneració formen un grup per elles mateixes pel fet de diferir, de les arrels laterals de primer ordre, en l'origen, el gruix i l'orientació.

Desenvolupament de les arrels laterals

En la majoria de dicotiledònies poliarques, a l'igual que l'alzina surera, els primordis de les arrels laterals s'originen en front el xilema (Esau, 1985), amb la participació de les cèl·lules del pericicle i de l'endodermis (McCully, 1975). Les transformacions cel·lulars que acompanyen l'inici i establiment del primordi en l'alzina surera, extensió i increment de la basofilia de les cèl·lules del pericicle i endodermis, també han estat descrites en altres espècies com *Malva sylvestris* (Byrne, 1973), *Ipomoea purpurea* (Seago, 1973) o *Zea mays* (McCully, 1975). Lloret i col. (1993) estudiant l'efecte de l'auxina sobre la formació de les arrels laterals, han observat que la prèvia maduració i elongació de les cèl·lules és essencial perquè aquestes es divideixin hi hagi el desenvolupament del primordi.

Encara que en el present treball no s'ha efectuat un seguiment detallat de les cèl·lules derivades del pericicle i de l'endodermis, considerem que els nostres resultats concorden amb els descrits per Byrne (1973) en *Malva sylvestris*; o per Seago (1973) en *Ipomoea purpurea* i les dicotiledònies en general (McCully, 1975). Els resultats també s'ajusten, en línees generals, al model de desenvolupament proposat per Clowes (1978) per *Zea mays*. Clowes (1978), mitjançant l'inducció de quimeres poliploids en l'estat inicial, comproba que les cèl·lules derivades del pericicle formen tot el cos de l'arrel lateral i que l'endodermis només intervé en l'etapa de primordi amb la formació d'una caliptra de transició que degenera i es desprèn al desenvolupar-se l'arrel lateral. En l'alzina surera les cèl·lules derivades de l'endodermis també defineixen una estructura a modus de coberta que progressivament es substituïda per les cèl·lules provinents de les divisions periclinals de les cèl·lules derivades del pericicle (Esq.1).

Connexió

La formació d'arrels laterals comporta en l'arrel primària l'alteració dels teixits relacionats amb el moviment de soluts i aigua: el teixit vascular i l'endodermis. El teixit vascular de l'arrel primària es connecta amb el de l'arrel lateral per establir continuïtat hidràulica. La connexió vascular es realitza mitjançant cèl·lules connectores que poden originar-se del parènquima estel·lar com és el

cas de les cèl.lules connectores del xilema de *Lycopersicon esculentum* i *Glycine max* (Byrne i col., 1982), o de cèl.lules derivades del pericicle com les cèl.lules connectores del floema de *Lycopersicon esculentum* (Byrne i col., 1982), o d'ambdòs com les cèl.lules connectores del floema de *Glycine max* (Byrne i col., 1982) o com en l'alzina surera, on les cèl.lules connectores semblen originar-se de les cèl.lules derivades del pericicle i del parènquima estel.lar pròximes al protoxilema. La complexitat de la connexió depèn, en gran mesura, de les característiques vasculars de l'arrel mare i del punt d'origen de l'arrel lateral en relació als pols de xilema i floema (Esau, 1985). En algunes espècies, per exemple en *Hordeum vulgare* (Luxová, 1990), la connexió comporta la reorganització del teixit vascular de l'arrel primària. En aquests casos no queda limitada als feixos vasculars més perifèrics, sinó que inclou la connexió amb els feixos més llunyans i també amb el metaxilema central. En canvi, en l'alzina surera, la formació de les arrels laterals enfront els pols de xilema permet que la connexió sigui relativament més directa i menys complexa.

La participació de l'endodermis en la formació del primordi implica la modificació del seu patró de desenvolupament efectant principalment a la banda de Caspari. Al desdiferenciar-se les cèl.lules endodermals, la banda de Caspari es desorganitza (Bonnett, 1969) i, a més, tampoc es forma en les cèl.lules derivades de l'endodermis (Dumbroff i Peirson, 1970). L'endodermis, per tant, roman discontinua fins que s'estableix la connexió amb la de l'arrel lateral, quedant lliure una possible via als soluts i aigua que viatgen radialment (Dumbroff i Peirson, 1970). En l'alzina surera l'endodermis es divideix molt aviat en el desenvolupament del primordi, mentre que les cèl.lules connectores entre l'endodermis de l'arrel primària i la lateral no s'identifiquen fins ben avançat l'estadi de maduració del primordi. Per tant, cal suposar que des que s'inicien les divisions fins a que s'identifiquen les cèl.lules connectores, l'endodermis és discontinua. Seria interessant determinar en quin moment apareix la banda de Caspari en les cèl.lules connectores per valorar la importància de la possible via de pas.

CAPÍTOL III:

ENDODERMIS: DIFERENCIACIÓ I MADURACIÓ

INTRODUCCIÓ

La descripció de l'endodermis s'emmarca dins l'estudi de l'arrel primària de *Quercus suber*. Li hem dedicat especial atenció per la seva implicació en alguns processos fisiològics de la planta, com el transport d'aigua i soluts, i, especialment, per ser un teixit suberificat, ja que l'alzina surera és una planta que es caracteritza per ser la principal productora de suberina. L'objectiu d'aquest treball és estudiar el patró de diferenciació de l'endodermis en l'alzina surera, posant especial interès a les transformacions de les parets cel·lulars i als canvis ultraestructurals de les cèl·lules, així com, a la presència de tanins.

L'endodermis és la capa de cèl·lules d'origen cortical que limita externament el cilindre vascular (Esau, 1985). La transformació d'estadi meristemàtic a endodermis diferenciada comporta una sèrie de modificacions que, segons Van Fleet (1961), Clarkson i Robards (1975), es poden agrupar en quatre estadis: Proendodermis, Estat I, Estat II i Estat III. L'Estat I es caracteritza per la formació de la banda de Caspari en les parets radials i transversals; l'Estat II per la deposició de lamel·les de suberina en la superfície interna de la paret cel·lular, excepte en els plasmodesmes; i l'Estat III per la deposició de material cel·lulòsic internament a la capa de suberina, tret més notori en coníferes i monocotiledònies que en dicotiledònies.

Els diferents treballs que s'han publicat sobre l'endodermis no han permès establir una relació clara entre les transformacions de la paret cel·lular i l'activitat específica d'alguns orgànuls cel·lulars (Van Fleet, 1961; Haas i Carothers, 1975; Scott i Peterson, 1979a). De fet, el treball d'Scott i Peterson (1979a) és l'únic que inclou una descripció detallada dels orgànuls presents en cada un dels estadis. D'altra banda, alguns autors com Van Fleet (1961), Mueller i Beckman (1976), consideren que els tanins podrien estar implicats en la diferenciació de l'endodermis.

El paper de la banda de Caspari ha estat àmpliament estudiat per diversos autors (Anderson, 1975; Clarkson i Robards, 1975; Weatherley, 1975 i Sanderson, 1983). Aquests autors consideren que la banda de Caspari és una veritable barrera de permeabilitat per aquelles molècules que són transportades via apoplast. En l'arrel, la funció de barrera apoplàstica també s'extén a

l'exodermis que, en moltes espècies, presenta banda de Caspari (Peterson i col., 1982; Perumalla i col., 1990) i madura a més distància de l'apex que l'endodermis (Perumalla i col., 1986).

La presència de la capa de suberina en les parets de l'endodermis, a causa de la seva estructura molecular i de la possible formació de complexos amb altres molècules hidrofòbiques (Kolattukuddy, 1984), s'ha associat a una major restricció en l'entrada d'aigua i soluts al cilindre vascular. Aquest fet, però, és difícil de demostrar en experiments *in vivo* i fins i tot, alguns autors (Clarkson i col., 1978; Sanderson, 1983) es qüestionen la veritable impermeabilitat de la suberina.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL BIOLÒGIC

S'han utilitzat arrels de plàntules de 25 a 45 dies d'edat crescudes en el laboratori segons el procediment especificat en el capítol I (pg.9).

MÈTODES

Les tècniques histològiques utilitzades per descriure la formació de l'endodermis inclouen els mètodes convencionals de microscòpia òptica (MO) de camp clar i fluorescència i, de microscòpia electrònica de transmissió (MET), així com procediments més específics com els histoquímics emprats per estudiar les transformacions de la paret cel·lular.

Processat de les mostres per ser observades al microscopi òptic (MO) de camp clar

Per a l'observació de les mostres en MO de camp clar s'han inclòs en glicol metacrilat i seccionat, algunes mostres també s'han seccionat sense incloure pel mètode de la mà alçada.

Mètode del glicol metacrilat (GMA)

Per estudiar la distribució i evolució dels tanins, especialment, en les cèl·lules de l'endodermis, algunes de les mostres s'han incubat durant 48 hores en una solució de FeSO₄ (10% FeSO₄, 5% Formol, 85% H₂O.) (Johansen 1940), prèvia inclusió en glicol metacrilat.

Obtenció de mostres : Les mostres s'han obtingut tallant, amb un bisturí o fulla d'afaitar, petits fragments de teixit d'uns 3mm³ de la zona a estudiar. Tot seguit els fragments s'han introduït en la solució fixadora.

Fixació: Les mostres s'han fixat amb formol al 10% tamponat amb CaCO₃ pH 7, durant 24 hores, com a mínim. Durant la fixació les mostres s'han mantingut sota una campana de buit amb un buit enèrgic.

Deshidratació: Les mostres s'han deshidratat en una sèrie isopropílica creixent (de 70°C a 100°C), transferit a una barreja d'alcohol isopropílic amb butanol i, finalment, s'han portat a butanol 100% (Cap I-pg12).

Inclusió: Les mostres ja deshidratades s'han inclòs en glicol metacrilat, seguint el mètode de polimerització en fred (Bonet i Molinas, 1983). (Cap I-pg.12).

Microtomia: Els blocs de GMA es seccionen un micròtom 1150-Autocut ReichertJung obtinguent talls de 4 a 6 µm.

Tinció: Veure Cap.I-pg13.

Generals i metacromàtiques:

-**Blau de toluídina:** Veure capítol I, pg14.

-**Blau de toluídina-PA.Schiff:** Reactius: blau de toluídina al 2% en H₂O_d; reactiu de Schiff (Merck, 9033); àcid periòdic 1% en H₂O_d amb una gota d'àcid nítric (HNO₃).

Procediment: 1-Oxidat amb àcid periòdic durant 15minuts. 2-Rentar amb H₂O_c durant 10 minuts. 3-Tractar amb reactiu de Schiff durant 15 minuts. 4-Rentar amb H₂O_d durant 10segons. 5-Tenyir amb blau de toluídina durant 30 segons. 6-Rentar amb H₂O_d de 2 a 3 minuts. 7-Assecar i muntar.

Resultats: nucleol blau intens; citoplasma blau-rosat; parets cel.lulars blau vermellós; granuls de midó granates; tanins vermells.

-**Tionina:** Veure capítol I, pg12.

Histoquímiques:

-**Blau de coomasie G:** El blau de coomasie s'utilitza normalment per a la detecció quantitativa de proteïnes en espectrofotometria (Bradford, 1976). Com que és un mètode molt sensible i presenta poques interferències l'hem adaptat per a ús histoquímic

Reactius: blau de coomasie G (C.I.Nº 42655) 10mg, àcid fosfòric 85% 10ml, alcohol 95% 5ml enrasat a 100ml amb H₂O_d.

Procediment: 1-Tenyir amb la solució colorant durant 20minuts. 2-Rentar amb H₂Od. 3-Assecar i muntar.

Resultats: El blau de coomasie, que en forma aniònica té un tó vermellós, es transforma en blau al unir-se als grups amino de les proteïnes, per la qual cosa les estructures riques amb proteïnes es tenyeixen de blau.

-Eritrosina: La tinció d'eritrosina s'ha emprat per contrastar les seccions procedents de mostres incubades amb FeSO₄.

Reactius: FeSO₄ 2g en formaldehid 10cc enrasat a 100cc amb H₂Od; eritrosina al 1% amb H₂Od.

Procediment: 1-Tenyir amb eritrosina de 2 a 5 minuts. 2-Rentar amb H₂Od. 3-Assecar i muntar.

Resultats: citoplasma i nucli rosat clar, nucleol rosat fort.

-Negre de sudà : Reactius: negre de Sudà B (C.I.N^o 26150) al 0'3% en alcohol de 70%.

Procediment: 1-Tenyir amb negre de sudà durant 10minuts. 2-Diferenciar amb alcohol de 70% durant 1 o 2 minuts. 3-Assecar i muntar.

Resultats: lípids negres.

La tinció amb negre de sudà i diferenciació es repeteix 2-3 vegades per assegurar la verdadera sudanofilia de les estructures tenyides (Biggs, 1985).

-Negre de sudà contrastat amb PA-Schiff: Reactius: negre de Sudà B (C.I.N^o 26150) al 0'3% en alcohol de 70%; reactiu de Schiff (Merck, 9033); àcid p eriòdic 1% en H₂Od amb una gota d'àcid nítric (HNO₃).

Procediment: 1-Tenyir amb negre de sudà durant 10minuts. 2-Diferenciar amb alcohol de 70% durant 1 o 2 minuts. 3-Oxidat amb àcid periòdic durant 15minuts. 4-Rentar amb H₂Oc durant 10 minuts. 5-Tractar amb reactiu de Schiff durant 15 minuts. 6-Rentar amb H₂Od durant 10segons. 7-Assecar i muntar.

Resultats: lípids negre; polisacàrids vermell.

-Nigrosin-naftol blue black: Reactius: nigrosin 1%; naftol blue black 1%; diluient : 5 part d'etanol 100^oC, 1 part d'àcid acètic glacial i 4 parts de H₂Od.

Procediment: 1-Tenyir amb el nigrosin blue black durant uns 10minuts. 2-Rentar amb la solució d'àcid acètic. 3-Assecar i muntar.

Resultats: proteïnes blau intens.

-PA.Schiff: Veure capítol I, pg14.

-Vermell de sudà 7B: Reactius: vermell de Sudà 7B (C.I.N^o 26050) al 0'5% en alcohol de 70%.

Procediment: 1-Tenyir amb vermell de sudà 7B durant 10minuts. 2-Diferenciar amb alcohol de 70% durant 1 o 2 minuts. 3-Assecar i muntar.

Resultats: lípids negres.

La tinció amb vermell de sudà 7Bi diferenciació es repeteix 2-3 vegades per assegurar la verdadera sudanofília de les estructures tenyides.

-Vermell de sudà 7B contrastat amb Hematoxilina de Harris: Reactius: vermell de Sudà 7B (C.I.N^o 26050) al 0'5% en alcohol de 70%; hematoxilina de Harris (C.I.N^o 75290) (Hematoxilina 5g, alcohol absolut 50cc, sulfat alumínic-amoníac 100g, òxid de mercuri 2'5cc, àcid acètic glacial 40cc enrasat amb H₂O a 1000cc.); aigua d'Scott (sulfat de magnesi 10g, bicarbonat sòdic 2g enrasat amb H₂O a 1000cc.).

Procediment: Procediment: 1-Tenyir amb vermell de sudà 7B durant 10minuts. 2-Diferenciar amb alcohol de 70% durant 1 o 2 minuts. 3-Tenyir amb hematoxilina 1 o 2 minuts. 4-Rentar amb H₂O. 5-Virar els talls amb aigua d'Scott 2 minuts. 6-Assecar i muntar.

Resultats: lípids vermells, parets cel.lulars, citoplasma i grànuls de midó lílids clar.

Observació i fotografia: Les observacions s'han fet en un fotomicroscopi Vanox (Olimpus) equipat amb epifluorescència. Per a la fotografia, s'ha utilitzat, per un costat, un filtre LBD i pel.lícula Ektacrome 100 ASA per a les diapositives en color; i, per l'altre, un filtre verd IF 550 i pel.lícula Kodak T MAX 100 ASA per a la fotografia en blanc i negre.

Mètode de la mà alçada:

Obtenció de les seccions per observar: Els talls es fan a mà alçada amb una fulla d'afaitar, canviant la fulla d'afaitar cada 5-10 talls. Treballar amb material fresc, recent recollit, afavoreix la realització del tall.

Tinció:

Histoquímiques:

Vermell de suda 7B.

Negre de Sudà.

Floroglucinol -HCl (Joshansen, 1940). Reactius: floroglucinol 0'1g en 10cc d'etanol al 96%; HCl concentrat.

Procediment: 1-Tenyir amb floroglucinol durant 15minuts. 2-tractar amb HCl fins que apareixi color vermell.

Resultats: lignina vermell.

Processat de les mostres per ser observades al microscòpi òptic de fluorescència

La microscòpia de fluorescència s'ha utilitzat per estudiar el procés de maduració de les cèl·lules endodèrmiques i, concretament, per fer el seguiment de la deposició de suberina en les parets cel·lulars.

Obtenció de les seccions per observar: Les seccions a observar s'obtenen a mà alçada.

Tinció: S'han utilitzat dues coloracions, la floroglucinol-HCl per amortiguar la fluorescència de la lignina (Johansen, 1940) i la tinció berberine blau d'anilina per resaltar la fluorescència de la banda de Caspari (Brundrett i col., 1988).

Floroglucinol-HCl:

Berberine-blau d'anilina: Reactius: berberine hemisulfat (C.I.N^o 75160) 0'1% en H₂O_d; blau d'anilina (C.I.N^o 42755) 0'5%; FeCl₃ 0'1% en 50% glicerina.

Procediment: 1-Tenyir amb berberine durant 1 hora. 2-Rentar amb H₂O_d. 3-Transferir les seccions en el blau d'anilina durant 30minuts. 4-Rentar amb H₂O_d. 5-Transferir en la solució de glicerina i FeCl₃. 5-Observar amb una gota de glicerina FeCl₃.

Observació i fotografia: S'ha utilitzat un microscopi Olympus Vanox equipat amb epifluorescència (làmpara de vapor de mercuri HBO200). Per observar l'emissió de fluorescència produïda per la suberina s'ha utilitzat llum violada (filtre excitació 395-415nm, mirall dicroic DM455, i filtre barrera 455nm) i, principalment, llum ultraviolada (Filtre excitació 330-380 nm, mirall dicroic DM 400, i filtre barrera 420nm). Amb la llum ultraviolada la suberina emiteix llum blava i la lignina llum verde.

Per a la fotografia s'ha utilitzat un film Kodak T MAX 100 ASA per B&N i un Ektachrome 100 ASA per diapositives color. Els temps d'exposició s'han reduït a aproximadament un quart del indicat pel fotòmetre.

Processat de les mostres per ser observades al microscopi electrònic de transmissió (TEM).

Fragments d'arrels obtinguts a diferents nivells, han estat processats per ser observats al MET amb la finalitat d'estudiar el desenvolupament de l'endodermis.

Obtenció de les mostres: Els fragments d'arrel procedeixen de plàntules d'aproximadament un mes d'edat crescudes en el laboratori sota condicions controlades (Veure Cap.I-pg 9). La part hipogea de les plàntules mesura, en general, uns 25-30cm de longitud i l'epicòtil uns 0-1'5cm.

De cada plàntula s'han fixat 6 porcions, d'uns 2mm³, corresponents a diferents estats de maduració de l'endodermis.

Mostratge:

Mostres 1: corresponen als primers 3mm de l'arrel, per facilitar la penetració dels líquids i medi d'embibició s'han tallat els 0'5mm corresponents a la caliptra.

Mostres 2: entre 5 i 8mm.

Mostres 3: entre 2'5 i 3 cm de l'arrel.

Mostres 4: entre 3'5 i 4mm de l'arrel.

Mostres 5: entre 4'5 i 5 cm de l'arrel.

Mostres 6: entre 8 i 8'2mm de l'arrel.

Fixació: S'ha utilitzat una variant del fixador de Karnovsky (Hayat 1989) com a prefixador.

Part del material s'ha fixat en una barreja de paraformaldehid 4% més glutaraldehid 0'2% i part amb la mateixa barreja anterior però amb cafeïna al 0'4%. Segons Mueller i Greenwood (1978), concentracions del 0'1 al 1% de cafeïna eviten el vessament dels fenols del vacúol al citoplasma.

Per evitar l'oxidació dels teixits, també s'ha assejat afegint àcid ascòrbic (solució al 1%) en el fixador d'algunes de les mostres.

S'ha utilitzat com a vehicle, la dissolució següent : 0'1M tampó cacodilat + 0'05% CaCl₂ + 0'23 M sacarosa. Osmolalitat = 400 mosm., pH 7'4. (Hayat 1989).

La prefixació s'ha realitzat sota buit i a temperatura ambient (15-20°C) per un període d'unes 72hores.

Solucions:

Tampó Cacodilat: Sol A: Sodium cacodilat ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2'14gr + 100ml de H_2O d). Sol. B: 0'1M HCl: Conc. HCl (36-38%) 5ml + 603ml H_2O d.

pH 7'4: Barrejar 50ml Sol A amb 2'7ml. Sol B i diluir a 200ml amb H_2O destil.lada.

Vehicle: Barrejar 0'1g de CaCl_2 amb 14'74g de sacarosa i enrasar a 200ml amb el tampó cacodilat.

Pre-Fixador: 1-Dissoldre 4g. de paraformaldehid en 40ml d' H_2O destil.lada i remenar enèrgicament durant 5minuts a 60°C. Fins que el líquid quedi transparent afegir, gota a gota, una solució 1N de NaOH al 4%. 2-Deixar refredar la solució i afegir 0'8ml de glutaraldehid al 25%. 3-Afegir 0'4g. de cafeïna si es prepara el fixador amb cafeïna. 4-Enrasar a 100ml amb el vehicle. 5-Ajustar el pH a 7'4 amb NaOH 1N diluït al 4%.

Postfixació: S'ha realitzat una postfixació amb tetraòxid d'osmi 1% en tampó cacodilat 0,1 M durant 1 horai 30 minuts a 4° C. Després de rentar-les amb tres canvis de 5 minuts cadascun amb tampó i tres canvis més de 10 minuts cadascun amb aigua bidestil.lada, es procedeix a la inclusió de les mostres en resina Spurr (Polaron).

Solucions

Tampó Cacodilat 0,1M i 0,05M pH 7,2 (Hayat, 1989).

Cacodilat 2,14g (0,1M); Cl_2Ca 58,8mg (4mM); Cl_2Mg 81,32mg (4mM); Sacarosa 4g.

S'afegeixen 80ml de H_2O per ajustar el pH a 7,2 s'afegeix ClH 0,1N i s'enrasa a 100ml amb H_2O bidestil.lada obtenint una concentració 0,1M. Per a la seva utilització es dilueix a la meitat amb aigua bidestil.lada obtenint una concentració 0,05M.

Tetraòxid d'osmi 1%: A partir de tetraòxid pur es fa una solució al 2% amb aigua bidestil.lada. Es trenca una ampolla de 0'5g de OsO_4 a dins un pot de vidre amb 25ml de H_2O bd. Aquesta solució es pot guardar un cert temps molt ben tapada i a les fosques. A l'hora de fer servir es dilueix amb un 50% de tampó cacodilat 0'1M pH 7'2 per obtenir una solució de tetraòxid d'osmi al 1%.

Deshidratació i inclusió: Es fa una deshidratació convencional en acetona.

Procediment: 1- Acetona al 50%, 10 minuts. 2- Acetona al 70%, 10 minuts-12 hores a la nevera. 3- Acetona al 95%, 3 canvis de 10minuts. 4- Acetona absoluta, 3 canvis en 10 minuts. 5-Acetona 100%, 3 canvis 10minuts. 6- Acetona-Spurr (1:3), 2 hores. 7-Acetona-Spurr (2:2), 2 hores. 8-Acetona-Spurr (3:1), tota la nit a 4° C. 9- Spurr, 3 canvis, 96 hores a 55° C.

Ultramicrotomia: Dels blocs s'han obtingut talls semifins i ultrafins de 600 a 700 Å de gruix amb un ultramicròtom Ultracut de la casa Reichert-Jung del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Contrast dels ultrafins: Els talls ultrafins han estat contrastats amb el mètode convencional: acetat d'uranil2%- citrat de plom (Hall i Hawes, 1991).

Procediment: 1- Contrastar amb acetat d'uranil durant 30 minuts. 2- Rentar acuradament amb aigua bidestil.lada. 3- Eixugar la reixeta amb paper de filtre. 4- Aplicar citrat de plom durant 10 minuts. 5- Rentar acuradament amb aigua bidestil.lada. 6- Eixugar amb paper de filtre

Per a la tinció es depositen gotes de la solució colorant, ja sigui acetat d'uranil o citrat de plom, en una superfície parafinada (Parafilm) en una placa de Petri. En la tinció amb citrat de plom, per evitar la formació de precipitats de carbonat de plom, s'ha de resguardar la solució del CO₂ atmosfèric, per això es dipositen llànties de KOH al voltant que captin el CO₂. Es col.loca una reixeta sobre cada gota i posteriorment es renten per immersió repetida en una sèrie d'almenys 5 cubilets d'H₂O bidestil.lada.

Reaccions histoquímiques

OTO: Reactius: Tiocarbohidrazida (TCH/CH₆N₄S) (Ref. 12370, de Merck) (Seligman i col., 1966); tetròxid d'osmi.

Procediment: 1-Tractament de les reixetes amb una solució de TCH (1%), durant 1 hora a 50°C. La solució de TCH cal preparar-la de 2 a 3 dies abans d'utilitzar-la i deixar-la a l'estufa a 50°C (agitant de tant en tant). 2-Rentats amb H₂O d. (50°C) en gota (de 3 a 5 minuts) i posteriorment en xorro. 3-Vapors d'osmi durant 1 hora (l'osmi precalentat a 50°C) o bé pot realitzar-se l'osmificació al bany maria amb l'H₂O a 60°C.

Resultats: Aquesta tècnica incrementa el contrast dels lípids i de totes aquelles estructures osmiofíliques. El tractament de la mostra és de forma

convencional amb una prefixació amb glutaraldèhid-paraformaldèhid i una postfixació amb osmi.

Thièry: Reactius: Tiocarbhidrazida (TCH/CH₆N₄S) (Ref. 12370, de Merck) (Thièry, 1967); àcid periòdic (Ref. 524 de Merck); proteïnat de plata.

Procediment: 1-Tractament dels talls amb àcid periòdic al 10% (teixit no osmificat), durant 30minuts. 2-Rentar amb aigua destil.lada de 3 a 10minuts. 3-Col.locar els talls en una solució de TCH al 0'2% en àcid acètic al 20%. 4-Rentar: dos passos d'àcid acètic al 10% (ràpids); dos passos d'àcid acètic al 10% (de 2 a 15minuts); un pas d'àcid acètic al 5% (de 1 a 5 minuts); un pas d'àcid acètic al 1 % (de 1 a 5 minuts); passos amb H₂O_d. i finalment rentar a xorro amb H₂O_d. 4-col.locar els talls en proteïnat de plata al 1%, durant 30mints i a les fosques. La solució cal preparar-la de 20 a 30 minuts abans d'utilitzar-la, la pols de proteïnat es deixa sobre l'aigua i no cal agitar, si cal però tapar la solució perque no li toqui la llum. 5-Rentar amb H₂O_d. 6-Rentar amb un xorro d'H₂O_d.

Resultats: El temps d'actuació de la solució de TCH, determina l'afinitat per a diferents substrats. Per incrementar el contrast de les parets cel.lulars i d'alguns orgànuls s'ha deixat actuar entre 48 i 72 hores, tot i que hem tingut problemes de precipitas.

Observació i fotografia: Les observacions s'han fet amb un microscopi electrònic de transmissió Philips 301 i un Hitachi H 600 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

RESULTATS

DIFERENCIACIÓ DE L'ENDODERMIS

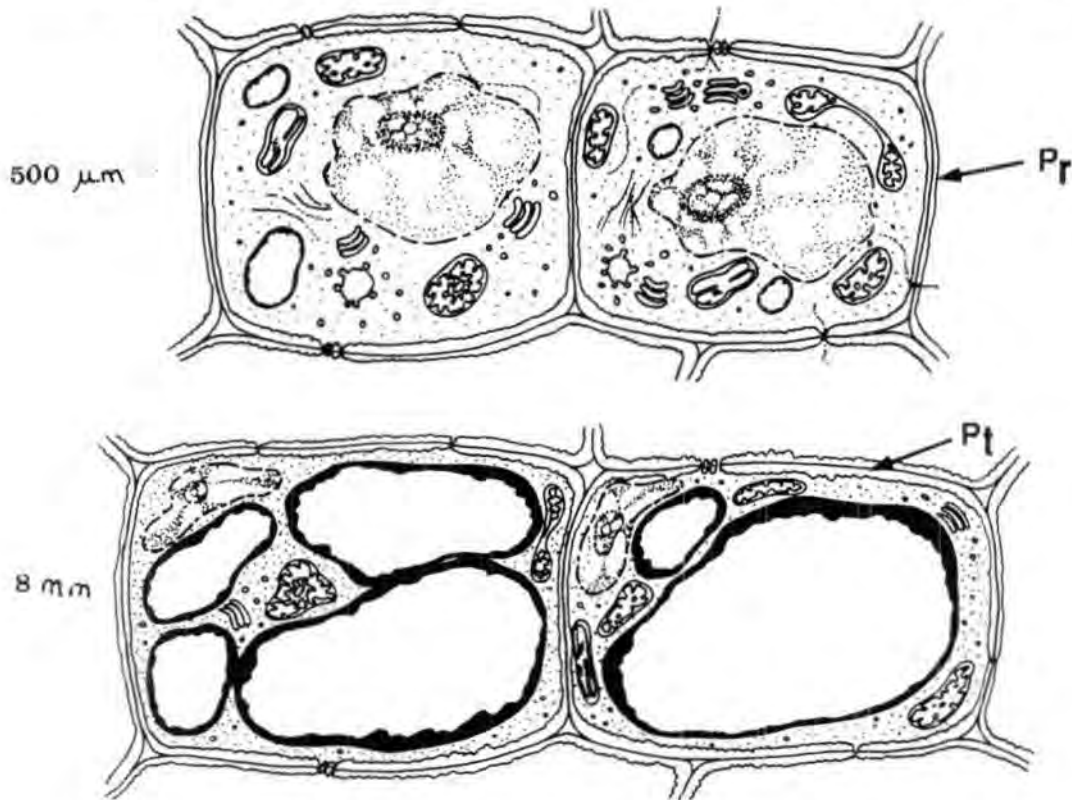
Proendodermis

L'estadi de proendodermis comença a identificar-se a 100-150µm de les cèl.lules inicials, aproximadament quan també comencen a formar-se els pols de floema i finalitza a uns 2'5-3'5cm quan s'observa la banda de Caspari en les parets radials i transversals. En la zona del còrtex en contacte amb el procàmbium, s'hi distingeixen de 3 a 4 capes de cèl.lules, disposades de forma concèntrica i radial, que permeten situar la proendodermis (Làm.I-1). Aproximadament a 1mm de les cèl.lules inicials, la ràpida vacuolització i el creixement de les cèl.lules corticals facilita la identificació de les cèl.lules proendodèrmiques.

En l'estadi de proendodermis, les cèl.lules no presenten característiques ultraestructurals que difereixin de les de les cèl.lules adjacents del còrtex o del cilindre vascular (Esq.4). El citoplasma conté: mitocondris d'aspecte polimorf alguns en forma d'alteri (Làm.I-2, 3), altres presenten secció anular i encerclen petites porcions de citosol (Làm.I-2, 4 i 5); ribosomes lliures; reticle endoplasmàtic; proplastidis, també de forma variable; i nombrosos dictiosomes (Làm.I-2 a 5). També s'observen, tant en les parets radials com tangencials, plasmodesmes (Làm.I-2, 3). Del conjunt de dictiosomes que forma l'aparell de Golgi, en destaquen alguns per presentar 1 o 2 sàculs, generalment els centrals, més osmiòfils i per tenir un elevat nombre de vesícules associades, algunes també osmiòfiles i amb aspecte de cos en ceba (Làm.II-1, 2). En les mostres tractades amb OTO, alguns dictiosomes mantenen l'osmiofilia (Làm.II-3) però, tot i ser més freqüents en les cèl.lules proendodèrmiques, també se n'observen en les cèl.lules del pericicle i del còrtex adjacent (Làm.II-4).

A 200-300µm de les cèl.lules inicials, algunes cèl.lules de la proendodermis i de les capes corticals adjacents reaccionen lleugerament amb FeSO₄ (Làm.III-1). En canvi, a 1-1'5 mm, totes les cèl.lules de la proendodermis i de la capa adjacent del còrtex, inclosos els espais intercel.lulars entre les dues

capas, mostren afinitat pel FeSO_4 , fet que permet delimitar clarament el cilindre vascular que dona resultat negatiu (Làm.III-2). Paral·lelament, al ME s'observen petits acúmuls de material osmiofílic a l'interior dels vacúols que, a mesura que les cèl·lules maduren, esdevenen més conspicus (Làm.I-4, 5; Esq.1).



Esq.1. Cèl·lules endodèrmiques en estat de proendodermis aproximadament a 500 μm i a 8mm. (Pt, paret tangencial; Pr, paret radial).

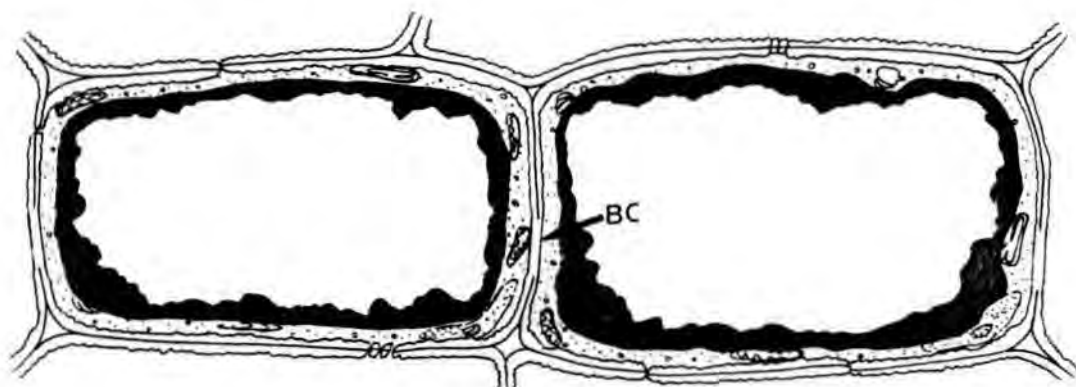
A 2-3 mil·límetres de l'àpex, es fa palesa una diferència en el grau de maduració entre les cèl·lules de la proendodermis situades enfront del floema respecte de les situades en les zones interfloemàtiques (Làm.III-3). Les cèl·lules situades enfront del floema estan més vacuolitzades; el vacúol ocupa pràcticament tot el protoplast i presenta material osmiofílic en la perifèria. En canvi, en les zones interfloemàtiques l'estat de maduració de les cèl·lules de la proendodermis és variable: mentre algunes presenten un nucli prominent i un citoplasma dens, altres estan força vacuolitzades (Làm.III-3).

A uns 8mm de l'àpex i en secció transversal, les cèl·lules proendodèrmiques mesuren uns 15 μm en sentit tangencial i uns 6-8 μm en sentit radial (Esq.1). Es distingeixen de les cèl·lules adjacents del còrtex per estar menys vacuolitzades, ser més petites i lleugerament elongades, -fet que

resulta més evident per a les cèl.lules situades enfront del floema (Làm.III-3)- i per tenir les parets tangencials més gruixudes que les radials (Esq.4). Les parets tangencials tenen un gruix de 0'1 a 0'15 μ m i les radials de 0'07 a 0'1 μ m. En aquest mateix nivell s'observen de 4 a 6 cèl.lules del pericicle que contenen tanins i adjacents a la proendodermis i, que formen com uns arcs o mitges llunes sobre el floema (Làm.III-4). Per sobre els 2cm de l'àpex, quan les cèl.lules del pericicle amb tanins són més nombroses, els arcs ja no s'identifiquen.

Estat I

La banda de Caspari comença a formar-se en les cèl.lules situades enfront el floema, a uns 2'5-3cm de l'àpex (Esq.2). En secció transversal, la banda es localitza en les parets radials en posició lleugerament desplaçada cap el pericicle i ocupa entre un terç i un quart de la paret, això és de 0'8 a 1'3 μ m (Làm.IV-7 i 8). La maduració no sempre és simultània en les parets de dues cèl.lules contigües (Làm.IV-1 i 2).



Esq.2. Cèl.lules endodèrmiques en estat I. BC, banda de Caspari.

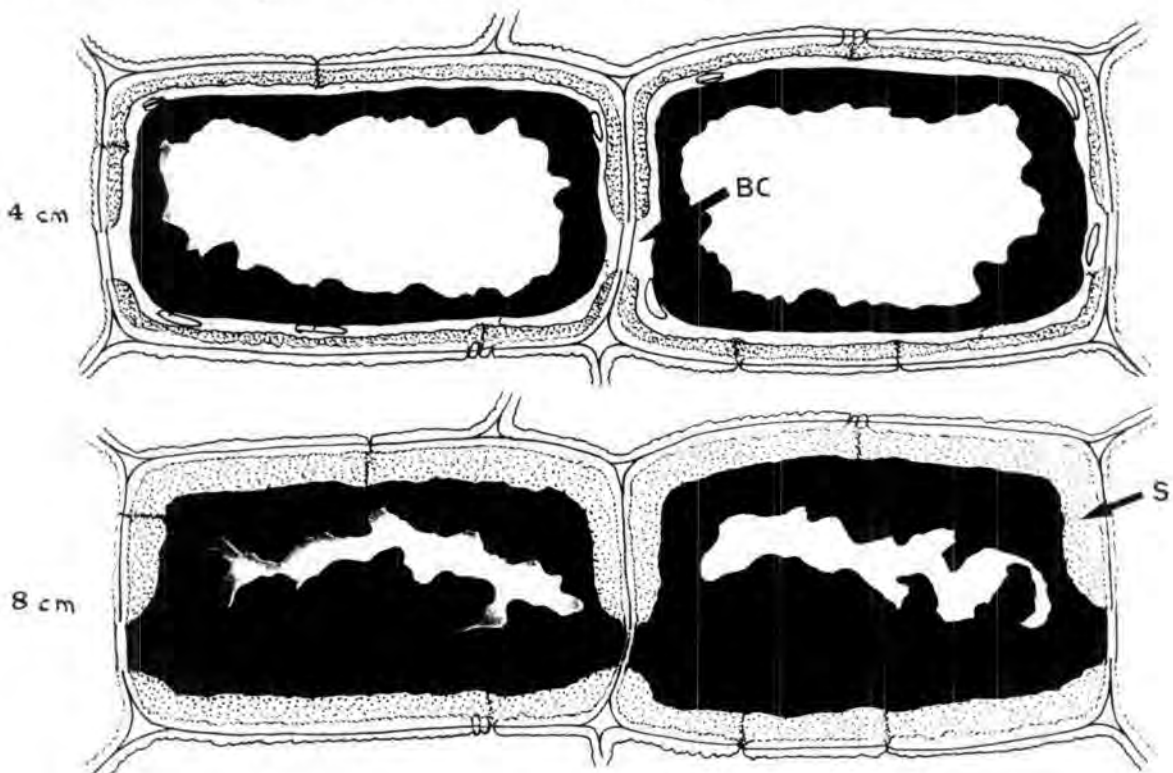
En la banda de Caspari la membrana plasmàtica es troba fortament adherida a la paret cel.lular i és completament llisa (Làm.IV-3 i 8); en alguns casos però, s'observen petites discontinuïtats de la membrana (Làm.IV-3, 5, 6 i 8). A voltes, la cara externa de la membrana en contacte amb la paret cel.lular apareix més densa que la cara citoplasmàtica (Làm.IV-4 i 5). En la banda, el material de la paret cel.lular té aspecte homogeni i compacte, i mentre en algunes cèl.lules es mostra lleugerament més electrodens que la resta de paret (Làm.IV-7), en altres és més electrolúcid (Làm.IV-4, 5 i 8). La làmina mitjana

no es distingeix. La maduració de la banda comporta un lleuger increment de la seva longitud, però no hi ha canvis perceptibles en la seva posició.

En les cèl·lules en Estat I es continua observant un citoplasma ric en orgànuls (Làm.IV-1), però, a diferència de l'etapa de proendodermis, els dictiosomes no presenten sàculs osmiofílics. Aparentment, el nombre de plasmodesmes per unitat d'àrea és menor, en relació al de les cèl·lules del còrtex i del pericicle i, també, ho és en relació a l'estadi de proendodermis. Molt rarament es troben plasmodesmes en la banda de Caspari (Làm.IV-3).

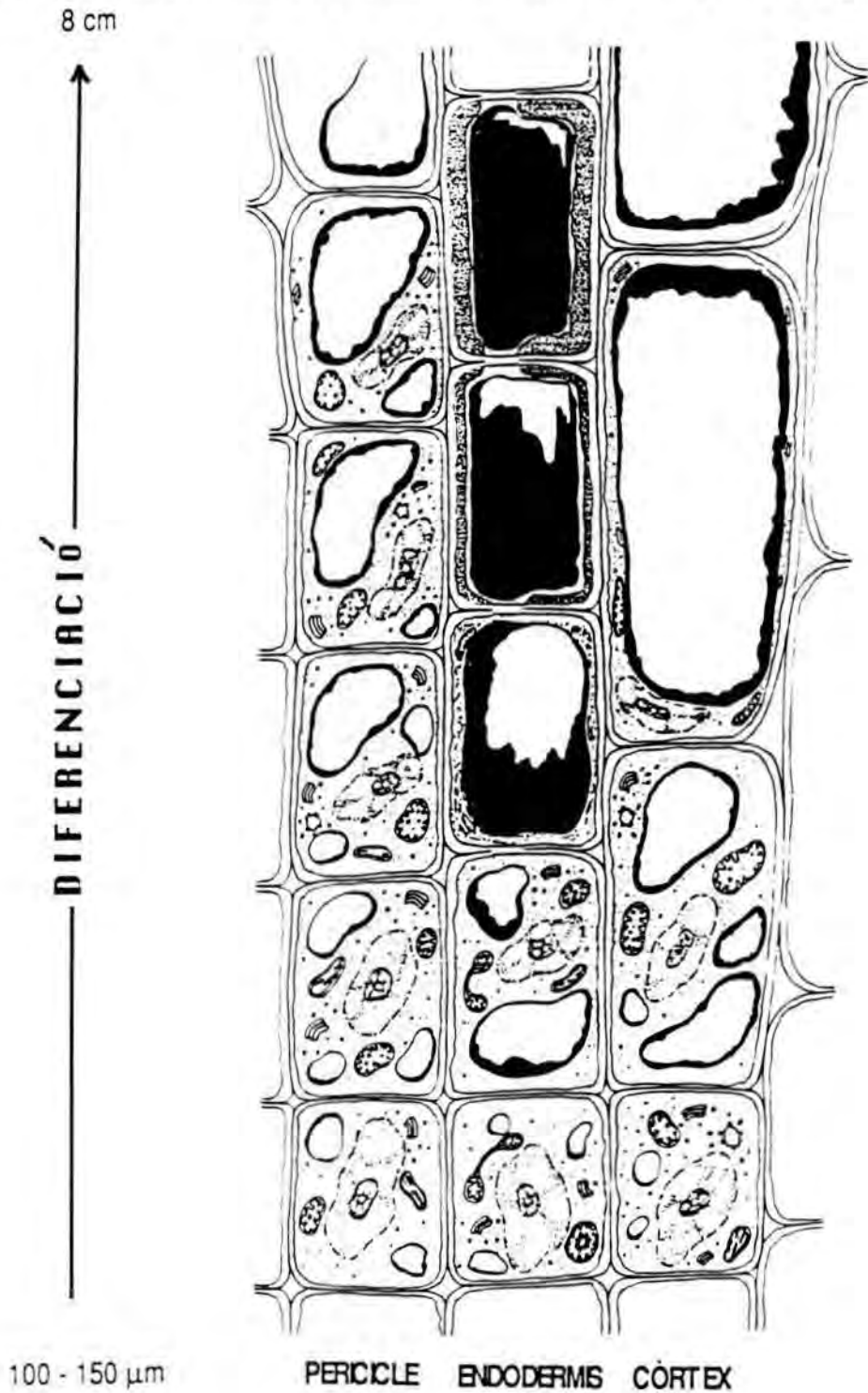
Estat II

Les primeres cèl·lules suberitzades s'observen en secció transversal, a 3-3'5cm de l'àpex, en grups de 5-8 cèl·lules, en la zona situada enfront del floema; en aquest nivell encara no s'ha completat la maduració del metaxilema (Làm.V-1). A uns 5cm de l'àpex totes les cèl·lules presenten suberina, excepte, alguna cèl·lula (de 2 a 3 en s.t.) situada enfront dels feixos de xilema (Làm.V-2). Entre els 7-8cm tota l'endodermis està suberitzada, mesurant les cèl·lules en secció transversal uns 25µm en sentit tangencial i uns 10µm en sentit radial (Làm.VIII-1; Esq.3). No s'observen cèl·lules de pas.



Esq.3. Cèl·lules endodèmiques en estat II aproximadament a 4cm i a 8cm. BC, banda de Caspari; S, suberina.

En les cèl.lules en Estat II, es continuen observant mitocondries, proplastidis, dictiosomes i cossos multivesiculars (Làm.V-3). Destaca la posició paramural d'alguns dictiosomes i cossos multivesiculars, alguns dels quals es



Esq.4. Esquema on es mostren els canvis morfològics que tenen lloc durant el procés de diferenciació de les cèl.lules endodèmiques comparativament amb els de les cèl.lules adjacents del pericicle i del còrtex, des de 100-150µm de l'apex fins a uns 8cm.

presenten en l'espai extracel·lular (Làm.V-4; Là.m.VII-2). La majoria de dictiosomes presenten nombroses vesícules associades i tenen les cisternes lleugerament dilatades (Làm.VI-1). S'observen microtúbuls situats prop de la membrana plasmàtica (Làm.V-5) i, en algun cas, en la zona de la banda de Caspari (Làm.VII-1). També, s'observa algun plasmodesma de 30-40nm de diàmetre, tant en les parets tangencials com radials (Làm.VI-2; Là.m.VII-3). La membrana plasmàtica està separada de la paret cel·lular inclús en la banda de Caspari (Làm.VII-1, 4; Là.m.IX-2, 3). En aquesta fase, el contingut osmiofílic del vacúol és variable. En algunes cèl·lules no s'observa material osmiofílic en el vacúol i el citoplasma pren un aspecte aglevat (Làm.VI-3). En altres, en canvi, el material osmiofílic es troba precipitat a la perifèria del vacúol o bé dispers. A mesura que la suberització progressa el citoplasma esdevé senescent i el material osmiofílic tendeix a extravessar-se, fins i tot en les arrels tractades amb un antioxidant com l'àcid ascòrbic (Làm.VI-3). Les cèl·lules del còrtex adjacent a l'endodermis mantenen, en general, el material osmiofílic en el vacúol (Esq.4).

La suberina al ME és electrolúcida (Làm.VII-1 a 4). En la capa de suberina es distingeixen lamel·les de 5 a 13nm de gruix, més clares que la resta de material (Làm.VII-2, 3). En la majoria de mostres la disposició de les lamel·les és irregular: s'observen més juntes en la zona adjacent a la paret cel·lular i més esparses o absents en la zona adjacent al citoplasma (Làm.VII-2; Là.m.IX-4). Al voltant dels plasmodesmes les lamel·les són més conspicues i tenen un aspecte distorsionat (Làm.VI-2; Là.m.VII-3). Entre la suberina s'observen petits acúmul·ls, més o menys alineats, de material electrodens (Làm.VII-2, 3). El gruix de la capa de suberina és bastant uniforme, a 3-3'5cm de l'àpex mesura uns 40nm i a 4'5-6cm de 200-300nm, excepte en els plasmodesmes i en la banda de Caspari (Làm.VII-4). En els plasmodesmes és superior (Làm.VI-2; Là.m.VII-3, 4); en canvi, en la majoria de cèl·lules, en la zona central de la banda de Caspari el recobriment de suberina és parcial i ocasionalment total (Làm.VI-3; Là.m.VII-1, 4; Là.m.IX-2, 3). En les cèl·lules madures, degut al gruix de la capa de suberina, la banda de Caspari té l'aparença d'una puntejadura.

HISTOQUÍMICA DE LA PARET CEL·LULAR

Els resultats dels diferents tests histoquímics pel seguiment de la maduració de la paret cel·lular de l'endodermis es resumeixen en la taula 1.

En l'estat de proendodermis, totes les proves realitzades per detectar suberina i lignina han donat negatiu igualment que en l'Estat I. En l'estat de proendodermis i Estat I les cèl·lules de l'endodermis no mostren autofluorescència, no reaccionen amb el vermell de Sudà 7B, ni amb el negre de Sudà per a la suberina (Ryser i col. 1983), ni amb la tinció berberina-blau d'anilina per intensificar la fluorescència de la suberina de la banda de Caspari (Brundrett i col. 1988). També resulta negativa la reacció de floroglucinol per la lignina. Al ME les proves realitzades amb la reacció d'OTO per incrementar el contrast dels lípids (Seligman i col. 1966) també donen negatiu, tant a la banda de Caspari com a la resta de la paret; només donen lleugerament positiu quan les microfotografies es revelen incrementant el temps de revelat 10 vegades al normal (Làm.IX-1).

En canvi, en l'Estat II, les cèl·lules són autofluorescents, la suberina lamel·lar excitada amb llum ultraviolada emiteix llum blava (Làm.VIII-1). La suberina lamel·lar també presenta afinitat tant pel vermell com pel negre de Sudà, afinitat que no presenta la zona de la banda de Caspari (Làm.VIII-2, 3). A mesura que avança la maduració, l'autofluorescència de les parets contrasta amb l'autofluorescència més brillant de les 2-3 capes de cèl·lules de la peridermis intensament suberificades (Làm.VIII-5). Amb berberine-blau d'anilina, la fluorescència de les parets radials no difereix de les restants. Les cèl·lules endodèrmiques també mostren una progressiva lignificació de les parets: primer, reaccionen amb floroglucinol-HCl els angles interns de les cèl·lules i les parets radials; i, finalment, les tangencials (Làm.VIII-4).

Al ME, la capa de suberina reacciona molt intensament amb la tinció d'OTO i apareix electrodensa contrastant amb el material de la paret primària que es manté electrolúcid, inclús en la zona de la banda de Caspari (Làm.IX-2, 3). Les lamel·les amb la coloració d'OTO continuen observant-se electrolúcides (Làm.IX-4). La capa de suberina no mostra afinitat pel reactiu de Thiéry per hidrats de carboni (Thiéry L.P. 1967) presentant un aspecte nacrat que ressalta amb l'aspecte lax i dispers del material de la paret primària de les cèl·lules adjacents (Làm.IX-5). Amb el reactiu de Thiéry, també, es continua observant l'aspecte lamel·lar dels primers dipòsits de suberina (Làm.IX-5); en canvi, aparentment, no s'observen els petits acúmuls electrodensos. Recobrint la capa

de suberina s'hi diposita una fina capa de material cel.lulòsic amb afinitat pel reactiu de Thièry (Làm.IX-5).

PROEND	ESTAT I	ESTAT II	
		Inical	Avançat

MO: Negre de Sudà (suberina)	-	-	Capa de suberina exclusivament.	Capa de suberina exclusivament.
MO: Vermell de Sudà 7 B (suberina)	-	-	Capa de suberina exclusivament.	Capa de suberina exclusivament.
MOep: Autofluo+ Floroglucinol (suberina). Exc. llum UV	-	-	-	Intensa.
MOep: Berberine-blau d'anilina (suberina BC). Exc. llum UV	-	-	-	Dèbil. Les parets radials no difereixen de les tangencials.
MO: Floroglucinol (lignina)	-	-	-	Lignificació progressiva.
TEM: OTO	-	-	Capa de suberina exclusivament	Capa de suberina exclusivament
TEM: Thièry	Paret cel. lària.	Paret cel. lària Banda Caspari	Paret cel. lària. Banda de Caspari	Paret cel. lària. Banda de Caspari

Taula 1: Resultats obtinguts dels tests histoquímics realitzats en el MO de camp clar (vermell de Sudà 7B, negre de Sudà i floroglucinol-HCl), en el MO d'epifluorescència (MOep) (autofluorescència apagada amb floroglucinol-HCl, i la tinció berberina-blau d'anilina), i al TEM (OTO, i Thièry). Observi's els canvis que es produeixen en la paret cel.lular durant la maduració de l'endodermis: primer suberificació i, progressivament, lignificació.

LÀMINA I

Figures: 1 a 5

LÀMINA I

Fig.1, Fotografia al MO d'una secció transversal aproximadament a 250µm del meristema radicular. Figs.2 a 5, Fotografies al MET de seccions obtingudes a uns 1'5-2mm del meristema radicular.

C, còrtex; DI, dictiosoma; E, endodermis; EI, espai intercel·lular; F, floema; MI, mitocondria; NU, nucli; P, pericicle; PCA, procàmbium; PC, paret cel·lular; PCR, paret cel·lular radial; PE, proendodermis; PP, proplastidi; VA, vacúol.

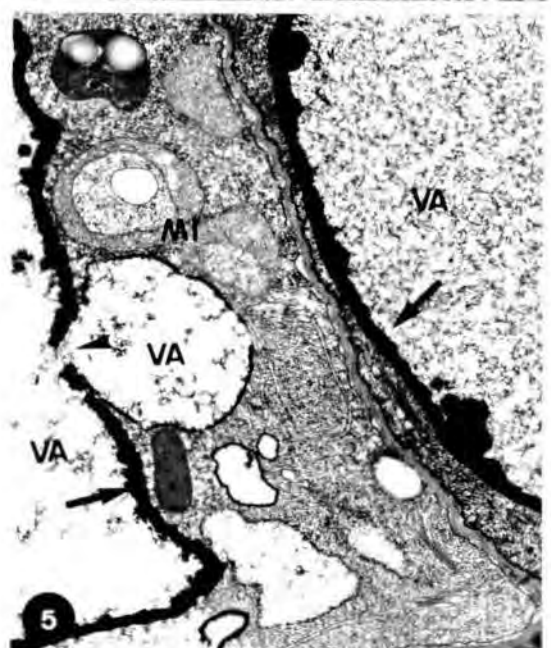
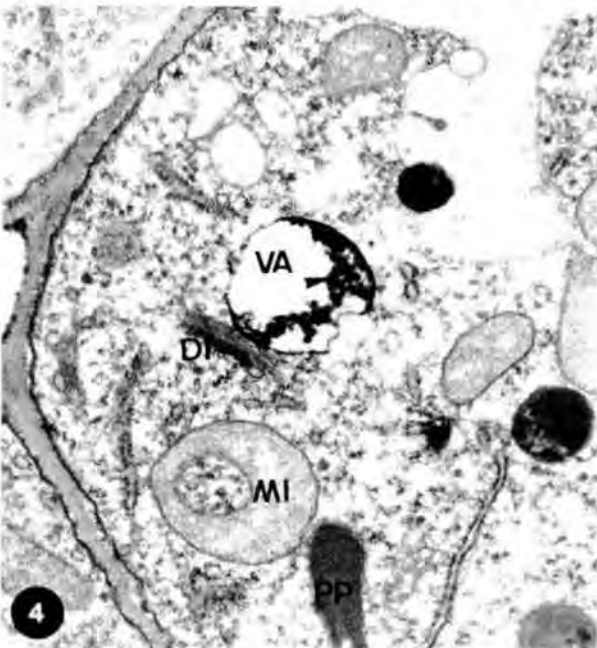
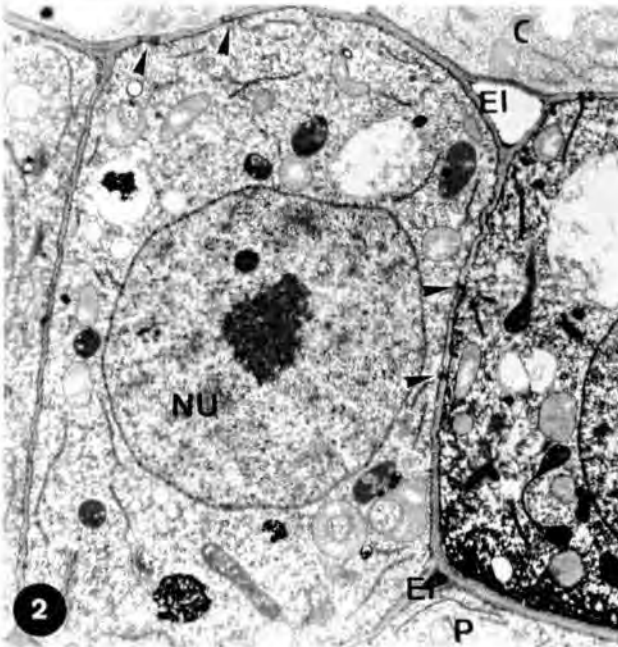
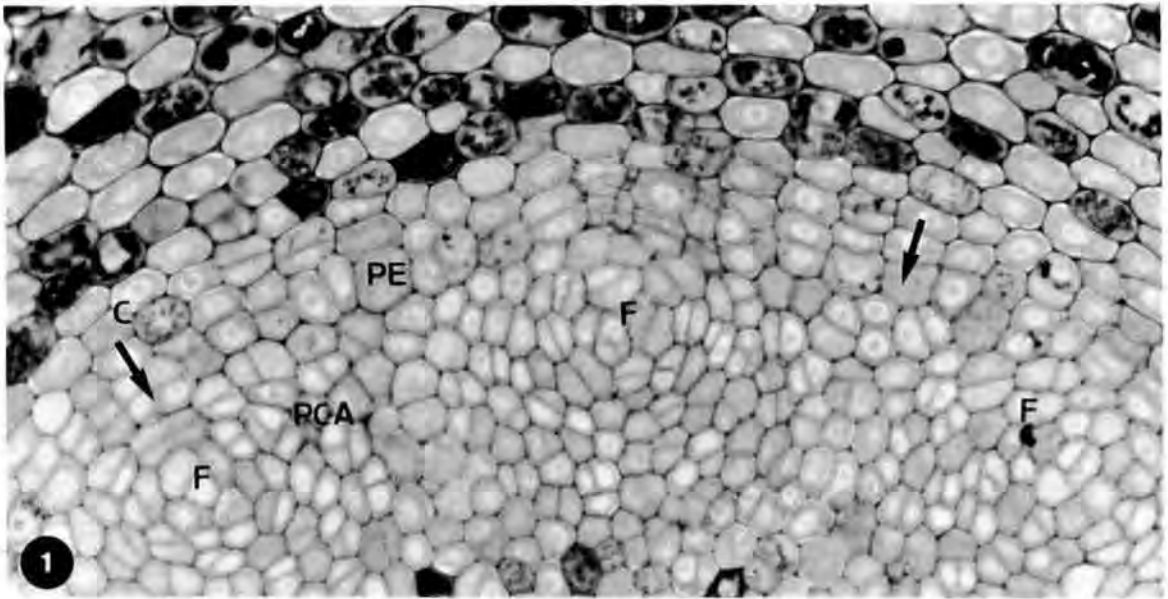
Fig.1-Observi's en la zona del còrtex intern, en contacte amb el procàmbium, de 3-4 capes de cèl·lules de les quals la més interna donarà lloc a la proendodermis (fletxa). Fixi's que algunes d'aquestes cèl·lules s'han dividit recentment (cap de fletxa). En el procàmbium s'observa l'organització de tres pols de floema. Tinció: incubació amb FeSO₄ (48hores) - PA-Schiff-blau de toluidina. X 470.

Fig.2-Vista general d'una cèl·lula proendodèrmica. Observi's el nucli en posició central i el citoplasma ric en orgànuls. Fixi's amb l'espai intercel·lular buit entre la proendodermis i el còrtex en formació, i l'espai intercel·lular entre la proendodermis i el pericicle ple de material osmiofílic. Tant en la paret radial com en la tangencial s'observen plasmodesmes (caps de fletxa). X10 442.

Fig.3-Paret radial d'una cèl·lula proendodèrmica amb plasmodesmes (fletxes). Noti's la forma d'alteri de la mitocondria, i la presència d'un dictiosoma amb diverses vesícules associades amb aspecte de cos en ceba (cap de fletxa). X 33 000.

Fig.4-Detall d'una porció de citoplasma en què s'observa una mitocondria tipus anular, proplastidis, dictiosomes, i un vacúol amb material osmiofílic en el seu interior (cap de fletxa). X22 520.

Fig.5-Detall de dues cèl·lules proendodèrmiques a uns 2mm de l'àpex. Observi's en la cèl·lula de l'esquerra nombrosos orgànuls (mitocondris, proplasts, reticle endoplàsmic..) i algun vacúol de petit tamany amb material osmiofílic precipitat en la periferia, noti's també la presència d'un vacúol que sembla fusionar-se amb el vacúol central (cap de fletxa). En la cèl·lula de la dreta s'observa el citoplasma en posició parietal degut el gran tamany del vacúol (fletxes). X 13 500.



LÀMINA II

Figures: 1 a 4

LÀMINA II

Fotografies al MET de seccions d'arrel obtingudes a uns 1'5-2mm del meristema radicular.

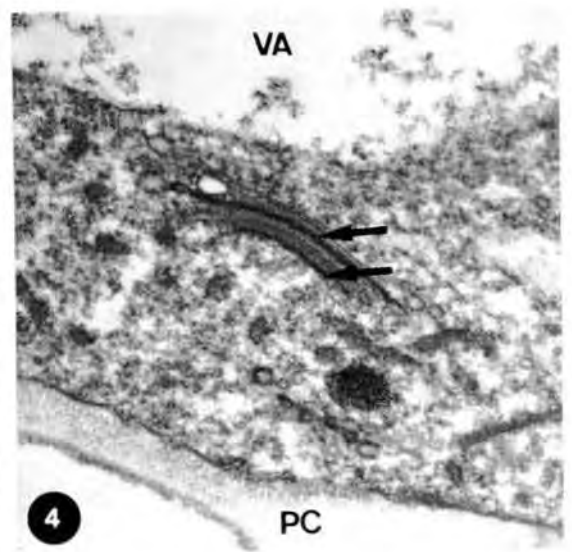
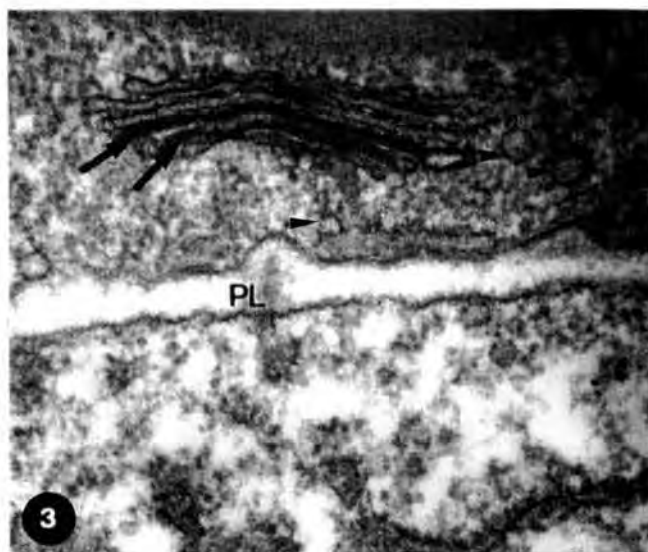
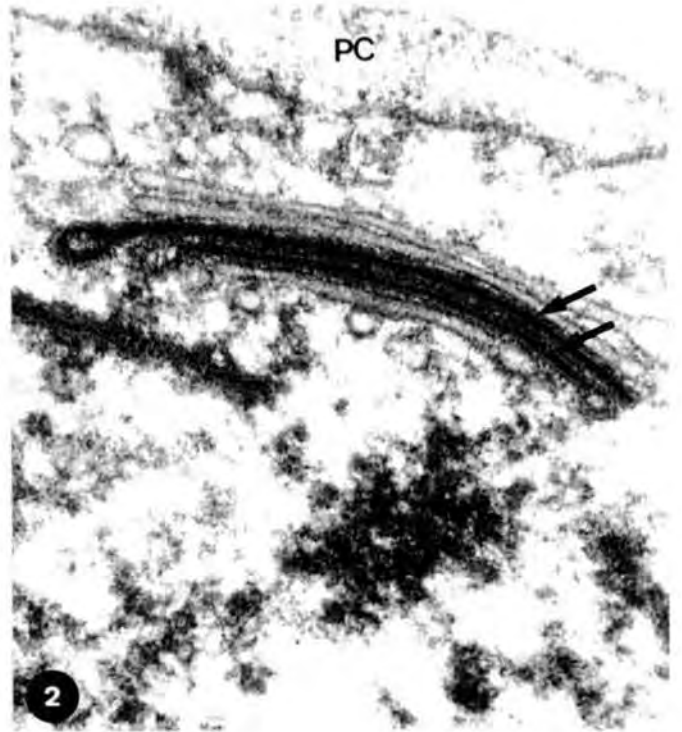
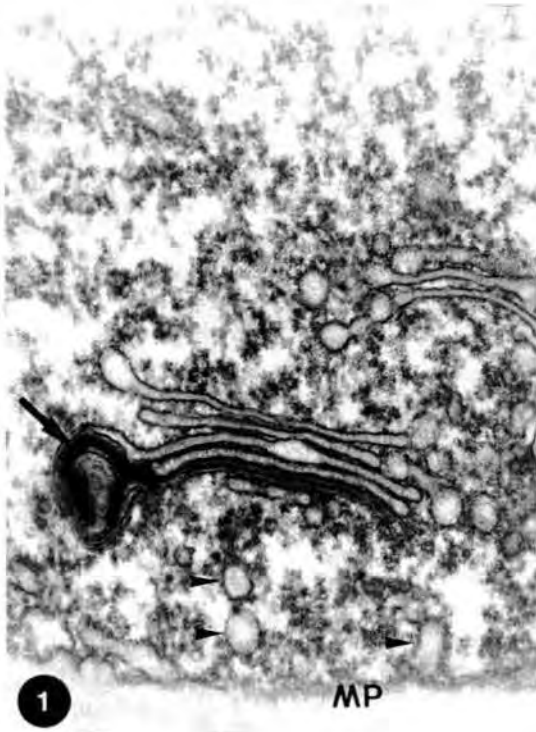
C, còrtex; DI, dictiosoma; MP, membrana plasmàtica; PC, paret cel.lular; PL, plasmodesme.

Fig.1-Dictiosoma d'una cèl.lula proendodèrmica mostrant un dels sàculs osmiòfils, de la cara trans. Fixi's amb la vesícula associada amb aspecte de cos en ceba (fletxa). Observi's també la seva disposició paramural i la presència de nombroses vesícules localitzades entre el dictiosoma i la membrana plasmàtica (caps de fletxa). X 60000.

Fig.2-Dictiosoma d'una cèl.lula proendodèrmica amb dos dels sàculs centrals amb material osmiofílic (fletxes). X 98040.

Fig.3-Dictiosoma d'una cèl.lula proendodèrmica tractada amb la reacció d'OTO per lípids. Es continuen observant alguns sàculs amb material osmiofílic (fletxes). Noti's també la posició paramural del dictiosoma i la presència de vesícules entre aquest i la membrana plasmàtica (caps de fletxa). Fixi's amb el plasmodesme. X 66000.

Fig.4-Dictiosoma d'una cèl.lula del còrtex adjacent tractada amb OTO. Observi's que dos dels sàculs del dictiosoma presenten material osmiofílic (fletxes). X 33000.



LÀMINA III

Figures: 1 a 4

LÀMINA III

Fotografies al MO.

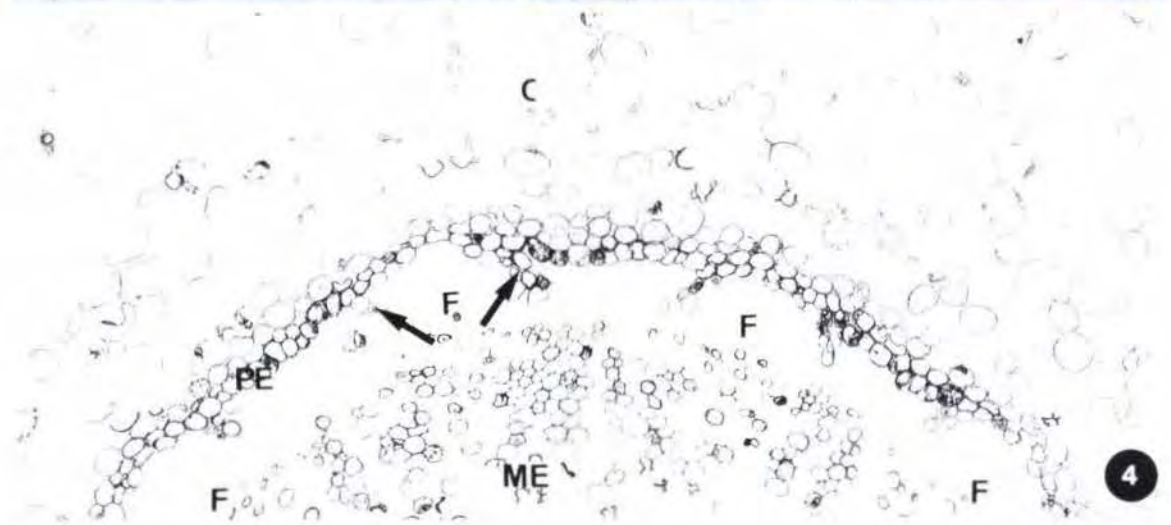
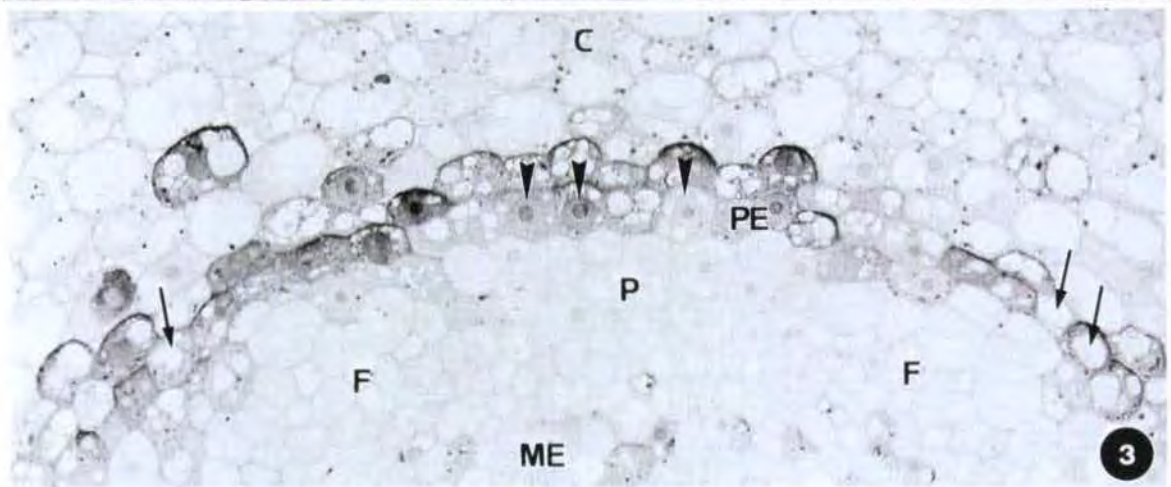
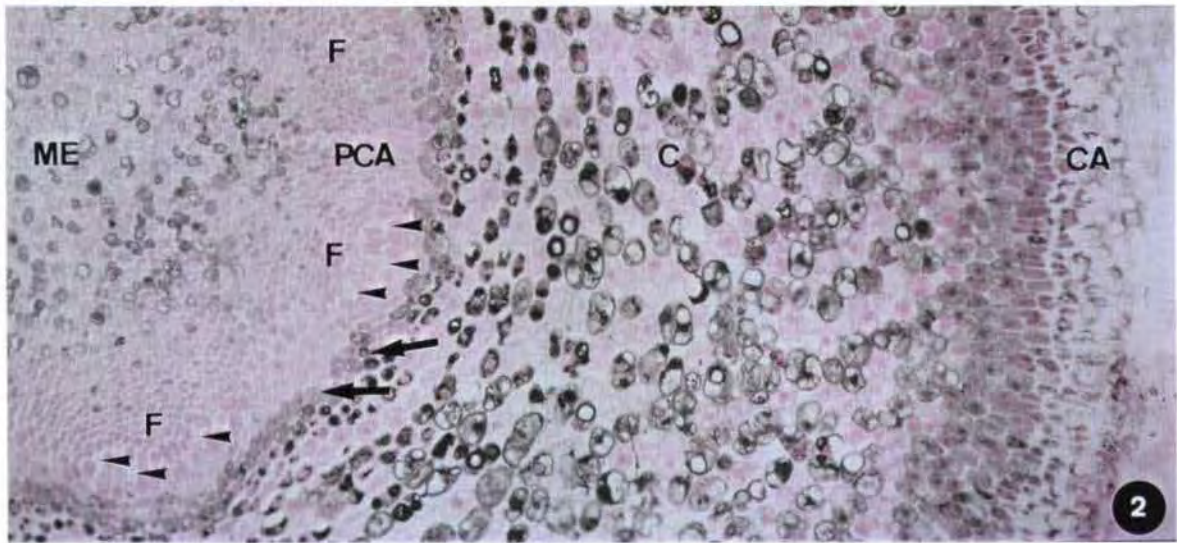
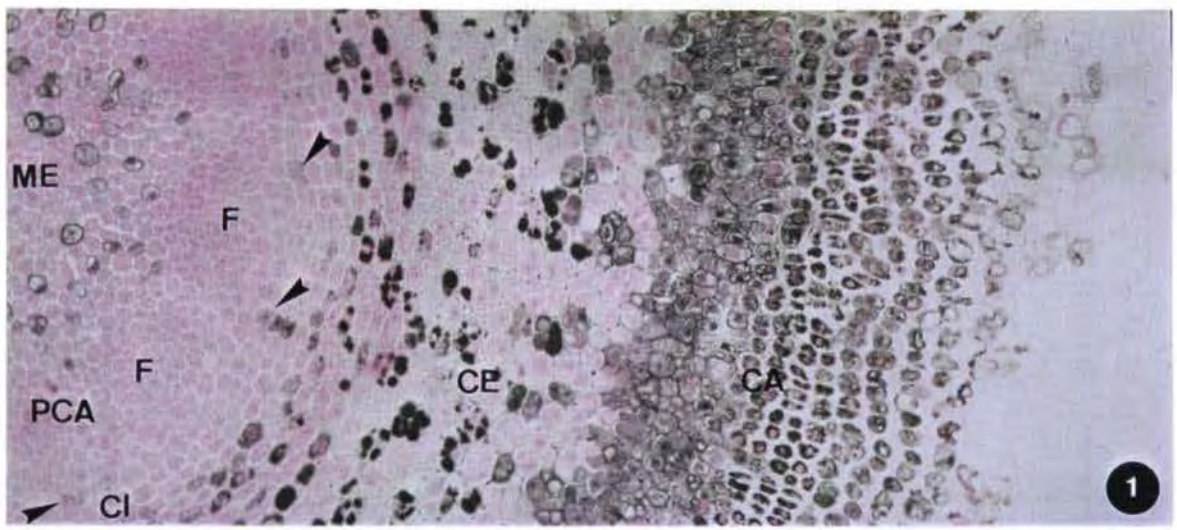
C, còrtex; CA, caliptra; CE, còrtex extern; CI, còrtex intern; F, floema; ME, medul·la; P, pericicle; PCA, procàmbium; PE, proendodermis.

Fig.1-Secció transversal a uns 250µm del meristema radicular. Observi's en el còrtex intern de 3 a 4 capes de cèl·lules en posició concèntrica i radial en les que destaca la presència d'alguna cèl·lula de la proendodermis amb tanins (cap de fletxa). Fixi's que en el procàmbium comença l'organització dels pols de floema. Tinció: eritrosina (FeSO₄). X 250.

Fig.2-Secció transversal a un 1mm de l'àpex. Observi's que tant les cèl·lules de la proendodermis com les de la capa del còrtex adjacent contenen tanins (fletxes). En canvi, no se n'observen en el procàmbium. Noti's que en els pols de floema s'observen de 2 a 3 elements del protofloema (caps de fletxa). Tinció: eritrosina (FeSO₄). X 225.

Fig.3-Secció transversal a uns 3mm de l'àpex on s'observa el diferent grau de maduració de les cèl·lules de la proendodermis en front el floema de les cèl·lules de les zones interfloemàtiques. En front el floema les cèl·lules de la proendodermis són més vacuolitzades (fletxa), en canvi, en la majoria de cèl·lules, de les zones interfloemàtiques encara s'aprecia un conspicu nucli (caps de fletxa). Tinció: blau de toluidina (Cafeïna). X 440.

Fig.4-Secció transversal a uns 8mm de l'àpex. Observi's que algunes de les cèl·lules del pericicle enfront del floema contenen tanins i es disposen en forma d'arcs o mitges llunes (fletxes). Tractament: (FeSO₄). X 220.



LÀMINA IV

Figures: 1 a 8

LÀMINA IV

Fotografies al MET de seccions transversals d'arrels obtingudes a uns 2'5-3'5cm de l'àpex. BC, banda de Caspari; C, còrtex; DI, dictiosoma; MI, mitocòndria; P, pericicle; PC, paret cel.lular; RE, reticle endoplasmàtic; VA, vacúol.

Fig.1-Paret radial, inici formació de la banda de Caspari (fletxes). Observi's el citoplasma parietal ric en orgànuls, mitocòndries, dictiosomes, reticle endoplasmàtic i la presència d'un gran vacúol amb material osmiofílic. X 23000.

Fig.2-Observi's que la banda de Caspari no es forma simultàniament en les cèl.lules contigües. En una de les cèl.lules la membrana plasmàtica està pràcticament adherida, mentre que en l'altra no (fletxa). X 33000.

Fig.3-Banda de Caspari on s'observa un plasmodesme (fletxa) i alguna discontinuïtat de la membrana plasmàtica (cap de fletxa). Secció tractada amb OTO per lípids. X 33000.

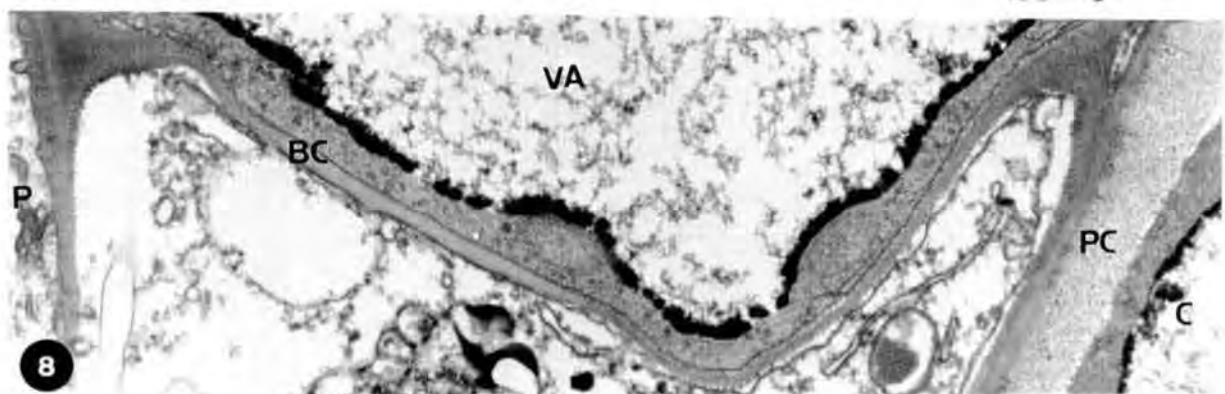
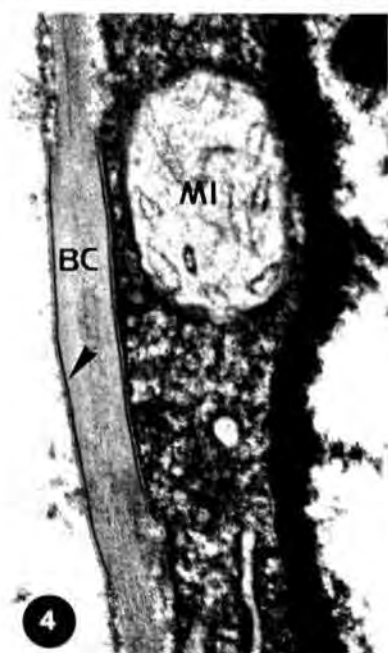
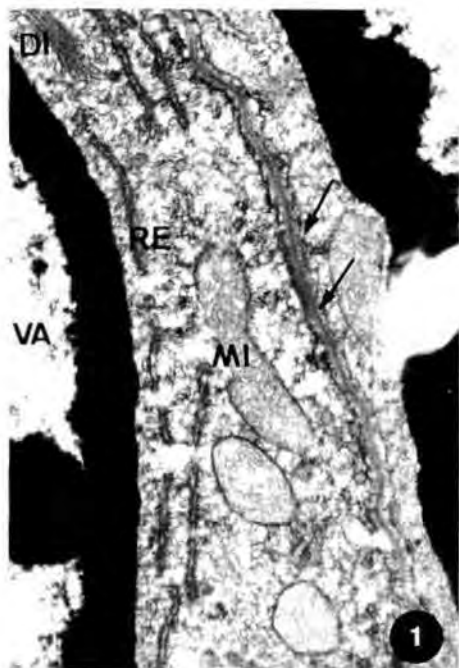
Fig.4-Banda de Caspari. Observi's que la cara externa de la membrana plasmàtica és més densa que la cara interna (cap de fletxa). X 66000.

Fig.5-Observi's que la longitud de la banda de Caspari en dues cèl.lules contigües no sempre es correspon (fletxes). Fixi's amb la mitocòndria amb forma d'alteri. X 33000.

Fig.6-Detall de la fig.5 on es pot observar la discontinuïtat de la membrana (fletxa). X 77000.

Fig.7-Paret radial, la banda de Caspari representa aproximadament un quart de la paret. Fixi's amb la compacticitat i homogeneïtat del material de la banda de Caspari, i, també, en que el material de la banda és més electrodens que la resta de paret. X 30600.

Fig.8-Paret radial. La banda de Caspari representa entre un terç i la meitat de la paret. Observi's que el material de la banda de Caspari també és molt compacte i homogeni però, en canvi, és més electrolúcid que la resta de paret. En la cèl.lula situada en la part superior de la fotografia s'observa el vacúol amb material osmiofílic precipitat en la perifèria; en l'altra, en canvi, el citoplasma pren un aspecte aplevat. Noti's l'engruïment de la paret cel.lular del còrtex. X 26400.



LÀMINA V

Figures: 1 a 5

LÀMINA V

Figs.1 i 2. Fotografies al MO de seccions transversals obtingudes a 4 i 5 cm de l'àpex respectivament. Figs.3 a 5. Fotografies al MET de seccions transversals obtingudes aproximadament a 4'5cm de l'àpex.

C, còrtex; CV, cossos multivesiculars; DI, dictiosoma; E, endodermis; F, floema; ME, medul·la; MI, mitocòndria; MT, microtúbuls; P, pericicle; PC, paret cel·lular; PP, proplastidis; S, suberina; VA, vacúol; X, xilema

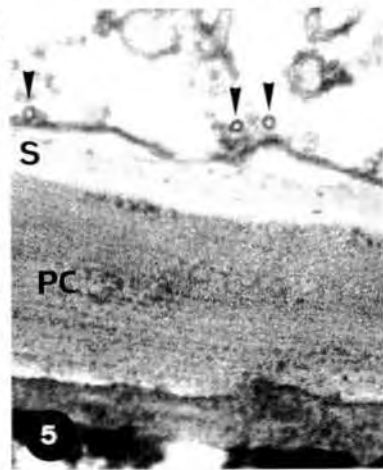
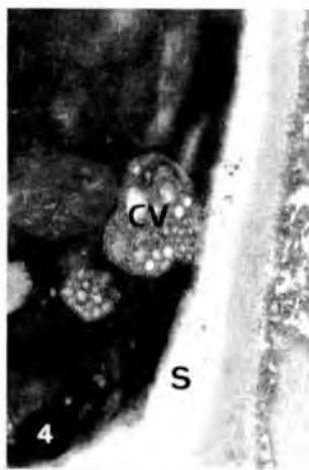
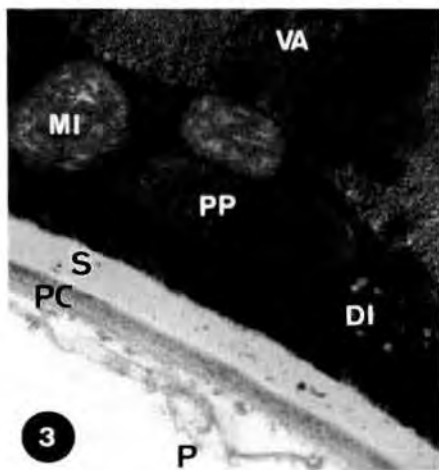
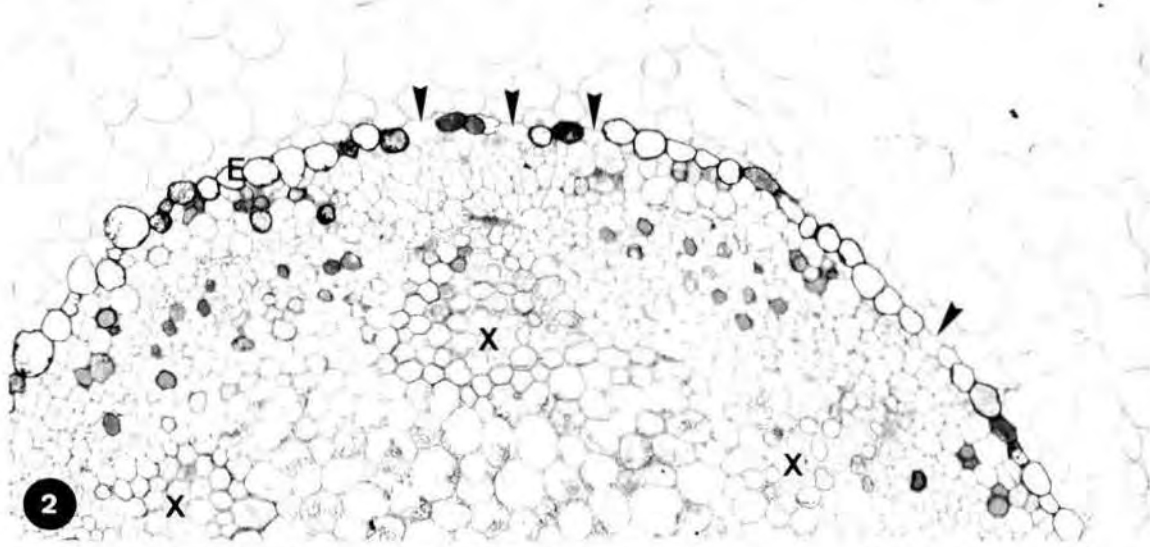
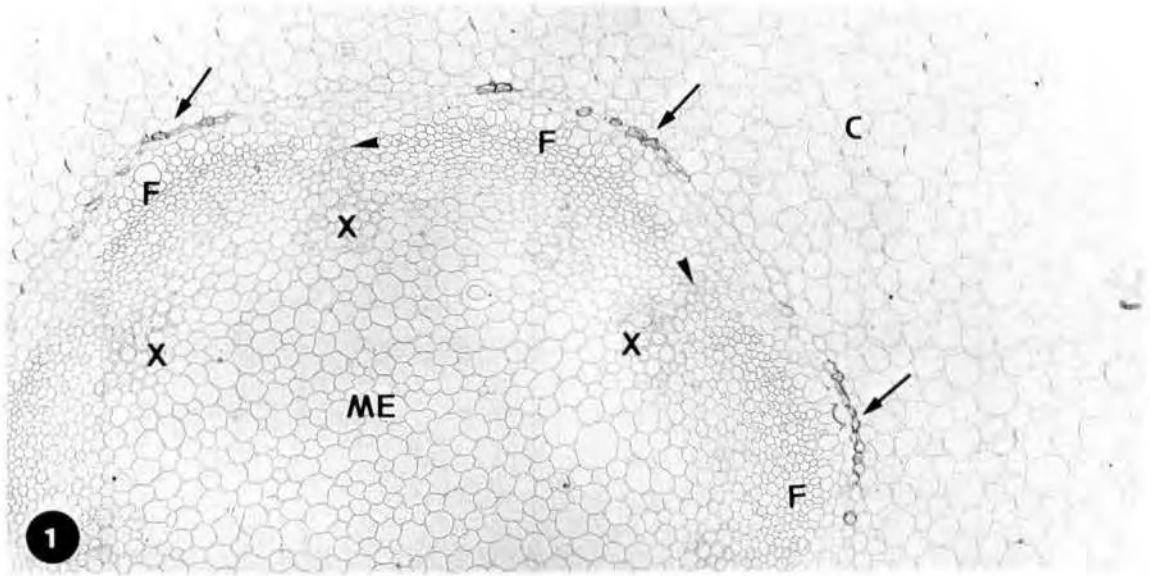
Fig.1-Observi's en l'endodermis els grups de 5-8 cèl·lules Sudà positives en front els feixos de floema (fletxes). Noti's que en els feixos de xilema s'observa protoxilema (caps de fletxa) i metaxilema en formació. Tinció: vermell de Sudà 7B. X 125.

Fig.2-Secció on s'observen pràcticament totes les cèl·lules de l'endodermis suberitzades, excepte de 2 a 3 cèl·lules disperses en front els pols de xilema (caps de fletxa). Tinció: vermell de Sudà 7B. X 200.

Fig.3-Detall d'una porció de citoplasma d'una cèl·lula endodèrmica amb el material osmiofílic extravessat; tot i així, en el citoplasma, s'observen mitocòndries, proplastidis i dictiosomes. Fixi's amb el gruix de la capa de suberina respecte del gruix de la paret cel·lular de l'endodermis i pericicle. X 37650.

Fig.4-Detall d'un cos multivesicular en posició paramural i aparentment fusionat amb la capa de suberina. X 26100.

Fig.5-Observi's els 3 microtúbuls pròxims a la membrana plasmàtica (caps de fletxa). Compari's l'aspecte de la capa de suberina i l'aspecte més lax i fibrós de la paret cel·lular primària de l'endodermis i còrtex. X 66000.



LÀMINA VI

Figures: 1 a 3

LÀMINA VI

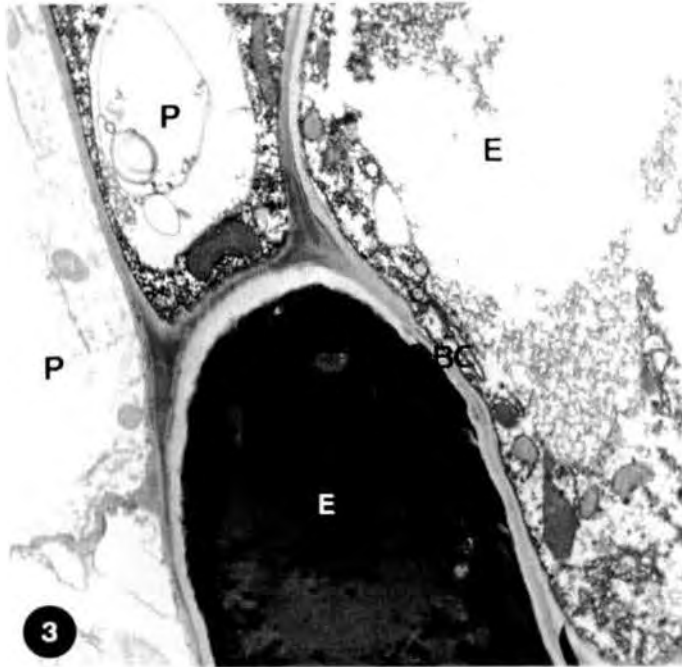
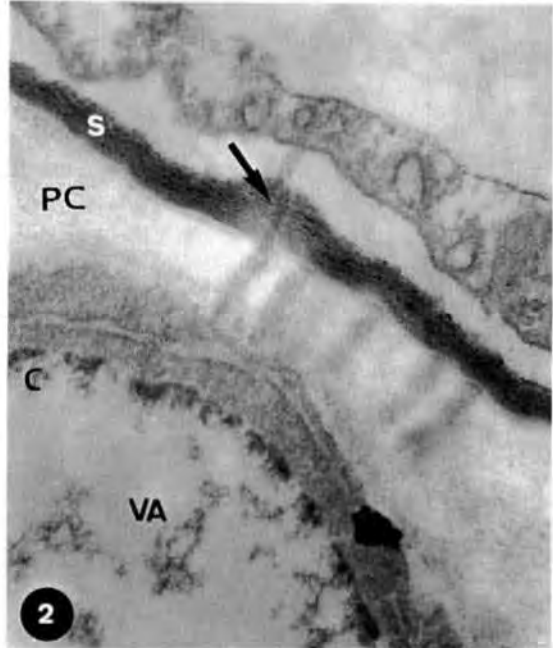
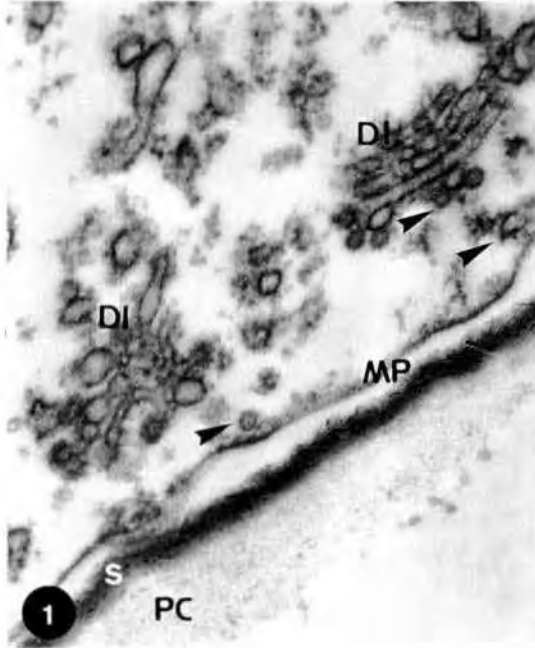
Figs.1 i 2. Fotografies al MET de seccions transversals obtingudes aproximadament a 4'5cm de l'àpex. Les seccions han estat tractades amb OTO per lípids. Fig.3 Fotografia al MET d'una secció quasi longitudinal aproximadament a uns 4'5cm de l'àpex.

BC, banda de Caspari; C, còrtex; DI, dictiosoma; E, endodermis; MP, membrana plasmàtica; P, pericicle; PC, paret cel.lular; S, suberina; VA, vacúol.

Fig.1-Secció en què s'observen dos dictiosomes disposats paramuralment. Fixi's amb la presència de nombroses vesícules associades, algunes de les quals s'observen entre aquests dictiosomes i la membrana citoplasmàtica (caps de fletxa). X 53000.

Fig.2-Grup de plasmodesmes entre una cèl.lula endodèrmica i una cèl.lula del còrtex adjacent. Observi's que un d'ells és continu a través de la capa de suberina (fletxa). X 53000.

Fig.3-Aspecte general de dues cèl.lules endodèrmiques contigües en què s'observa el diferent estat del citoplasma. En la cèl.lula situada a la dreta de la fotografia, el citoplasma s'observa aplegat, mentre que en l'altra, el material osmiofílic extravessat emmascara tot el citoplasma. X 8000.



LÀMINA VII

Figures: 1 a 4

LÀMINA VII

Fotografies al MET de seccions transversals obtingudes aproximadament a 4'5cm de l'apex.

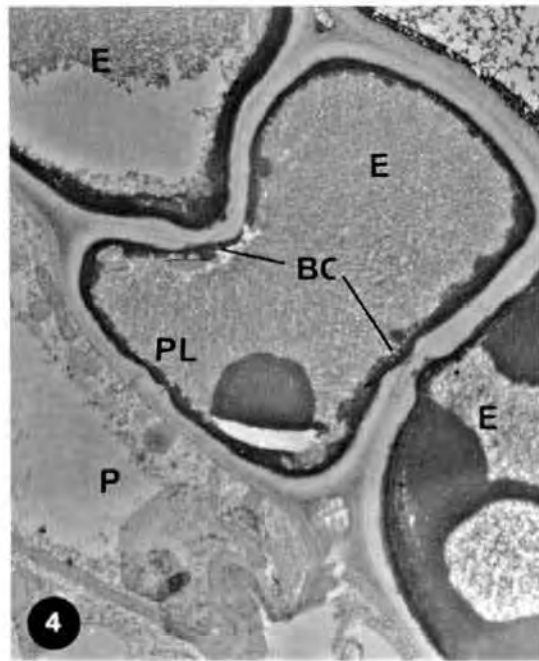
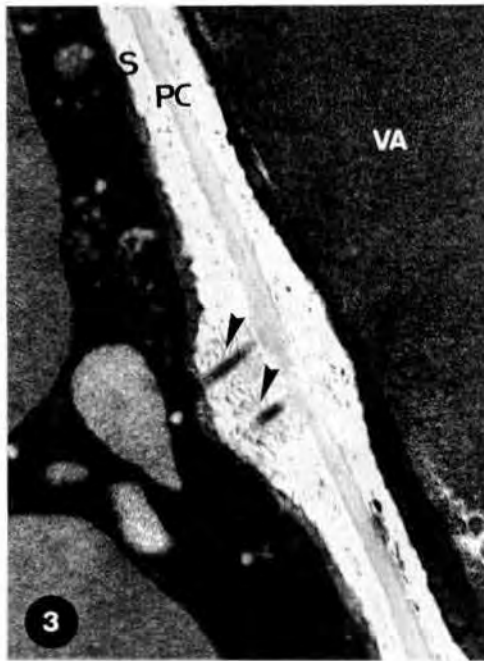
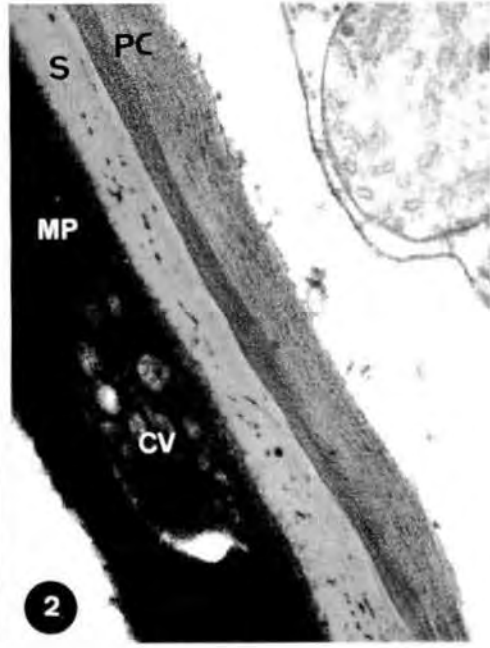
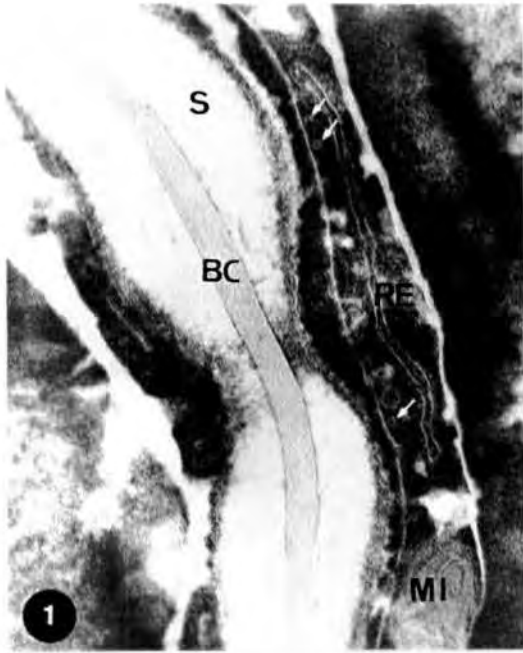
BC, banda de Caspari; CV, cos multivesicular; E, endodermis; MI, mitocòndria; MP, membrana plasmàtica; P, pericicle; PC, paret cel·lular; PL, plasmodesme; RE, reticle endoplasmàtic; S, suberina; VA, vacúol.

Fig.1-Paret radial suberitzada en la regió de la banda de Caspari. Noti's l'aspecte electrolúcid de la suberina. Observi's que la deposició de suberina en la banda de Caspari és parcial. Fixi's, també, que en el citoplasma proper a la banda de Caspari s'observen 3 microtúbuls (fletxes) i reticle endoplasmàtic. X 64000.

Fig.2-Observi's en la capa de suberina la presència de lamel·les més clares disposades més juntes en contacte amb la paret cel·lular i més laxes en contacte amb el citoplasma. Noti's també la presència de petits acúmul·ls de material electrodens en la suberina. Extracel·lularment s'observa un cos multivesicular. X 46000.

Fig.3-Paret radial en la que s'observen dos plasmodesmes (cap de fletxa). Noti's que en la zona dels plasmodesme el gruix de la capa de suberina és superior i que les lamel·les apareixen bastant distorsionades. X 42000.

Fig.4-Vista general d'una cèl·lula endodèrmica. Noti's la uniformitat de la capa de suberina, excepte en la zona on s'observen plasmodesmes (fletxa) i en la zona de la banda de Caspari. X 6600.



LÀMINA VIII

Figures: 1 a 5

LÀMINA VIII

Figs.1 i 5. Fotografies al MO d'epifluorescència de seccions transversals. Figs 2 a 4 fotografies al MO de camp clar.

E, endodermis; PD, peridermis; X, xilema.

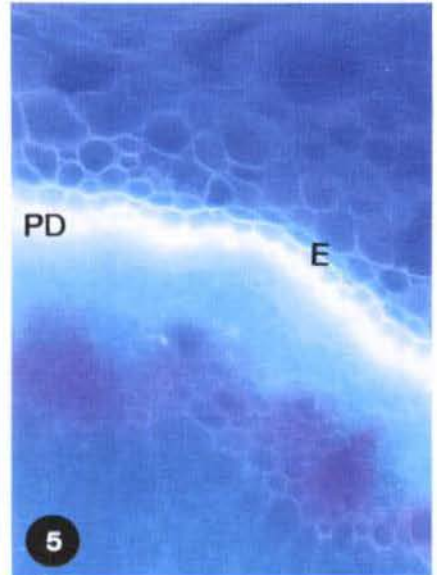
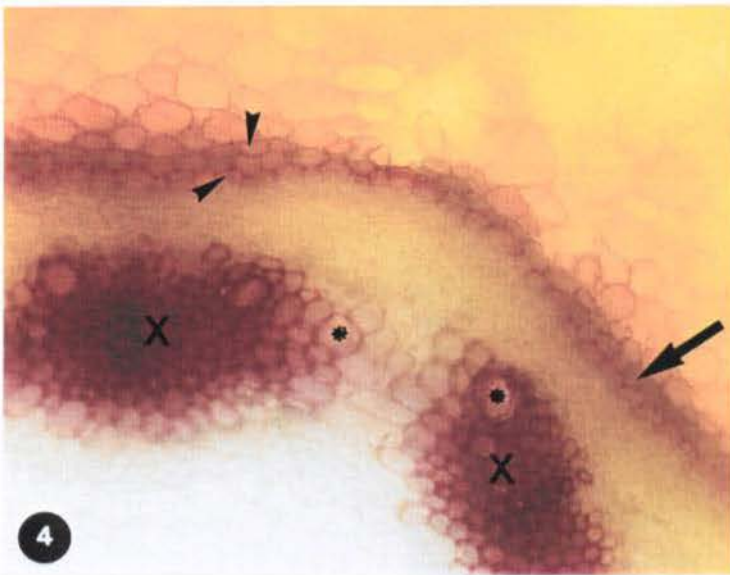
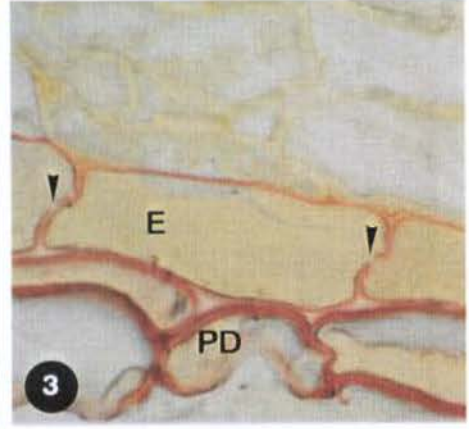
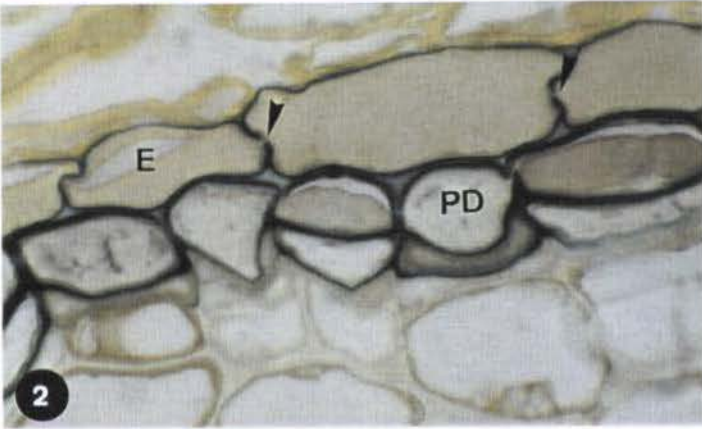
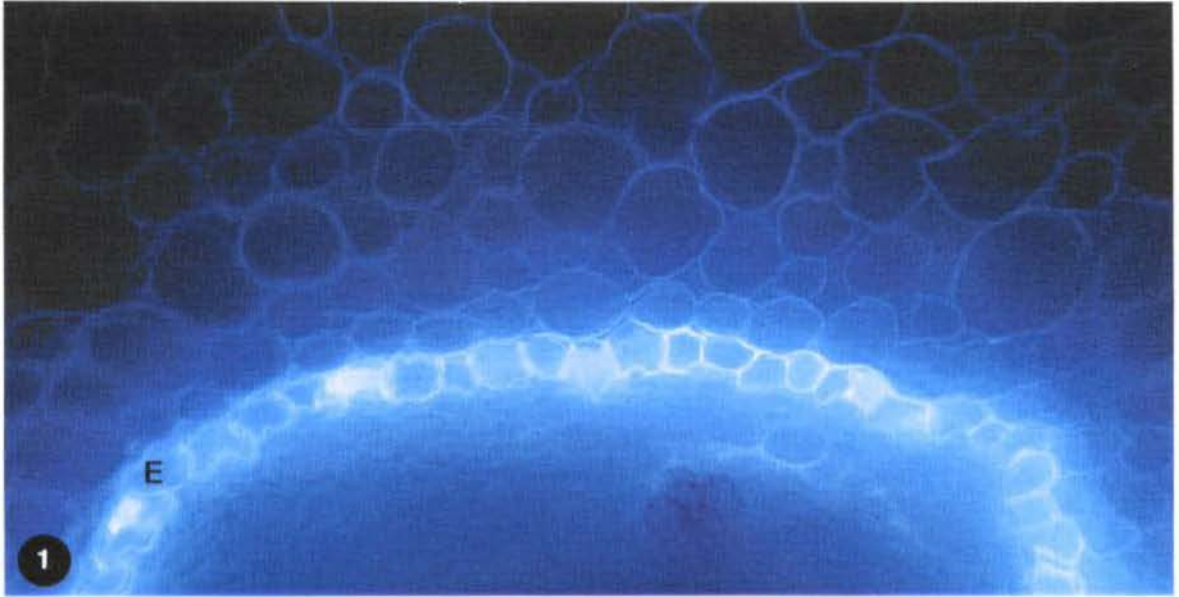
Fig.1-Secció transversal a mà alçada a uns 6cm de l'àpex. Observi's l'autofluorescència de la capa de suberina de les cèl.lules endodermals. Tinció: floroglucinol-HCl (apagar l'autofluorescència de la lignina). X 250.

Fig.2-Secció transversal a uns 8'5cm de l'àpex. Observi's l'endodermis amb les parets suberificades, així com 1 o 2 capes de cèl.lules de la peridermis. Noti's que en l'endodermis la regió de la banda de Caspari no reacciona amb el negre de Sudà (cap de fletxa). X 1200.

Fig.3-Igual que la Fig.2 però la secció ha estat tenyida amb vermell de Sudà 7B. X 1500.

Fig.4-Secció transversal a mà alçada a uns 8'5cm de l'àpex. L'endodermis s'observa parcialment lignificada (fletxa), així com algunes de les cèl.lules de la peridermis i alguna cèl.lula del còrtex adjacent (caps de fletxa). X 120.

Fig.5-Secció transversal a mà alçada en què destaca l'autofluorescència de les parets cel.lulars de les cèl.lules de l'endodermis i de la peridermis. Observi's que la fluorescència de la peridermis és més intensa i brillant que la de l'endodermis. Tinció: floroglucinol-HCl (apagar l'autofluorescència de la lignina). X 170.



LÀMINA IX

Figures: 1 a 5

LÀMINA IX

Fotografies al MET de seccions transversals.

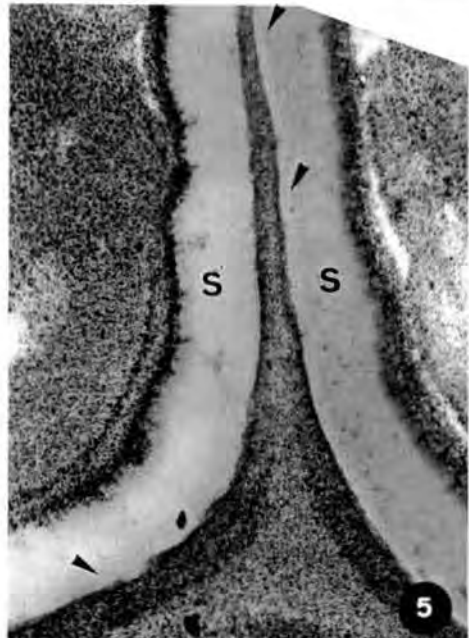
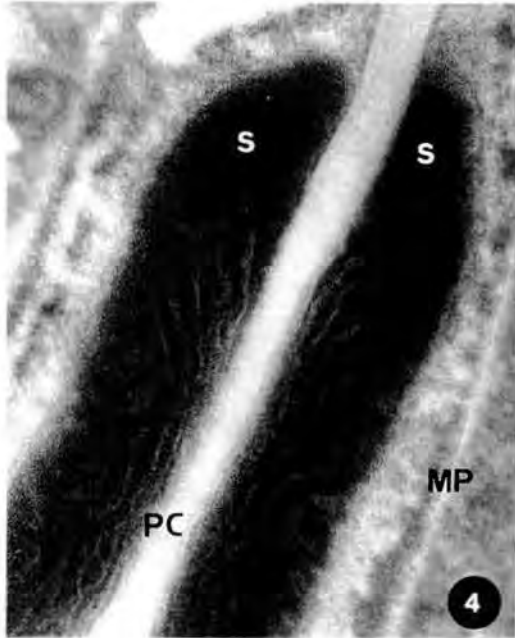
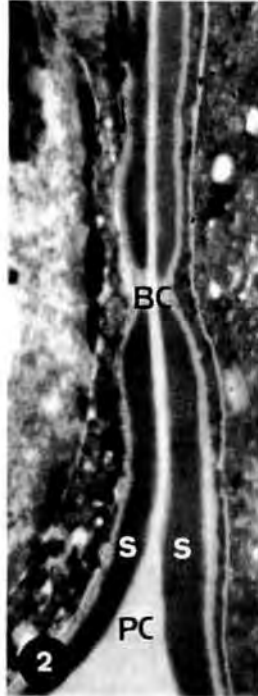
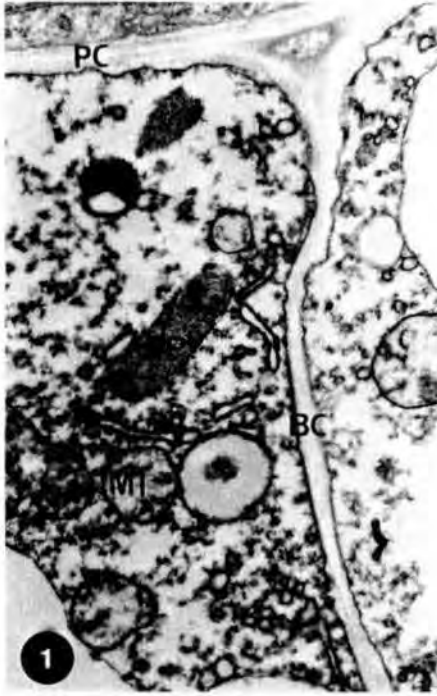
BC, banda de Caspari; MI, mitocòndria; MP, membrana plasmàtica; PC, paret cel·lular; PP, proplastidi; S, suberina.

Fig.1-Mostra tractada amb OTO per lípids. Observi's que la regió de la banda de Caspari a l'igual que la resta de paret cel·lular no reacciona amb l'OTO. X28000.

Fig.2 i 3-Detall de la paret radial de dues cèl·lules endodèrmiques aproximadament a 4'5cm de l'àpex en la regió de la banda de Caspari. La mostra de la Fig.2 ha estat tractada amb OTO, la de la Fig.3 no. Observi's la intensa reacció a l'OTO de la capa de suberina. Noti's que el material de la paret cel·lular en la regió de la banda de Caspari continua sense reaccionar amb OTO. X11400

Fig.4-Detall de la capa de suberina on s'observen algunes lamel·les electrolúcides (caps de fletxa). Fixi's amb la seva distribució. Tinció: OTO. X100000.

Fig.5-Mostra tractada amb Thiery per hidrats de carboni. Observi's que la capa de suberina no reacciona amb el Thiery i que continuen observant-se lamel·les en la capa de suberina (caps de fletxa). X 40000.



DISCUSSIÓ

Orgànuls citoplasmàtics i maduració

Scott i Peterson (1979a) relacionen la formació de la banda de Caspari i la deposició de suberina lamel·lar a les cèl·lules de l'endodermis de *Ranunculus acris* amb la distribució acusadament paramural d'alguns orgànuls. En el cas de *Q. suber* també s'observen alguns dictiosomes, reticle endoplasmàtic, mitocondris i cossos multivesiculars situats en posició paramural. Es tracta d'orgànuls involucrats en les relacions de la membrana plasmàtica amb la paret cel·lular (Roland, 1975), la localització dels quals podria reflectir la seva participació en les successives modificacions de la paret cel·lular. Referent als cossos multivesiculars, cal dir que les funcions són molt especulatives encara que en algun cas s'han relacionat directament amb la secreció de substàncies a la paret (Roland, 1975). Tampoc ha estat possible associar unívocament els dictiosomes amb cisternes OTO positives amb la formació de la banda de Caspari, ja que si bé aquests dictiosomes es troben abundantment en les cèl·lules de la proendodermis no són exclusius d'aquestes, i només s'observen a aquest nivell.

Tanins i maduració

La maduració de l'endodermis sembla clarament relacionada amb la presència de tanins al vacuoma. Igualment que a *Q. suber*, altres espècies presenten tanins al vacuoma de les cèl·lules endodèrmiques durant tot el procés de diferenciació, per exemple en *Gossypium hirsutum* (Mueller i Beckman, 1976); *Picea abies* i *Larix decidua* (Kottke i Oberwinckler, 1990); *Tilia cordata* (MacKENZIE, 1983); *Q. coccifera* (Christodoulakis i Psaras 1988). D'altra banda, a *Ranunculus acris* els tanins són absents a l'estat de proendodermis, però apareixen en els estadis més avançats (Scott i Peterson, 1979b).

Els tanins acumulats en la capa o capes corticals adjacents també semblen jugar un paper important en la maduració de l'endodermis. A

Ranunculus acris (Scott i Peterson, 1979b) així com a *Q. suber*, a més d'una localització generalitzada de tanins a les cèl·lules corticals, es dona una localització preferent en les cèl·lules adjacents a la proendodermis. A *Q. coccifera*, encara que no es produeix una localització tan marcada a l'entorn de l'endodermis, tot el còrtex és molt ric en tanins (Christodoulakis i Psaras, 1988).

La possible funció dels tanins és desconeguda i si bé, en general se'ls atribueix una funció poc específica de tipus protector (Van Fleet, 1961; Mace i Howell, 1974), no es pot descartar una acció més directa. Scott i Peterson (1979b), per exemple, es qüestionen si els tanins de les cèl·lules corticals són excretats als espais intercel·lulars o si són incorporats a la suberina lamel·lar. Un fet interessant d'assenyalar que donaria suport a la hipòtesi d'una acció específica és la intensa relació entre la dispersió i metabolització dels tanins i suberificació (Molinas M.; dades no publicades) que té lloc en les cèl·lules del floema secundari de *Q. suber* durant la regeneració del fel·logen que segueix a l'extracció de la pela.

En relació a les variacions observades en el grau de compartimentització del material osmiofílic vacuolar al microscopi electrònic, cal dir que poden ser degudes, almenys en part, a l'acció dels fixadors. Mueller i Greenwood, (1978) van comprovar que determinades concentracions de cafeïna i glutaraldèhid eviten el vessament dels tanins. En les diferents proves realitzades en el curs d'aquest treball, els millors resultats s'han obtingut afegint al fixador un agent antioxidant com és l'àcid ascòrbic. En la hipòtesi que el vessament dels tanins fós causada per l'alteració del tonoplast, probablement deguda a l'efecte de radicals d'oxigen altament reactius, l'acció protectora de l'àcid ascòrbic podria consistir en impedir la degradació oxidativa de les membranes al complexar-se amb l'O₂ del medi. La disminució de l'efectivitat del tractament en mostres d'arrels en Estat II podria explicar-se pel caràcter hidrofòbic de la suberina dipositada, impeding la difusió de l'antioxidant a l'interior de les cèl·lules.

Banda de Caspari

La banda de Caspari ha estat descrita en pteridòfites com *Azolla* (Paniagua, 1993 reproduït de Gunning i Steer, 1975); gimnospermes com *Picea abies* i *Larix decidua* (Kottke i Oberwinkler, 1990); dicotiledònies com *Convolvulus arvensis* (Bonnett, 1968), *Ranunculus acris* (Scott i Peterson, 1979a); i monocotiledònies

com *Zea mays* (Haas i Carothers, 1975). En tots els casos, així com en *Q. suber*, la banda destaca per l'homogeneïtat i la compactació del material de la paret i per la forta adhesió de la membrana, trets que permeten la seva identificació (Barnabas i Peterson, 1992). En canvi, la densitat als electrons és un tret força variable.

En la banda de Caspari, l'adhesió de la membrana a la paret és molt intensa i es manté, inclús, en les cèl·lules plasmolitzades (Bonnett, 1968; Haas i Carothers, 1975). Inicialment es va relacionar la forta adhesió de la membrana amb la presència de plasmodesmes (Scott, 1963), hipòtesi que no ha pogut ser confirmada ja que, en alguns casos, com *Convolvulus arvensis* (Bonnett, 1968) i *R. anunculus acris* (Scott i Peterson, 1979a), els plasmodesmes són absents i, en altres, com *Q. suber* o *Zea mays* (Haas i Carothers, 1975), són molt poc freqüents. Una segona hipòtesi (Bonnett, 1968) suggeriria una possible interacció hidrofòbica entre el material suberitzat de la banda amb els components lipídics de la membrana o les regions hidrofòbiques de les proteïnes de membrana. Darrerament, Karahara i Shibaoka (1992) treballant amb bandes de Caspari aïllades, han separat set pèptids exclusius de la capa externa de la membrana per electroforesi que podrien estar relacionats amb aquesta funció.

Un altre fet remarcable és la diferent afinitat pel Sudà que mostren respectivament la capa de suberina i la banda de Caspari. Mentre la banda de Caspari, almenys en alguns casos com el *Q. suber* o les arrels del freixa (Brundrett i col., 1991), no manifesta sudanofilia, la capa de suberina reacciona molt positivament. En el cas de *Q. suber* també hem pogut constatar que els resultats de la reacció OTO (Taula 1) concorden amb la diferent sudanofilia. Així, mentre la capa de suberina queda intensament tenyida, la banda de Caspari no presenta pràcticament reacció aparent. Considerant les diferències qualitatives i quantitatives descrites en els components alifàtics de la suberina en funció de l'espècie (Holloway, 1972 i 1983; Kolattukudy i col. 1975; Pereira, 1988) o de l'òrgan o l'edat de la planta (Holloway, 1982), podríem pensar que també en aquest cas es pugui donar una variació dels components alifàtics. Si considerem el mecanisme d'acció de la reacció d'OTO (amplificar la resposta de l'osmi), podríem pensar en una menor o nul·la presència d'hidrocarburs insaturats a la banda de Caspari en relació a la capa de suberina.

Capa de suberina

El dipòsit de suberina propi de l'Estat II de l'endodermis de *Q. suber* es caracteritza per dos trets: deixar lliure la banda de Caspari i presentar un gruix superior al d'altres espècies.

Encara que el patró de deposició no és sempre uniforme, en la major part de les cèl·lules la porció central de la banda de Caspari queda lliure de dipòsits tot i que la membrana plasmàtica, en aquest estadi, es troba separada de la paret. Un model similar ha estat descrit en plàntules de *Hordeum vulgare* (Clarkson i Robards, 1975) i en *Tilia Cordata* (MacKENZIE, 1983), en *Zea mays* també s'ha observat una zona de la banda lliure de dipòsits però, en aquest cas, en lloc de correspondre a la porció central, la zona lliure ocupa una posició més abaxial (Haas i Carothers, 1975). En canvi, en altres espècies com *Ranunculus acris* (Scott i Peterson, 1979a) la capa de suberina és més gruixuda en la regió de la banda que en la resta de paret. Sembla, doncs, que aquest tret varia segons l'espècie.

El gruix de la capa de suberina, -de dues a tres vegades superior al descrit en altres espècies tant dicotiledònies com *Ranunculus acris* (Scott i Peterson, 1979a) o monocotiledònies com *Zea mays* (Hass i Carothers, 1975) i *Hordeum vulgare* (Clarkson i Robards, 1975)-, podria estar relacionada amb les característiques genotípiques de *Q. suber*, planta caracteritzada precisament per l'elevat contingut de suberina del seu teixit suberós. Per altra banda Biggs i col., (1992), en teixits suberificats de presseguer, han observat que fins un 55% de la variabilitat fenotípica en relació a la capacitat de suberificació es pot atribuir a diferències genotípiques. L'intens gruix d'aquesta capa de suberina podria actuar modificant el transport d'aigua i soluts des del còrtex al cilindre central; però, la presència de plasmodesmes, tant a les parets radials com tangencials que no semblen afectats pel dipòsit de suberina, fa pensar que el transport via simplast es pugui conservar. De fet, Warmbrodt (1985) en endodermis de *H. vulgare* i Biggs i Stobbs (1985), en peridermis de presseguer, han observat que la suberina lamel·lar no obtura els plasmodesmes. Per altra banda, Harrison-Murray i Clarkson (1973) han constatat que la suberina no bloqueja el transport del potassi que viatja via simplast i, en canvi, sí bloqueja el transport de calci que es fa via apoplast.

La lamel·lació de la capa de suberina de l'endodermis de *Q. suber* és molt irregular si es compara amb altres descripcions fetes a l'endodermis de *Ranunculus acris* (Scott i Peterson, 1979a) i de *Zea mays* (Hass i Carothers, 1975), a la peridermis de *Solanum tuberosum* (Schmidt i Schönherr, 1982), o a

les cèl·lules epidèrmiques *Gossypium hirsutum* L. (Ryser i col., 1983). La presència de lamel·les ha estat relacionada amb el contingut en ceres. Soliday i col. (1979) i Kolattukudy (1984) consideren que les lamel·les corresponen a la deposició alterna de ceres i suberina. Schmidt i Schönherr (1982), en canvi, pensen que es tracta de l'alternança de suberina polar i suberina no polar, i que les ceres estarien ubicades en les capes no polars.

Al TEM, l'aspecte de la suberina de les mostres tractades de forma convencional (prefixació amb glutaraldèhid-paraformaldèhid i postfixació amb osmi) sembla molt variable. En alguns casos, com *Ranunculus acris* (Scott i Peterson, 1979a) o *Zea mays* (Haas i Carothers, 1975), té aspecte molt electrodens; als pèls de cotó, *Gossypium hirsutum* L., (Ryser i col. 1983) i en la peridermis de patata (Schmidt i Schönherr, 1982) és lleugerament electrodensa; en la peridermis necrofílica de presseguer (Biggs i Stobbs, 1985) presenta una banda electrolúcida i la resta és, també, lleugerament electrodensa. En canvi, la peridermis de *Fagus sylvatica* (Jacob i col., 1989) és totalment electrolúcida. Schmidt i Schönherr (1982) també observen en la peridermis de patata algunes cèl·lules aïllades en què la suberina queda totalment electrolúcida, atribuint-ho a la no penetració local de l'osmi. En canvi, Biggs i Stobbs (1985) relacionen una menor densitat als electrons amb una major presència de ceres. Notem que en l'endodermis de *Q. suber*, la suberina és molt electrolúcida. En aquest cas, podríem pensar o bé que l'osmi no penetra o bé que és tracta d'una suberina molt rica en ceres. En el primer cas ens trobem en contradicció amb els resultats obtinguts amb l'OTO, perquè la tècnica d'OTO, que pausiblement és una amplificació de la resposta amb osmi, tenyeix molt positivament la capa de suberina, per tant, cal pensar que l'osmi sí ha penetrat. Tampoc sembla probable que la TCH (tiacarbahidrazida, molècula intermitja de la tècnica d'OTO) reaccioní directament amb algun radical aldehyd lliure de la molècula de suberina, doncs paral·lelament hem constatat que la suberina no reacciona amb la tècnica de Thièry (Thièry, 1967) per detectar grups aldehyds. D'altra banda, si fòs degut a la presència de ceres, aquestes haurien d'estar homogèniament distribuïdes en tota la capa per correspondre's amb els resultats, ja que tota la capa és electrolúcida. En canvi, principalment en les mostres tractades amb OTO, es continua observant una lleugera lamel·lació que aparentment es correspon amb la diposició de les ceres. Seria interessant, però, tractar les mostres amb cloroform per extreure els lípids solubles i observar si es manté la lamel·lació i l'aspecte electrolúcid de la capa de suberina.

CAPÍTOL IV:
SISTEMA RADICULAR MADUR

INTRODUCCIÓ

L'estudi del sistema radicular és important per comprendre el desenvolupament, la capacitat de regeneració i la dinàmica de les plantes en l'ecosistema, però els treballs sobre arrels són escassos per les dificultats metodològiques que comporten.

El sistema radicular adult ha estat estudiat en diverses espècies de *Quercus*. Phillips (1912) va relacionar el sistema radicular del *Q. emoryi* amb certs factors ambientals, i Muller (1951) va analitzar el paper de les arrels en la regeneració de diverses quercínees del matorral californià. Lyford (1980) va descriure l'anatomia del sistema radicular de *Q. rubra*, estudiant la seva distribució, desenvolupament i relació entre els diferents grups d'arrels. Tiedeman i col. (1987) van descriure els components del sistema radicular de *Q. gambelii*. I Canadell i Rodà (1989), van aportar una anàlisi biomètrica dels components hipogeus de *Q. ilex*. De totes maneres, hem d'assenyalar que els autors citats, exceptuant el treball de Lyford (1980), no tenen en compte la població d'arrels fines; per això, és important citar el treball de Yin i col. (1989) sobre la dinàmica i distribució de la biomassa de les arrels fines en un ecosistema amb predomini de *Q. rubra* i *Q. alba*.

Les aportacions que s'han fet a nivell histològic són també molt escasses, i, fins el moment, en la bibliografia consultada sobre la família de les quercínees no es fa referència a cap estudi histològic detallat de les arrels d'un sistema radicular madur.

En aquest treball ens proposem iniciar l'estudi descriptiu del sistema radicular de l'alzina surera madura a partir d'un exemplar que considerem representatiu per les característiques físiques que presenta i per les condicions ambientals en què es localitza. Els objectius concrets que ens plentegem són: d'una banda, descriure els components que formen l'aparell radicular de l'alzina surera adulta seleccionada; i de l'altra, determinar la distribució d'aquests components en el sistema radicular.

La caracterització morfològica a nivell macro i microscòpic dels diversos elements que formen el sistema radicular ens aportarà dades sobre el desenvolupament de l'arrel i els canvis que es produeixen en el pas d'arrel

primària a arrel secundària o llenyosa. És essencial establir l'organització i la distribució dels diferents elements dins el sistema radicular per comprendre el desenvolupament de la planta i la seva interacció amb el medi ambient.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL BIOLÒGIC

Procedència i característiques de l'exemplar escollit

L'arbre seleccionat procedeix d'una de les parcel·les experimentals del Laboratori del Suro de l'UdG situada a Sant Hilari Sacalm (Montseny-Guilleries, província de Girona, Catalunya, NE Espanya). La parcel·la és de 400m², de base quadrada, amb un pendent del 42%, orientada SW i es troba a 830m d'altitud. El sòl és profund, de textura franca sorrenca, de caràcter àcid i situat sobre granodiorites fàcilment alterables. Es tracta d'una parcel·la madura sotmesa als tractaments silvícoles regulars de neteja i pela, i que no ha sofert incendis, tals ni altres tipus de perturbacions. Els estrats arbustiu i herbaci es troben bastant esclarissats. A l'estrat arbustiu destaquen *Cistus salvifolius* (estepa borrera), *Sarothamnus scoparius* (ginestell) *Rosmarinus officinalis* (romaní), *Rubus gr. glandulosus* (esbarzer), *Osyris alba* (ginestó) entre altres; a l'estrat herbaci s'hi poden veure *Hieracium gr. sobendum*, *Asplenium onopteris*, *Festuca cf gautieri*, *Cephalanthera rubra* i *Lavandula stoechas* (tomaní); i a l'estrat arbori, a part d'alzines sureres, hi ha dues alzines (*Quercus ilex*) i un pi pinyoner (*Pinus pinea*). Les alzines sureres provenen de llavor i tenen una edat d'entre 70 a 100 anys. El diàmetre a l'alçada del pit (DBH) dels suros és d'entre 19 i 60cm i la densitat de 600peus/Ha.

L'alzina surera escollida té, aproximadament, 90 anys d'edat i procedeix de gla. L'alçada total de l'arbre és d'uns 13m, el seu diàmetre (DBH) de 40cm i es caracteritza per tenir un sol tronc principal recta i bifurcat a uns 2'3m.

Obtenció del sistema radicular

El sistema radicular de l'alzina surera s'ha obtingut per excavació. Primer s'ha netejat una zona d'aproximadament 5m de radi d'arbusts i matolls a l'entorn del suro i, llavors, s'ha iniciat l'excavació per mètode manual, ajudant-nos amb aixades i rasclons de jardí. S'ha utilitzat aquest mètode per no malmetre cap

dels components del sistema hipogeu i perquè les condicions del terreny -sorrenc, sense roques, amb pendent- i la seva situació a peu del camí, afavoreixen les tasques.

MÈTODES

DESCRIPCIÓ DEL SISTEMA RADICULAR

La descripció del sistema radicular s'ha realitzat "in situ", un cop la major part del sistema ha estat desenterrat, i s'ha finalitzat, posteriorment, en el laboratori ajudats de les fotografies preses durant i al final de l'excavació.

ESTUDI DELS COMPONENTS DEL SISTEMA RADICULAR

Obtenció de les mostres

Un cop desenterrat el sistema radicular s'han netejat les arrels, mesurat els diàmetres i les longituds, i s'han fotografiat. Totes les fraccions s'han pesat en el camp i de les diferents fraccions, amb una motoserra, s'han obtingut seccions a diferents distàncies de la base. Finalment, les seccions s'han transportat al laboratori on s'han assecat durant 3 mesos a l'estufa, a 80°C. Una vegada seques s'han pulit una de les seves cares i s'han tractat amb vernís sintètic saturat per facilitar l'estudi morfològic i la seva conservació.

Processat de les seccions de diàmetre superior a 10mm per ser estudiades.

L'estudi de les seccions de diàmetre superior als 10mm s'ha realitzat per observació directa i, en algun cas, amb l'ajuda d'una lupa binocular (Wild stereoscan).

Processat de les seccions de diàmetre inferior a 10mm per ser estudiades.

Microscòpia òptica (MO).

S'han emprat diferents tècniques de preparació del material per a l'observació de les mostres en microscòpia òptica segons la seva duresa. Pels àpexs radicular i les mostres toves de diàmetre menor de 5mm, s'ha emprat la tècnica

d'inclusió en glicol metacrilat (Veure capI-pg13); i per les mostres més dures, arrels llenyoses de 5 a 10mm, s'ha emprat la tècnica de congelació.

Mètode de la congelació

La manipulació d'arrels de diàmetre entre 5 i 10mm i, per tant, llenyoses, obliga que abans de la congelació es fagin bullir com a mínim 1/2 hora, per tal d'estovar els teixits.

Per a l'obtenció dels talls per criotomia s'han utilitzat dues tècniques de congelació de les mostres: per immersió en nitrogen líquid i per congelació directa en el micròtom de congelació. La utilització de nitrogen líquid permet refredar la mostra molt ràpidament a temperatures molt baixes, per la qual cosa s'afavoreix l'obtenció de talls més prims amb l'estructura més ben conservada. En la tècnica de la congelació directa ni la rapidesa ni el grau de congelació són tan efectius, però és més apropiada per a l'aplicació rutinària, amb resultats suficientment bons.

Per a la congelació en nitrogen líquid, les mostres, sense fixar, es col·loquen en un suport de suro i s'envolten de medi d'inclusió per criotomia de la casa Reichert-Jung, es submergeixen durant 30 segons en un líquid de transferència, l'isobutil-pentà, prèviament refredat en nitrogen líquid i, després, es transfereixen a nitrogen líquid.

En la tècnica de congelació directa es processen seccions transversals de l'exemplar d'uns 5 mm. Cadascuna d'aquestes seccions es col·loquen sobre un portamostres, s'envolten de medi d'inclusió per criotomia Reichert-Jung i es deixen en l'àrea del criòtom destinada a la congelació de les mostres.

Microtòmia: Les mostres, un cop congelades, es tallen en un criòtom Criocut-1800 Reichert-Jung, a una temperatura de -30° C. Les seccions, d'uns 10 µm, es recullen en portes gelatinats o prèviament banyats amb col·loidió, i es deixen assecar a l'aire durant 15 minuts.

Coloració i muntatge: S'han aplicat les mateixes coloracions per les seccions obtingudes per la tècnica del glicol metacrilat i per congelació.

Generals i Metacromàtiques:

Tionina. Veure capítol I, pg.14

Histoquímiques:

PA-Schiff. Veure capítol I, pg.14

Test per la lignina. Veure capítol II, pg.59

Vermell de Sudà 7B. Veure capítol II, pg.59

Les preparacions s'han muntat amb un medi hidròfil.

Observació i fotografia: Les observacions s'han fet en un fotomicroscopi Vanox (Olimpus) equipat amb epifluorescència. Per a la fotografia, s'ha utilitzat: un filtre LBD i pel·lícula Ektacrome 100 ASA per a les diapositives en color; i un filtre verd IF 550 i pel·lícula Kodak T MAX 100 ASA per a la fotografia en blanc i negre.

Processat de les mostres per ser observades en microscopi electrònic d'scàning (SEM).

Per obtenir les superfícies per a observar el màxim de netes i pulides s'han utilitzat alguns dels talls obtinguts per congelació. Aquests talls s'han deixat assecar a l'aire i, posteriorment, s'han recobert. L'observació s'ha realitzat amb un microscopi electrònic d'escàning (SEM) Cambridge S-120 del servei de microscopia electrònica de la Universitat de Bardelona.

Estudi dels components cel·lulars

Maceració àcida

S'obtenen estries d'1 a 2µm d'allargada tallades longitudinalment d'una secció transversal d'arrel d'aproximadament 1cm de diàmetre. Aquestes estries s'introdueixen en un tub d'assaig en solució de Jeffrey (parts iguals d'àcid nítric al 10% i àcid cròmic al 10%) (Johansen, 1940) durant 48 hores. Per comprovar que els talls estan suficientment macerats s'aixafen suaument amb una vareta de vidre de punta arrodonida.

Un cop el teixit està macerat es renta amb H₂O corrent. Per fer el rentat s'utilitza una centrifugadora (Sigma-201M), fent 5 passos de 5 minuts amb H₂O corrent. Llavors, per contrastar el macerat, es tenyeix, preferentment amb PA-Schiff.

Procediment: 1-àcid periòdic, (20 minuts). 2-rentat amb H₂O_d, (5 minuts en centrifugadora). 3-PA-Schiff, (15 minuts), 4-2 rentats amb H₂O_c en centrifugadora

Després de la tinció s'agafa, amb unes pinces, una punta de macerat, s'extén sobre un portamostres net, es munta directament amb un medi hidròfil i s'observa al microscopi òptic.

Terminologia utilitzada

La terminologia que s'ha utilitzat en aquest treball és la seguida per Kozlowski (1971) i per Lyford (1980). Amb el nom d'arrels llenyoses comprenem totes les arrels, -gruixudes i fines, incloses les de diàmetre inferior a 10mm-, que tenen creixement secundari del lleny el qual els hi dóna rigidesa. En general, el seu diàmetre supera els 2mm i, encara que amb dificultat, es poden distingir els anells de creixement. El grup anomenat arrels fines i flexibles, o simplement arrels fines, comprèn el conjunt d'arrels de petit diàmetre on el desenvolupament del xilema no és suficient per donar-li rigidesa; aquest grup és conegut també amb el nom d'arreletes o arrels fibroses.

RESULTATS

SISTEMA RADICULAR

El sistema radicular s'ha dividit en dues parts: sistema radicular central (**SRC**) i sistema radicular perifèric (**SRP**) (Làm.I-1, 2). El SRC assoleix una zona aproximada de 1,5 m de radi al voltant de l'eix fins a uns 60 cm de profunditat i, comprèn la corona radicular, arrels llenyoses de primer, segon, tercer ordre i d'ordres menors i arrels fines. El **SRP**, extern al central, assoleix una superfície de 6 m de radi i està format per les prolongacions de les arrels gruixudes i un gran nombre d'arrels fines flexibles. En el **SRC**, les arrels formen una estructura compacta en la qual són freqüents fenòmens d'anatosmosi. El **SRP** és més laxa, les arrels estan més distanciades i no s'observen fenòmens d'anatosmosi.

El sistema radicular s'inicia en la base del tronc (d'uns 45cm de diàmetre) amb la corona radicular (Làm.II-1). Aquesta queda dividida en 7 grans arrels llenyoses de primer ordre que formen la carcassa principal del sistema hipogeu. Cap d'aquests eixos s'ha pogut identificar com l'arrel principal. Aquests grans eixos llenyosos penetren en el sòl per seguir dues direccions preferents, uns es disposen radialment seguint un curs superficial perpendicular a l'eix de la planta (arrels gruixudes horitzontals), mentre que els altres prenen una direcció descendent més o menys obliqua respecte de l'eix (arrels gruixudes descendents) (Làm.I-1; Là.m.III-1).

Arrels gruixudes descendents

Les arrels gruixudes descendents són excèntriques, de secció elíptica (al principi), en els seus primers 60 o 80cm i d'aspecte compacte (Làm.III-1, 2). La seva superfície externa és llisa, de color gris platejat i amb nombroses lenticel·les. Aquestes arrels penetren en el sòl fins a una profunditat de 40 a 60cm i després canvien de direcció per orientar-se horitzontalment on es divideixen en arrels de segon i tercer ordre, de secció més circular (Làm.III-1). Entre les arrels de segon i tercer ordre -de 4 a 8 cm de diàmetre- orientades

horizontalment, s'observen nombroses anastomosis que donen lloc a la formació d'una estructura tridimensional semblant a una gran graella que apressiona una enorme quantitat de sòl i ancla fortament l'arbre (Làm.IV-1). Les anastomosis s'han format pel creixement conjunt dels teixits de dues, tres i, fins i tot, quatre arrels (Làm.IV-2).

Les arrels de tercer ordre i ordres inferiors, cada vegada de secció més circular i menor diàmetre fins a reduir-se aproximadament a 0'5mm, s'introdueixen verticalment en el sòl i perden la seva rigidesa, trencant-se fàcilment durant l'extracció.

Arrels gruixudes horitzontals

Les arrels gruixudes horitzontals presenten, també, el lleny d'aspecte compacte i superfície llisa, de color marró gris fosc amb lenticel·les. Aquestes arrels es localitzen a una profunditat no superior als 20cm, si bé, amb freqüència, tenen trossos exposats a l'exterior on es forma una capa de súber de gruix considerable (Làm.V-2). A diferència de les arrels gruixudes descendents, es caracteritzen per la seva menor excentricitat i per mantenir el diàmetre quasi constant durant la major part del recorregut. En el SRC són circulars i no es bifurquen. En el SRP també mantenen el seu diàmetre molt constant al principi, durant uns 4 a 5 metres, per llavors reduir-lo gradualment. Quan el diàmetre ha disminuït més de la meitat de l'inicial, aproximadament a uns 6m de la base de l'arbre, s'observen bifurcacions formant eixos secundaris, terciaris i quaternaris de secció elíptica que canvien paulatinament de direcció, passant d'horitzontals a verticals. Les ramificacions finals acaben en arrels llenyoses fines de secció circular.

Arrels fines flexibles

Una abundant població d'arrels fines flexibles, d'aspecte fibrós, es disposen damunt de la superfície de les arrels gruixudes de primer i segon ordre, i són visibles tant en la regió que pertany al SRC com la del SRP on són especialment abundants. El seu diàmetre és inferior a 5 mm. Aquest grup d'arrels per la seva extremada fragilitat no ha pogut ser extret en la realització d'aquest treball.

Histologia de les arrels llenyoses fines

S'ha estudiat l'anatomia microscòpica de les arrels llenyoses de diàmetre inferior a 10mm. En aquest grup d'arrels llenyoses fines, el xilema secundari està ben desenvolupat i presenta un grau de rigidesa que facilita la seva extracció i permet distingir-les de les arrels fines flexibles.

Es caracteritzen pel color marró fosc de la superfície i per l'aspecte porós del lleny (Làm.VI-1, 2), si bé, en referència a aquest darrer punt, hem de notar que l'observació dels talls histològics no va demostrar diferències amb la porció llenyosa equivalent de les arrels llenyoses gruixudes. La peridermis és prima i el fel.lema es descama fàcilment indicant poca cohesió cel.lular. La fel.lodermis, molt poc conspícua, està formada de 2 a 4 capes de cèl.lules parenquimàtiques en continuïtat amb el líber. En el líber són abundants els nòduls llenyosos compostos per esclereides i fibres. Aquests nòduls són molt densos en la zona externa del floema on prenen un aspecte de banda contínua per sota de la peridermis. En la zona interna del floema, els nòduls són menors i estan més dispersos. En el lleny, els elements traqueals es disposen aïlladament. L'alternança de vasos i fibres de diferents diàmetres determina la presència d'anells no molt ben definits. Els radis parenquimàtics són de dos tipus: uniseriats i multiseriats (Làm.VI-1, 2). Els primers, formats per una sola línia de cèl.lules, només són visibles en el microscopi. Els radis multiseriats de gruix entre 0,4 a 1 mm a nivell del càmbium es troben distribuïts més o menys regularment amb una distància interràdial, mesurada també a nivell del càmbium, d'uns 0,5 a 1,5mm. Aquests radis estan formats per unes 20 línies cel.lulars homogènies i finalitzen en el líber en conspicus nòduls llenyosos.

Els elements vasculars consisteixen, principalment, en elements traqueals que es divideixen segons el seu diàmetre en: amples, d'uns 150-250µm de diàmetre i de 100 a 200µm de longitud; i estrets, de 50 a 80µm de diàmetre i en general més llargs, de 350 a 450µm. Ambdós tenen placa perforada simple, engruiximent de la paret secundària de tipus escalariforme i prolongacions en forma d'apèndix en els seus extrems (Làm.VII-4, 5). També s'observen, esporàdicament, traqueides. L'esclerènquima està format per esclereides i també fibres; el diàmetre de les fibres oscil.la entre 10 i 20µm (Làm.VII-1, 3). La majoria de les fibres mesuren entre 600 i 800µm de longitud, però també és freqüent trobar algunes més curtes, de 300 a 500µm, i algunes més llargues, de

800 a 1000 μ m (Là.m.VII-1). A més s'ha observat algunes fibres de llum més ampla i amb més puntuacions, que podrien considerades en la categoria de fibrotraqueïdes (Là.m.VII-6). Un reduït nombre de fibres, de diàmetre una mica superior (19-27 μ m) presenten la paret secundària més engruixida rica en poliuronats.

Les cèl·lules parenquimàtiques tant del parènquima axial com radial, són de forma paral·lelepipèdica i presenten freqüentment grans de midó i tanins (Là.m.VII-2). Les cèl·lules del parènquima radial són més grans i el seu contingut en midó és superior en comparació a les del parènquima axial.

Arrels blanques

Durant el procés d'excavació s'han observat diversos àpexs radiculars notables pel seu diàmetre, comprès entre 1 i 5 mm, la seva elevada turgència i, especialment, el seu intens color blanc. Aquests àpexs vius -descrits com "arrels blanques", d'aspecte carnós i trencadís- es disposen en els extrems d'algunes arrels llenyoses menors. Tenen pèls absorvents i no mostren signes d'infecció per micorrisses. D'aquests àpexs s'ha realitzat un examen histològic. En la figura de la làmina VI-3 observem una secció d'aproximadament 1,8 mm de diàmetre obtinguda per uns 22 mm del àpex. L'estructura primària dels teixits mostra l'epidermis, unicel·lular amb nombrosos pèls absorvents; el còrtex, constituït per cèl·lules de parènquima amb espais intercel·lulars, i el cilindre vascular. El còrtex queda limitat, externament, per l'exodermis i, internament, per l'endodermis. El cilindre central medeix uns 600 μ m de diàmetre. Presenta un pericicle format de dues a tres capes de cèl·lules de parets fines enfront del xilema i una capa enfront del floema. En el seu interior es diferencien fins a vuit pols de xilema i vuit de floema, situats alternament. En els pols xilemàtics es poden distingir el protoxilema -localitzat més externament i amb dos vasos de menor diàmetre- del metaxilema de vasos més grans. La diferenciació del metaxilema no arriba al centre de l'arrel, deixant en el seu interior un espai medullar ocupat per cèl·lules parenquimàtiques. En els pols floemàtics, la distinció entre protofloema es fa difícil ja que amb el creixement el protofloema tendeix a col·lapsar-se.

LÀMINA I

Figures: 1 a 2

LÀMINA I

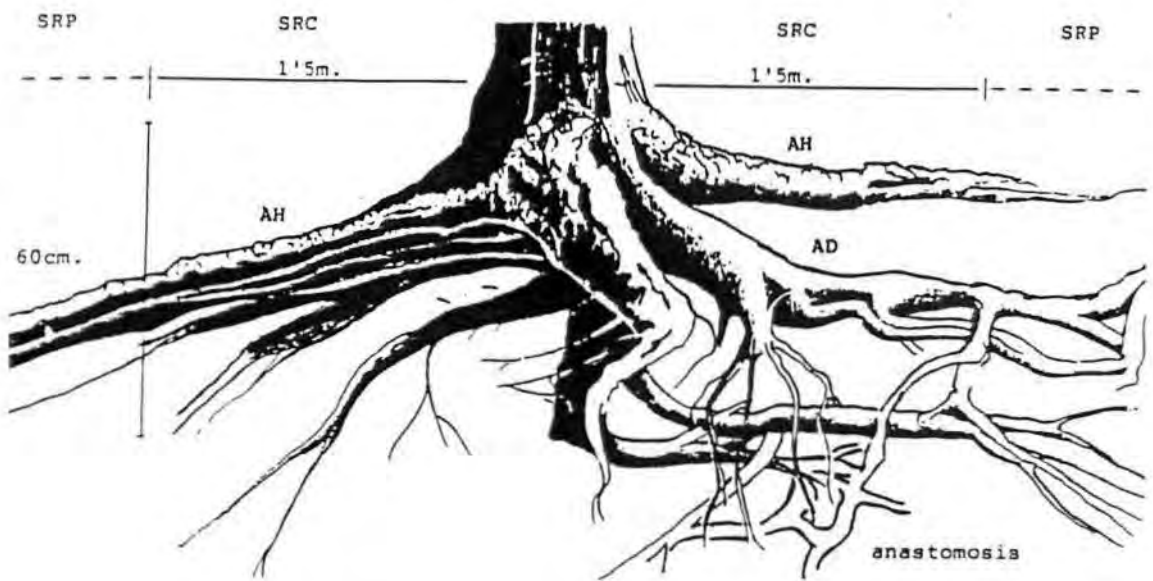
Sistema radicular de l'alzina surera estudiada, fotografia i esquema.

SRC, sistema radicular central; SRP, sistema radicular perifèric; AH, arrels horitzontals; AD, arrels descendents.

Fig.1-Sistema radicular semidesenterrat. Fixi's en la disposició dels grans eixos llenyosos respecte de l'eix principal de l'arbre.

Aproximadament X1/20

Fig.2- Esquema del sistema radicular de l'alzina surera estudiada on es mostra la distribució de les arrels en el sistema radicular central i sistema radicular perifèric.



LÀMINA II

Figures: 1

LÀMINA II

Fig.1-Secció transversal de la corona radicular. Observi's la forma pseudoestel.lada indicant la posició dels grans eixos. Fixi's també amb la capa de suro de reproducció que envolta el liber; aquesta s'ha format a l'estar desenterrada i haver-se pelat succesivament l'arbre. X1/10 L, liber; Su, súber.



1

LÀMINA III

Figures: 1 a 2

LÀMINA III

Ll, lleny; Fl, floema; Pe, peridermis.

Fig.1-Arrel gruixuda descendent. Observi's la textura de la superfície i l'accentuada elepticitat que presenta en els seus primers centímetres de trajectòria (fletxes). X1/18

Fig.2-Secció transversal de l'arrel anterior on destaca l'excentricitat. El lleny està envoltat per una fina capa composta per la peridermis i els teixits del floema. X1/4



LÀMINA IV

Figures: 1 a 2

LÀMINA IV

Nn, nucli d'arrel; Le, lenticel.les.

Fig.1-Arrels anostomosades situades en el sistema radicular central. La fusió dels eixos creuats origina una estructura similar a una gran graella. Noti's la presència d'anastomosis formades per més de dues arrels. X1/5

Fig.2-Secció transversal d'una anastomosis, conseqüència de la fusió de quatre altres arrels. Fixi's amb els nuclis que s'observen en la secció. Porció on destaca la superfície i lenticel.les d'una part d'arrels anostomosades. X1/2



2

LÀMINA V

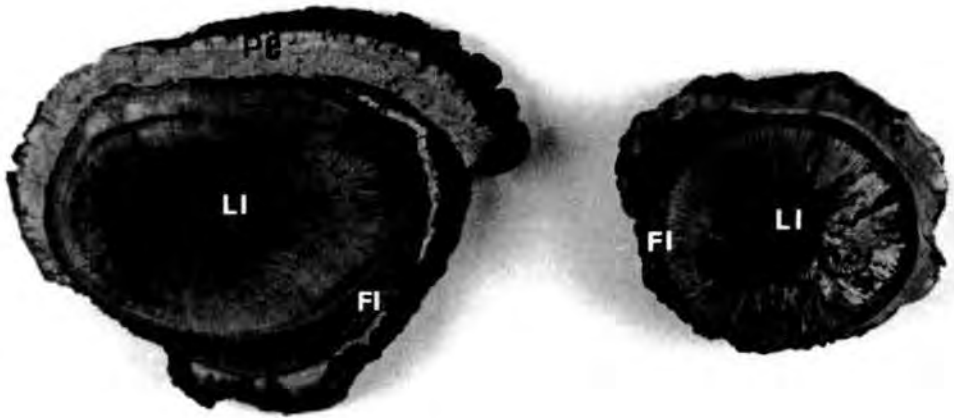
Figures: 1 a 2

LÀMINA V

AH, arrel horitzontal ; Ll, lleny; Fl, floema; Pe, peridermis; Su, súber.

Fig.1- Porció basal d'una arrel gruixuda horitzontal de primer ordre, mostrant la superfície llisa amb abundants lenticel·les. X1/5

Fig.2- Secció transversal d'una arrel horitzontal. Observi's la forma quasi circular de la secció i la menor excentricitat. Noti's les zones on la capa de súber és gruixuda per haver estat al descobert. X1/2



2

LÀMINA VI

Figures: 1 a 3

LÀMINA VI

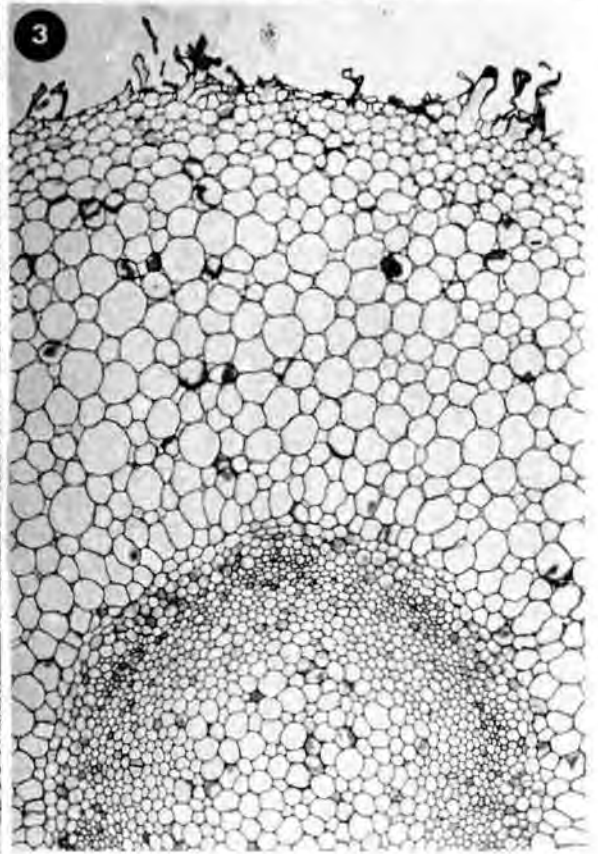
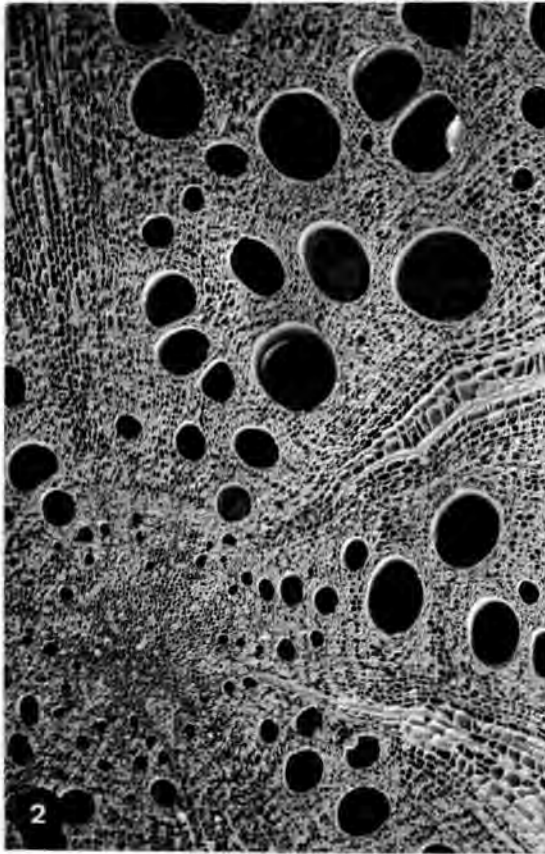
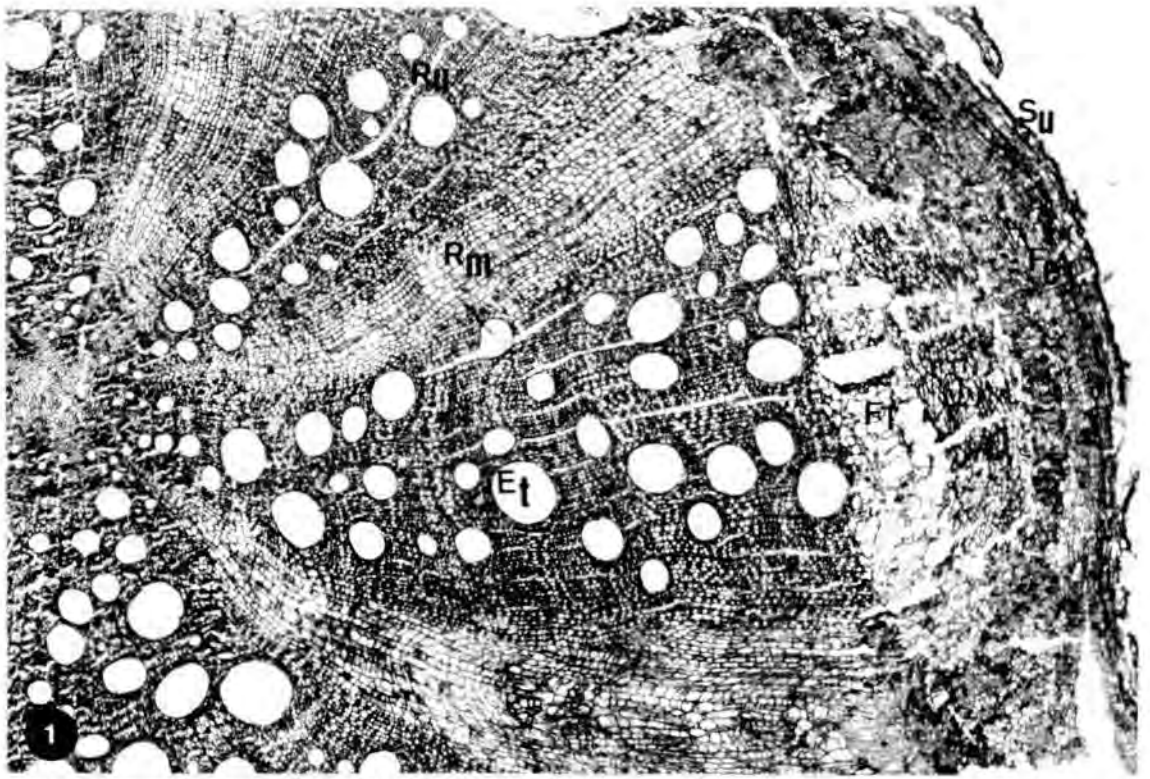
Arrel llenyosa de 8mm de diàmetre mostrant l'aspecte poròs del lleny

C, còrtex; E, endodermis; EP, epidermis; Et, element traqueal; F, floema; ME, medul.la; Rm, radis multiseriats; Ru, radis uniseriats; X, xilema.

Fig.1-Imatge al microscopi òptic. Observi's els radis uniseriats, la homogeneïtat cel.lular dels radis multiseriats i la disposició de fibres i vasos. X27.

Fig.2-Imatge al microscopi electrònic d'escànnig. En el lleny s'observen quatre radis parenquimàtics multiseriats i abundants vasos amples disposats aïlladament. X12.

Fig.3-Secció d'una arrel primària al MO on s'observa l'epidermis, el parènquima cortical o còrtex, l'endodermis i el cilindre central. Fixi's amb els pols de floema alternats amb elements del xilema en maduració. En l'interior del cilindre es localitza el parènquima medul.lar. X 104.



LÀMINA VII

Figures: 1 a 6

LÀMINA VII

Cp, cèl.lules parènquima; Et, elements traqueals; Fi, fibres; Ft, fibrotraqueides.

Fig.1-Vista general de cèl.lules aïllades obtingudes per maceració d'una mostra de lleny.

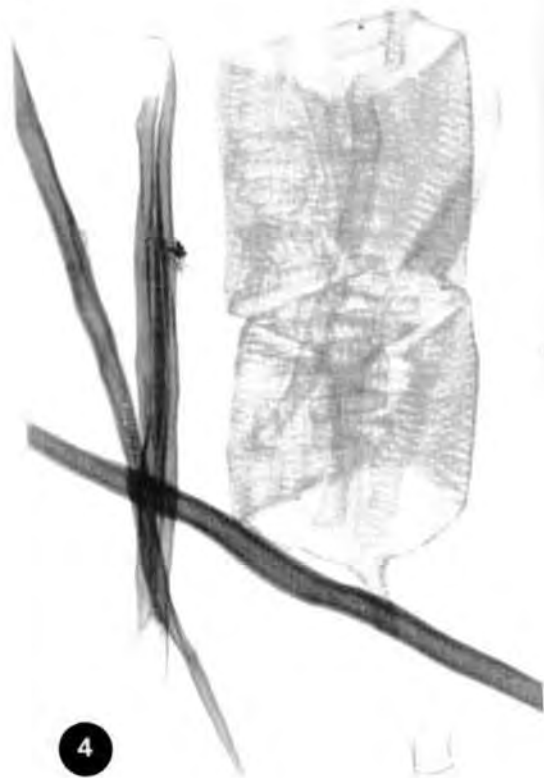
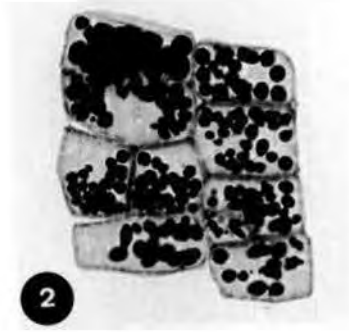
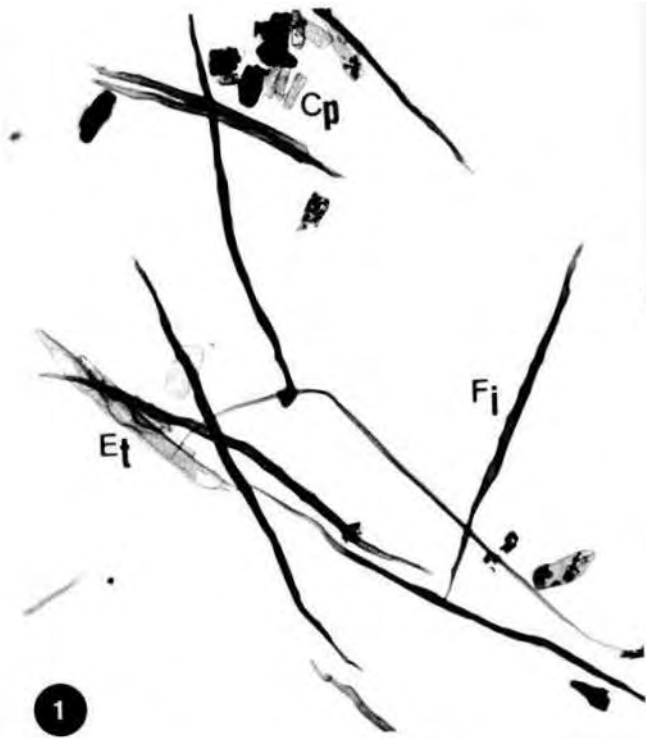
Fig.2-Detall de cèl.lules parenquimàtiques amb grànuls de midó. Tinció: PA-Schiff. X 139

Fig.3-Detall d'una esclereida. Fixi's amb el gruix de les parets cel.lulars. Tinció: PA-Schiff. X 139.

Fig.4-Elements traqueals d'un vas ample mostrant l'engruiximent de la paret cel.lular de tipus escalariforme i la presència de placa perforada simple amb apèndixs terminals . A l'esquerra s'observen vàries fibres de xilema. X239.

Fig.5-Element traqueal d'un vas estret també amb engruiximents de la paret cel.lular de tipus escalariforme i la presència de placa perforada simple amb apèndixs terminal. Tinció: PA-Schiff. X386

Fig.6-Detall d'una fibrotraqueida. Observi's les puntejades de la paret cel.lular. Tinció: PA-Schiff. X139.



DISCUSSIÓ

El elements que formen el sistema radicular de l'alzina surera que hem estudiat -un exemplar de llavor amb un sol tronc- respon al tipus d'organització anatòmica propi de les arrels, sense que existeixin diferències d'organització entre les que segueixen un curs horitzontal o descendent. No obstant, en altres quercínees amb reproducció clonal, a més d'arrels, s'han distingit altres estructures especialitzades en la reproducció vegetativa. Aquest és el cas del *Q.gambelii* californià estudiat per Tiedemann i col. (1987), on es descriuen en el sistema hipogeu tres components morfològiques: lignotúber, rizomes i arrels. Cal esmentar que en l'alzina surera és important la formació de rebrots a partir de la corona o d'altres porcions del sistema radicular (Natividade, 1950). A més, en recents estudis (vegi's capítol II), hem comprovat que en les plàntules la capacitat de rebrotar es troba molt desenvolupada degut a la presència, en la regió del coll de l'arrel, d'una zona diferenciada on s'acumulen grups de gemmes latents i on la presència de midó és abundant. Aquesta regió, derivada del nus cotiledonar, pot ser considerada com un vertader lignotúber (Molinas i Verdaguer, 1993). L'absència, en l'alzina surera adulta estudiada, d'algun equivalent al lignotúber, suggereix que aquesta pot tenir un caràcter transitori i desaparèixer paral·lelament a la maduració de la planta. Aquest fet, comú en altres plantes que desenvolupen lignotúber (Chattaway, 1958), corroboraria la teoria que amb l'edat disminueix la capacitat regenerativa de l'alzina surera.

D'altra banda, l'estructura del sistema radicular de l'alzina surera descrita en aquest treball, -caracteritzada per la codominància de varis eixos horitzontals i descendents, sense que es pugui identificar l'arrel pivotant pròpia dels estadis juvenils (capítol II.a)-, coincideix amb la descrita per Lyford (1980) per *Q. rubra*. L'existència d'arrels horitzontals i descendents sembla estar relacionat amb les diferents funcions que duen a terme. Segons Natividade (1950), les arrels superficials contribueixen a la regeneració vegetativa

mitjançant la formació de rebrots, inclús en zones allunyades de la base de l'arbre. Una altra funció atribuïda a les arrels horitzontals és mantenir el sistema radicular airejat quan el sòl es troba sobresaturat (Phillips, 1912). Les arrels descendents tenen una clara funció mecànica, mantenint l'arbre fortament anclat, funció que comparteixen amb les arrels anastomosades del sistema radicular central. S'ha comprovat que en zones amb forts vents la presència d'anastomosis és superior (Graham i Bormann 1966). Un altre aspecte important de les anastomosis, que ja va ser destacat per Marshall (1942, cit. Graham i Bormann, 1966), és la possible protecció enfront de l'estrangulament de les arrels en contacte quan estan sotmeses a una pressió superior a l'habitual. Seria interessant comparar el desenvolupament de les arrels horitzontals i descendents en diferents tipus de sòl i estudiar la seva participació relativa en la reproducció clonal. Un altre punt important que caldria estudiar és la transformació d'un model amb arrel pivotant, propi dels estadis juvenils de la planta, al model adult descrit.

Les dades aportades per l'estudi de les arrels blanques mostren una organització tissular equivalent a la descrita per l'arrel primària en el capítol II.a; que coincideix amb la descripció realitzada per Mogensen (1967) per plàntules de *Q. alba*.

CONCLUSIONS

Ontogènesi de l'arrel i de la corona radicular.

- 1- L'òrgan implicat en la rebrotació a partir del sistema hipogeu en l'estat juvenil de *Q. suber*, inicia el seu desenvolupament en la fase de maduració de l'embrió amb la formació, en l'eix embrionari, de 5 a 7 parelles de gemmes laterals a partir de grups de cèl.lules del meristema perifèric.
- 2- La presència d'aquest òrgan en la planta no depèn de les condicions ambientals, és un caràcter ontogenèticament programat.
- 3- La germinació de les llavors de *Q. suber* és de tipus hipogeu, però a diferència d'altres espècies, el punt d'inserció dels cotilèdons divideix l'eix embrionari en dues porcions: una porció apical, visible entre els pecíols cotiledonars, i una porció inferior allargada en la qual el teixit cotiledonar està fusionat amb l'eix.
- 4- L'aspecte extern de les gemmes del lignotúber de la porció no fusionada no difereix de les restants gemmes del brot, presenten una curta tigeta i esquames laminars, en canvi, les gemmes de la porció fusionada amagades pel teixit cotiledonar, desenvolupen esquames hipertrofiades i es multipliquen formant plaques de gemmes.
- 5- Amb el desenvolupament de la plàntula, la zona de transició tija-arrel esdevé llenyosa, i s'hi observen gemmes i una quantitat elevada de substàncies de reserva, que permet definir-la com un vertitable lignotúber.

Àpex radicular i Histogènesi del sistema vascular

- 6- El desenvolupament de l'arrel primària comporta el pas del meristema de tipus tancat, observat en l'etapa embrionària, al meristema de tipus obert.

7- L'organització tissular del meristema radicular en l'arrel primària permet definir quatre poblacions de cèl·lules inicials: les del cilindre central; les del còrtex, que també ho són de la regió perifèrica de la columnel·la; les de la columnel·la, i les cèl·lules inicials de la regió lateral de la caliptra.

8- La tècnica consistent en la incorporació d'un anàleg de la timidina durant la fase S de les cèl·lules i la posterior detecció amb anticossos monoclonals, permet identificar el centre quiescent del meristema apical de les arrels en creixement. El centre quiescent comprèn les cèl·lules inicials del cilindre central i algunes de les cèl·lules derivades.

9- Els primers elements vasculars que maduren són els elements cribrosos ($\pm 600\mu\text{m}$), seguits dels elements del xilema ($\pm 1500\mu\text{m}$); els feixos de floema i xilema es diferencien alternament.

Diferenciació i maduració de l'endodermis

10- La presència de tanins en el vacúol de les cèl·lules endodèrmiques i de la capa adjacent del còrtex és un tret característic del procés de diferenciació de l'endodermis en l'alzina surera.

11- Les cèl·lules endodèrmiques presenten banda de Caspari a uns 2'5-3'5cm del meristema apical. La banda de Caspari no difereix, a nivell ultraestructural, de la descrita en altres espècies (Bonnet, 1968; Scott i Peterson, 1979a; Haas i Carothers, 1975).

12- Les cèl·lules endodèrmiques es suberitzen a uns 4'5-5cm de l'àpex, la capa de suberina presenta un gruix de $\pm 0'3\mu\text{m}$ de gruix. La zona central de la banda de Caspari roman, en general, lliure de suberina. La capa de suberina no sembla influir negativament en el transport via simplast al no tapar els porus dels plasmodesmes.

13- La suberina dipositada en la banda de Caspari es comporta químicament diferent de la dipositada en les parets cel·lulars al no presentar sudanofília i ser OTO negativa; possiblement aquesta diferència radiqui en una menor presència d'hidrocarburs insaturats en la banda de Caspari.

Formació de les arrels laterals

14- Les cèl·lules del pericicle i de l'endodermis participen en la formació del primordi de l'arrel lateral, si bé, les 2-3 capes més externes de cèl·lules derivades de l'endodermis es desprenen, progressivament, quan la nova arrel emergeix, quedant constituïda únicament per cèl·lules derivades del pericicle.

15- L'arrel lateral es connecta vascularment al feix de xilema enfront el que s'origina i als dos feixos de floema laterals mitjançant la diferenciació de cèl·lules connectores.

16- La formació de les arrels laterals comporta la pèrdua de continuïtat de l'endodermis durant la fase de primordi, si bé, es restableix posteriorment. Quan l'arrel lateral ja ha emergit, les cèl·lules connectores de l'endodermis de l'arrel primària i de l'arrel lateral es suberitzen formant un continu.

Sistema radicular madur

17- El sistema radicular madur de *Q. suber* no presenta arrel pivotant. Els components hipogeus estan distribuïts entre el sistema radicular central (SRC), que s'estén en profunditat ($\pm 60\text{cm}$), i el sistema radicular perifèric (SRP), que s'estén en superfície ($\pm 1'5\text{m}$).

18- En el sistema radicular es distingeixen dos tipus d'arrels: les arrels gruixudes descendents -són excèntriques, elíptiques al principi però es bifurquen ràpidament formant eixos de segon, tercer i quart ordre i estan disposades densament amb freqüents anastomosis- i, les arrels gruixudes horitzontals que corren perpendiculars a l'eix de l'arbre, -són de secció més circular i mantenen el diàmetre quasi constant fins que es bifurquen, allunyades de la base.

19- Ni en la corona radicular ni en la base de les arrels s'observa l'existència de gemmes laterals que es puguin relacionar amb la presència del lignotúber en aquesta etapa.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, W.P., 1975. Ion transport through roots. En *Development and fuction of roots*. Eds. J.G. Torrey i D.T. Clarkson. Academic Press: London, New York i San Francisco. Pp.437-463.
- Armstrong, J.E. i Heimsch C. 1976. Ontogenetic reorganization of the root meristem in the compositae. *American Journal of botany*, 63 (2): 212-219.
- Bamber, R. K., i J. K. Mulette., 1978. Studies on the lignotuber of *Eucalyptus gummifera* (Gaertn. & Hochr.). II. Anatomy. *Australian Journal of Botany* 26: 15-22.
- Barlow, P.W., 1976. Towards an understanding of the behaviour of root meristems. *J.Theor. Biol.*, 57: 433-451
- Barnabas, A.D. i Peterson, C.A., 1992. Development of Casparian bands and suberin lamellae in the endodermis of onion roots. *Canadian Journal of Botany*, 70: 2233-2237.
- Beissalah Y., Amin T., ElHajzein B. i Neville P., 1988. Formation des racines de régénération chez *Quercus ilex* L. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 4/5: 333-342.
- Biggs A.R. i Sotbbs L.W., 1985. Fine structure of the suberized cell walls in the boundary zone and necrophylactic periderm in wounded peach bark. *Canadian Journal of Botany*, 64: 1606-1610.
- Biggs A.R., 1985. Detection of impervious tissue in tree bark with selective histochemistry and fluorescence microscopy. *Stain Technology* 60 (5): 299-304.
- Biggs A.R., Miles N.W. i Bell R.L., 1992. Heritability of suberin accumulation in wounded peach bark. *Phytopathology*, 82(1): 83-86.
- Bonet S. i Hugut G., 1985. Tècniques habituals de coloració per a seccions semifines de material inclòs en glicol metacrilat (GMA). *Scientia Gerundensis*, 10: 23-32.
- Bonet S. i Molinas M., 1983. Utilitat del glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a histologia. *Annals de la Secció de Ciències*. Col.legi Universitari de Girona (Girona, Spain) 9: 21-29.
- Bonner J. i Galston A.W., 1973. Principios de fisiología vegetal. Ed. Aguilar.
- Bonnett H.T. JR., 1968. The root endodermis: fine structure and function. *Journal of Cell Biology*, 37: 199-205.

- Bonnett H.T. Jr., 1969. Cortical cell death during lateral root formation. *The journal of cell biology*, 40: 144-159.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 71: 248-254.
- Brundrett M.C., Enstone D.E. i Peterson, C.A., 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma*, 146: 133-142.
- Brundrett M.C., Kendrick B. i Peterson C.A., 1991. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, pp111-116.
- Byrne J.M. i Heimsch C., 1970a. The root apex of *Malva sylvestris*. I Structural development. *American Journal of Botany*, 57 (10): 1170-1178.
- Byrne J.M. i Heimsch C., 1970b. The root apex of *Malva sylvestris*. II The quiescent center. *American Journal of Botany*, 57 (10): 1179-1184.
- Byrne J.M., 1973. The root apex of *Malva sylvestris*. III. Lateral root development and the quiescent center. *Amer. J. Bot.* 60(7): 657-662.
- Byrne J.M., Byrne J.M. i Emmitt D.P., 1982. Development and structure of the vascular connection between the primary and lateral root of *Lycopersicon esculentum*. *Amer. J. Bot.*, 69 (2): 287-297.
- Canadell. J. i Rodà, 1989. Root biomass in a montane mediterranean forest. *Canadian Journal of Botany* (en prensa).
- Caritat A., Molinas M. i Oliva M., 1989. Crecimiento longitudinal del alcornoque: segmentos y hojas. *Scientia Gerundensis* (Girona, Spain) 14: 23-30.
- Carr D. J., Carr S. G. M. i Jahnke R., 1982. The eucalypt lignotuber: a position dependent organ. *Annals of Botany* 50: 481-489.
- Carr D.J., Jahnke R. i Carr S. G. M., 1984. Initiation, development and anatomy of lignotubers in some species of Eucalyptus. *Australian Journal of Botany* 32: 415-437.
- Carrodous B. B. i Blake T. J., 1970. Studies on the lignotubers of *Eucalyptus obliqua* L'Heri. I. The nature of the lignotuber. *The New Phytologist* 69: 1069-1072.
- Carter D. J. i Panton D.M., 1985. The role on the cotyledonary node in the induction of lignotuber formation in eucalyptus. *Australian forest reserch*, 15: 509-513.

- Clarkson D.T. i Robards A.W., 1975. The endodermis, its structural development and physiological role. En *Development and function of roots*. Eds. J.G. Torrey i D.T. Clarkson. Academic Press: London, New York i San Francisco. Pp.415-436.
- Clarkson D.T., Robards A.W., Sanderson J. i Peterson C.A., 1978. Permeability studies on epidermal-hypodermal sleeves isolated from roots of *Allium cepa* (onion). *Canadian Journal of Botany*, 56: 1526-1532.
- Clowes F.A.L. 1961. Apical meristems. Botanical monographs. Blackwell Scientific Publications Oxford LTD.
- Clowes F.A.L. 1970. The immediate response of the quiescent center to x rays. *New Phytol.* 69: 1-18.
- Clowes F.A.L. 1978. Chimeras and the origin of lateral root primordia in *Zea mays*. *Ann. Bot.* 42: 801-807.
- Clowes F.A.L. 1981. The difference between open and closed meristems. *Annals of Botany*, 48: 761-767.
- Clowes F.A.L. 1982. Change in cell population kinetics in an open meristem during root growth. *New phytologie*, 91: 741-748.
- Clowes F.A.L. i Stewart., 1967 Recovery from dormancy in roots. *New Phytol.*, 66: 115-123.
- Charlton W.A. 1991. Lateral root initiation. En *The plant roots the hidden half*, (Waisel Y. i Eshel A. eds). Marcel Dekker, Inc., pp103-128.
- Chattaway M. V., 1958. Bud development and lignotuber formation in eucalyptus. *Australian Journal of Botany* 6: 103-115.
- Christodoulakis N.S. i Psaras G.K., 1988. A contribution to the root study of the evergreen sclerophylls anatomy of the primary root of *Quercus coccifera* L. *Flora*, 180: 445-453
- Dumbroff E.B. i Peirson D.R., 1970. Probable sites for passive movement of ions across the endodermis. *Can. J. of Bot.*, 49: 35-38.
- El Alaqui H., 1978. Étude expérimentale de la morphogenèse du système racinaire du semis de Chêne-liège (*Quercus suber* L.). Thèse 3ème cycle., Univ. Nancy I, 51pp.
- Esau K., 1985. Anatomía Vegetal. Ed. Omega. 3a ed. revisada. Cap.17: 521-525. Barcelona.
- Feldman J. L. i Torrey J.G., 1975. The quiescent center and primary vascular tissue pattern formation in cultured roots of *Zea*. *Canadian Journal of Botany*, 53: 2796-2803.

- Feldman L.J., 1975. Cytokinins and quiescent center activity in roots of *Zea*. En *Development and fuction of roots*. Eds. J.G. Torrey i D.T. Clarkson. Academic Press: London, New York i San Francisco. pp.1: 55-72.
- Feldman L.J., 1984. The development and dynamics of the root apical meristem. *American Journal of Botany*, 71 (9): 1308-1314.
- Fitter A.H., 1991. Characteristics and functions of root systems. In the Plant roots, the hidden half. Eds. Waisel, Eshel, Kafkafi. Marcel Dekker Inc. pp.3-25.
- Graham B i Bormann F.H, 1966. Natural root grafts. *The Botanical Review*.
- Groff P. A. i Kaplan D. R., 1988. The relation of root systems to shoot systems in vascular plants. *Botanical Review*. 54: 387-422.
- Haas D.L. i Carothers Z.B., 1975. Some ultrastructural observations on endodermal cell development in *Zea mays* roots. *American Journal of Botany*, 62(4): 336-348.
- Hall J.L. i Hawes C., 1991. Electron microscopy of plant cells. Academic press LTD.
- Harmer R., 1990. Relation of shoot growth phases in seddling oak to development of the tap root, lateral roots and fine root tips. *New Phytologie*, 115: 23-27.
- Harrison-Murray, R. S. i Clarkson D.T., 1973. Relationships between structural development and the absorption of ions by de root system of *Cucurbita pepo*. *Planta* (Berl.) 114: 1-16.
- Hayat M.A. i Heimsch C., 1963. Some aspects of vascular differentiation in roots of cassia. *American Journal of Botany*, 50 (10): 965-971.
- Hayat M.A., 1989. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. The Macmillan press LTD.
- Hayden W.J., 1988. Ontogeny of the cotyledonary region of *Chamaescye maculata* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 75: 1701-1713.
- Heimsch D. 1951. Development of vascular tissues in barley roots. *American Journal of Botany*, 38: 523-570.
- Holch A.E., 1931. Development of roots and shoots of certain deciduous tree seedlings in different forest sites. *Ecology*. XII (2): 259-298.
- Holloway P.J., 1972. The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* roth. *Chem. Phys. Lipids*, 9: 158-170.
- Holloway P.J., 1982. Suberins of *Malus pumila* stem and root corks. *Phytochemistry*, 21(10): 2517-2522.

- Holloway P.J., 1983. Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochemistry*, 22(2): 495-502.
- Horsley S., 1971. Root tip injury and development of the paper birch root system. *Forest Sci.* 17: 341-348.
- Jacob A., Lehmann H. i Stelzer R., 1989. Entwicklung und Struktur von Lentizellen der Buche (*Fagus sylvatica* f. *purpurea* AIT.)
- James S., 1984. Lignotubers and burls. Their structure, function and ecological significance in Mediterranean ecosystems. *Botanical Review* 50: 225-266.
- Johansen D., 1940. Plant Microtechnique. MacGraw-Hill publications in the botanical sciences. New York.
- Karahara I. i Shibaoka H., 1992. Isolation of Casparian strips from pea roots. *Plant cell physiology*, 33(5): 555-561.
- Kolattukudy P.E., 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany* ., 62: 2918-2933.
- Kolattukudy P.E., Kronman K. i Poulouse A.J., 1975. Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant physiology*, 55: 567-573.
- Kozłowski T.T., 1971. Growth and development of trees. *Academis press, INC.* LTD. London.
- Luxová M., 1989. The vascular system in the roots of barley and its hydraulic aspects. Kluwer Academic Publishers, 15-20.
- Luxová M., 1990. Effect of lateral root formation on the vascular pattern of barley roots. *Bot. Acta*, 103: 305-310.
- Luxová M., 1991. Mechanisms of reduction of the stelar pattern along barley roots. *Botanica acta*, 85 (2): 163-168.
- Lyford W.H., 1980. Development of the root system of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Harvard forest paper*. N°21: 3-29.
- Lyndon R.F., 1990. Plant development. The cellular basis. Series editors: M.Black & J. Chapman.
- Lloret P.G., Casero, P.J. i Pulgarín A., 1993. Planos de división en el pericicle multiseriado de raíces de cebolla tratadas con auxina. *Actas del V congreso nacional de la sociedad española de biología celular*. 225-226. Badajoz 14-17 diciembre 1993.
- Mace M.E. i Howell C.R., 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany*., 52: 2423-2426

- Mallory T.E., Chiang Su-Hwa, Cutter E.G. i Gifford E.M.jr., 1970. Sequence and pattern of lateral root formation in five selected species. *Amer. J. Bot.*, 57 (7): 800-809.
- McCully M.E., 1975. The development of lateral roots. In *The Development and Function of Roots*, eds. J.G.Torrey and D.T. Clarkson, 618pp. Academic Press, London and New York.
- McKENZIE K.A.D., 1983. Some aspects of the development of the endodermis and cortex in *Tilia cordata* and *Picea sitchensis*. *Plant and soil* 71: 147-153.
- Mogensen H.Ll., 1965. A contribution to the anatomical development of the acorn in *Quercus* L. *IOWA State Journal of Sciences* 40: 221-255.
- Mogensen H.Ll., 1967. A contribution to the developmental anatomy of the root of *Quercus* L. *IOWA State Journal of Science*. 41 (4): 413-423.
- Mogensen H.Ll., 1969. A contribution to the histogenesis of the seedling stem in *Quercus* L. *IOWA State Journal of Sciences* 43: 321-324.
- Molinas M. i D. Verdaguer., 1993. Lignotuber ontogeny in the cork-oak. II. Germination and young seedling. *American Journal of Botany* , 80(2):182-191.
- Molinas M. i D. Verdaguer., 1993. Lignotuber ontogeny in the cork-oak: I. Late embryo maturation. *American Journal of Botany*.. 80(2): 172-181.
- Montenegro G., Avila G. i ScahtteP., 1983. Presence and development of lignotubers in shrubs of the Chilean matorral. *Canadian Journal Botany* 61: 1804-1808.
- Mueller W.C. i Beckman C.H., 1976. Ultrastructure and development of phenolic-storing cells in cotton roots. *Canadian Journal of Botany* ., 54: 2074-2082.
- Mueller W.C. i Greenwood A.D., 1978. The ultrastructure of phenolic-storing cells fixed with caffeine. *Journal of Experimental Botany*, 29 (110): 757-764.
- Muller C.H., 1951. The significance of vegetative reproduction in *Quercus*. *Madroño* 11:129-137.
- Natividade J.V., 1950. Subericultura. Direcção General dos Productos Florestais, Lisboa. 1992. Subericultura. Edición española. Ministerior de agricultura, pesca y alimentación. Secretaria General Técnica.
- Paniagua R., 1993. Citología e histología vegetal animal. Interamericana-McGRAW-Hill. Reproduit de Gunning i Steer., 1975. Ultrastructure and biology of plant cells. Edward Arnold, Londres.
- Pereira H., 1988. Structure and chemical composition of cork from *Calotropis procera* (AIT.) R.BR. *IAWA Bulletin*, 9(1): 53-58.

- Perumalla C.J., Peterson C.A. i Enstone D.E., 1990. A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of Linnean Society.*, 193: 93-112.
- Perumalla C.J., Peterson C.A., 1986. Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Canadian Journal of Botany* ., 64:1873-1878.
- Peterson C.A., Emanuel, M.E. i Wilson C., 1982. Identification of a Casparian band in the hypodermis of onion and corn roots. *Canadian Journal of Botany* . 60: 1529-1535.
- Peterson i Peterson., 1986. Ontogeny anatomy of lateral roots. New root formation in plants and cuttings (M.B. Jackson, Ed.) Martinus Nijhoff, Hingham, Mass.
- Phillips F. J., 1912. Emory oak in southern Arizona. USDA Forest Service Science Circular. 201. Washington,DC.
- Phillips F.J. i Torrey J.G., 1971. The quiescent center in cultured roots of *Convolvulus arvensis* L. *American Journal of Botany*, 58 (7): 665-671.
- Popham R., 1954. Levels of tissue differentiation in primary roots of *Pisum sativum*. *American Journal of Botany*, 42: 529-539.
- Pulgarín A., Navascués J., Casero P.J. i Lloret P.G., 1988. Branching pattern in onion adventitious roots. *Amer. J. Bot.* 75(3): 425-432.
- Raju M.V.S., Steeves T.A. i Maze J., 1976. Developmental studies on *Euphorbia esula* L. morphology of the root system. *Canadian Journal of Botany*, 41: 579-589.
- Riedacker A. i Belgrand M., 1983. Morphogénèse des systèmes racinaires des semis et boutures de chene pédonculé. *Plant and soil*, 71:131-146.
- Roland J.C., 1975. The relationship between the plasmalemma and plant cell wall. *Int. Rev. Cytol*, 36: 45-83.
- Rost T.L., Jones T.J. i Falk R.H., 1988. Distribution and relationship of cxell division and maturation events in *Pisum sativum* (Fabaceae) seedling roots. *American Journal of Botany* 75 (10): 1571-1583.
- Ryser U., Meier H. i Holloway P.J., 1983. Identification and localization of suberin in the cell walls of green cotton fibres (*Gossypium hirsutum* L., var. green lint). *Protoplasma*, 117: 196-205.
- Sanderson J., 1983. Water uptake by different regions of the barley root. Pathways of radial flow in relation to development of the endodermis. *Journal of Experimental Botany*, 34(140): 240-253.

- Scott F.M., 1963. Root hair zone of soil-grown roots. *Nature* 199: 1009.
- Scott M.G. i Peterson R. L., 1979a. The root endodermis in *Ranunculus acris*. I. Structure and ontogeny. *Canadian Journal of Botany* ., 57: 1040-1062.
- Scott M.G. i Peterson R. L., 1979b. The root endodermis in *Ranunculus acris*. II. Histochemistry of the endodermis and the synthesis of phenolic compounds in roots. *Canadian Journal of Botany* ., 57: 1063-1077.
- Schmidt H.W. i Schönherr J., 1982. Fine structure of isolated and non-isolated potato tuber periderm. *Planta*, 154: 76-80.
- Seago J.L. i Heimsch C., 1969. Apical organization in roots of the convolvulaceae. *American Journal of Botany*, 56(2):131-138.
- Seago J.L., 1971. Developmental anatomy in roots of *Ipomoea purpurea*. I radicle and primary root. *American Journal of Botany*, 58 (7): 604-615.
- Seago J.L., 1973. Developmental anatomy in roots of ipomoea purpurea. II. Initiation and development of secondary roots. *Amer. J. Bot.* 60(7): 607-618.
- Seligman A.M., Wasserkrug H.D. i Hanker J.S., 1966. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid containing membranes and droplets in osmium tetroxide fixed tissue, with osmophilic thiocarbonylhydrazide (TCH). *Journal of Cell Biology*, 30: 424-432.
- Shah J. D. i Patel J. D., 1972. The shell zone: its differentiation and probable function in some dicotyledons. *American Journal of Botany* 59: 683-690.
- Soliday Cl i Kolattukudy P.E. i Davis P., 1979. Chemical and structural evidence that waxes associated with the suberin polymer constitute the major diffusion barrier to water vapor. *Planta*, 146:607-614
- Stairs G. R., 1964. Microsporogenesis and embryogenesis in *Quercus*. *Botanical Gazette* 125: 115-121.
- Stone E. L. i Cornwell S., 1968. Basal bud burls in *Betula populifolia*. *Forest Science* 14: 64-65.
- Sutton D. D. i Mogensen H. L., 1970. Systematic implications of leaf primordia in the mature embryo of *Quercus*. *Phytomorphology* 20: 88-91.
- Sutton D.D. i Tinus R. W., 1983. Root and root system terminology. *Forest Science Monography* 24, Supplement N 4.
- Thièry LP., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6:987-1018.
- Tiedeman A. R., Clary W. P. i Barbour R. J., 1987. Underground systems of gamble oak (*Quercus gambelii*) in central Utah. *American Journal Botany* 74: 1065-1071.

- Torrey J.G., 1955. On the determination of vascular patterns during tissue differentiation in excised pea roots. *American Journal of Botany*, 42: 183-197.
- Van Fleet D.S., 1961. Histochemistry and function of the endodermis. *The botanical review*, 27 (2): 165-220.
- Verdaguer D. i Molinas M., 1992. Anatomía y caracterización del sistema radicular del alcornoque. *Scientia gerundensis* (Girona, Spain) 18 :39-51.
- Vilar L., Domínguez A. i Polo L., 1992. Cartografia de la zona suberícola de les Gavarres. *Scientia Gerundensis*, 18: 177-185.
- Warmbrodt R.D., 1985. Studies on the root of *Hordeum vulgare* L. Ultrastructure of the seminal root with special reference to the phloem. *American Journal of Botany*, 72 (3): 414-432.
- Weatherley P.E., 1975. Water relations of the root system. En *Development and fuction of roots*. Eds. J.G. Torrey i D.T. Clarkson. Academic Press: London, New York i San Francisco. Pp.397-413.
- Wilcox H., 1954. Primary organization of active and dormant roots of noble fir, *Abies procera*. *American Journal of Botany*, 41: 812-820.
- Wilcox H., 1962. Growth studies of the root of incense cedar, *Libocedrus decurrens*. I. The origin and development of primary tissues. *American Journal of Botany*, 49(3): 221-236.
- Yin X., Perry J. i Dixon R., 1989. Fine-root dynamics and biomass distribution in a *Quercus* ecosystem following harvesting. *Forest Ecology and management*, 27:159-177. Amsterdam.