



FACULTAT
**DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA**
UVIC | UVIC·UCC



Institut
de Recerca i Tecnologia
Agroalimentàries

Treball de Fi de Grau Experimental

Anàlisi de la influència de diferents condicions físiques i químiques en la germinació i la inducció de calls en el garrofer (*Ceratonia siliqua*).

ALEXANDRE VICENS SANS

Grau en Biotecnologia

Tutor: Ramon Dolçet-Sanjuan

Co-Tutora: Montserrat Capellas Herms

Vic, Juny del 2021

Agraïments

Agrair a en Ramon per tots els consells, l'orientació i l'ajuda proporcionada durant tot el procés d'elaboració d'aquest treball.

A la Maria per tota l'ajuda, planificació, supervisió i el suport durant la realització de tota la part experimental del TFG.

A la Sandra, Eva i altres companys, que es trobaven en el centre, per l'ajuda i l'acollia.

Al centre IRTA de Lleida per permetre'm realitzar el TFG en les seves instal·lacions.

Resum

Títol: Anàlisi de la influència de diferents condicions físiques i químiques en la germinació i la inducció de calls en el garrofer (*Ceratonía siliqua*).

Autor: Alexandre Vicens Sans

Tutors: Ramon Dolçet Sanjuan (IRTA) i Montserrat Capellas Herms (UVic-UCC)

Data: Juny de 2021

Paraules clau: Callogènesi, *C. Siliqua*, explants, germinació, hores fred, fitohormones, llavors, llum i foscó.

Ceratonía siliqua és un arbre lleguminós, que presenta un gran interès en les indústries alimentària i farmacèutica per les seves diverses propietats, entre les quals hi trobem efectes antioxidants, antibacterians, antiinflamatoris o citotòxics. Aquest estudi, per tant, té l'objectiu d'aplicar i analitzar diferents condicions físiques i químiques, per tal de determinar quines són les més òptimes per al creixement d'aquest arbre i formació de calls, per al seu ús en futures investigacions.

En la primera part del treball, s'han aplicat diferents condicions en el procés de germinació de les llavors. Aquestes han estat: remull de les llavors (24 i 48 hores), inducció de fitohormones BAP i GA₃, acumulació d'hores en fred (7°C) i esscarificació mecànica de la coberta de les llavors.

En la segona part, s'han aplicat altres condicions en la inducció de calls dels explants obtinguts de les plantes germinades: condicions lumíniques (llum o foscó) i la inducció de diferents concentracions de K i 2,4-D.

Tant les llavors com els explants s'han deixat incubar a 24°C.

Un cop analitzats els resultats, es conclou que l'escarificació mecànica de les llavors i seu el remull durant 48 hores són les condicions millors condicions per a una òptima germinació de les llavors; mentre que en la inducció de calls, la incidència de llum i les concentracions de 1µM de K i 2,4-D afavoreixen a una eficient proliferació de calls. Sent els cotiledons i les arrels els tipus d'explants més adequats per a la callogènesi.

Summary

Title: *Analysis of the influence of different physical and chemical conditions on germination and induction of calluses in the carob tree (Ceratonia siliqua).*

Author: Alexandre Vicens Sans

Supervisors: Ramon Dolçet Sanjuan (IRTA) & Montserrat Capellas Herms (UVic-UCC)

Date: June 2021

Key words: Callogenesis, *C. siliqua*, explants, germination, cold hours, phytohormones, seeds, light and darkness.

Ceratonia siliqua is a leguminous tree, which is of great interest in the food and pharmaceutical industries due to its various properties, including: antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory or cytotoxic effects. This study therefore aims to apply and analyse different physical and chemical conditions, in order to determine which are the most optimal for the growth of this tree and the formation of calli, for its use in future research.

In the first part of the work, different conditions have been applied in the seed germination process. These have been: seed soaking (24 and 48 hours), induction of phytohormones BAP and GA3, accumulation of chill hours (7°C) and mechanical scarification of the seed coat. In the second part, other conditions have been applied in the induction of calli from germinated plants: luminous conditions (light or dark) and the induction of different concentrations of K and 2,4-D. Both seeds and explants have been incubated at 24°C.

Once the results are analyzed, it is concluded that the mechanical scarification of the seeds and their remake for 48 hours is the best conditions for optimum seed germination; while in the induction of calli, the incidence of light and the concentrations of 1MM in K and 2,4-D favor an efficient proliferation of calli. The cotyledons and roots are the most suitable types of callogenesis.

Índex de Continguts

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Descripció i ecologia	1
1.2. Utilitats i aplicacions del garrofer	4
1.3. Cultiu in vitro	5
1.3.1. Embriogènesi somàtica	6
1.3.2. Callogènesi	7
1.4. Factors que influeixen en la germinació	8
1.4.1. Temperatura	8
1.4.2. Episperma.....	8
1.4.3. Fitohormones	9
1.5. Factors que influeixen en la callogènesis	10
1.5.1. Llum i foscó.....	10
1.5.2. Fitohormones	11
1.6. Antecedents	12
2. OBJECTIUS	14
3. METODOLOGIA	14
3.1. Obtenció i preparació de les llavors.....	14
3.2. Esterilització de les llavors	15
3.3. Preparació dels medis de cultiu per a la germinació.....	15
3.4. Sembra de les llavors de garrofer.....	17
3.4.1. Activitat hormonal i immersió en aigua	18
3.4.2. Hores fred	18
3.4.3. Separació de la coberta de la llavor	19
3.5. Preparació dels medis de cultiu per a la callogènesi	19
3.6. Preparació i cultius dels explants	20

4. RESULTATS	21
4.1. Germinació.....	21
4.1.1. Resultats de l'activitat hormonal i la immersió en aigua.....	22
4.1.2. Resultats de les hores de fred.....	23
4.1.3. Resultats de les llavors sense coberta	24
4.2. Callogènesi	25
5. DISCUSSIÓ	28
6. CONCLUSIONS	32
7. BIBIOGRAFIA	33
8. ANNEXOS	i
ANNEX A.....	i
ANNEX B.....	ii
ANNEX C	iii
ANNEX D	iii
ANNEX E.....	iv
ANNEX F.....	iv
ANNEX G	v
ANNEX H	vi

Glossari

2,4-D: Àcid 2,4-Diclorofenoxiacètic

B5: Gamborg's B-5 medium.

BAP: N-Benzilaminopurina

ES: Embriogènesi Somàtica

GA₃: Àcid gibberelic

K: Cinetina

MS: Murashige & Skoog

WPM: Woody Plant Medium.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Descripció i ecologia

Ceratonia siliqua, més comunament conegut com a 'garrofer', conforma una de les dues espècies del gènere *Ceratonia*, el qual pertany a la família de les *Fabaceae* (lleguminoses), on n'és considerat un dels gèneres més antics.

Taula 1. Classificació taxonòmica completa del garrofer.

TAXO	GRUP
SUPER-REGNE	<i>Eukaryota</i>
REGNE	<i>Plantae</i>
SUB-REGNE	<i>Vidriplantae</i>
INFRA-REGNE	<i>Streptophyta</i>
SUPER-DIVISIÓ	<i>Embryophyta</i>
DIVISIÓ	<i>Tracheophyta</i>
SUB-DIVISIÓ	<i>Spermatophytina</i>
CLASSE	<i>Magnoliopsida</i>
SUPER-ORDRE	<i>Rosanae</i>
ORDRE	<i>Fabales</i>
FAMILIA	<i>Fabaceae</i>
GÈNERE	<i>Ceratonia L.</i>
ESPÈCIE	<i>Ceratonia siliqua L.</i>

El garrofer és una planta llenyosa perennifòlia, que creix al voltant de 10 metres d'altura. El tronc és robust, però no massa alt, fent que les dimensions d'aquest arbre es donin gràcies a la seva gran i semiesfèrica capçada, formada per llargues i fortes branques. El fullatge és dens, presenta fulles compostes, paripinnades i alternades amb nombres parells de folíols de color verd fosc, marges sencers i forma ovalada.



Figura 1. *Ceratonia siliqua*. Extret de "Ceratonía siliqua at the Shivta archaeological site, southern Israel", de Wilson44691, Wikimedia, 2014.

Les seves flors es formen en el període estival, coincidint amb la maduració dels fruits formats l'any anterior. Al ser una espècie poligàmica, presenta tant individus unisexuals (hi floreixen flors masculines o femenines) com hermafrodites. El procés de floració es dona de forma cauliflòria, és a dir, les flors creixen directament del mateix tronc o dels nusos de les branques més velles de la planta (normalment quan l'arbre té més de 2 o 3 anys). Les flors presenten en general una inflorescència semblant: simple, racemosa i del tipus raïm, amb flors són pedunculades, sense ramificacions, disposades de forma helicoidal i a diferents altures. Morfològicament les flors són petites i amb tonalitat vermell-verdosa, segons el sexe es presenten petites diferències: les femenines són llargues i disperses; les masculines, són curtes i es troben més compactes, a més que la seva quantitat en la inflorescència és superior a la del sexe femení; finalment, les hermafrodites, presenten característiques intermèdies de les altres dues, aquest és el menys comú dels tres, ja que, les flors inicialment són hermafrodites, però a mesura que es desenvolupen aquestes se solen diferenciar a un sexe.

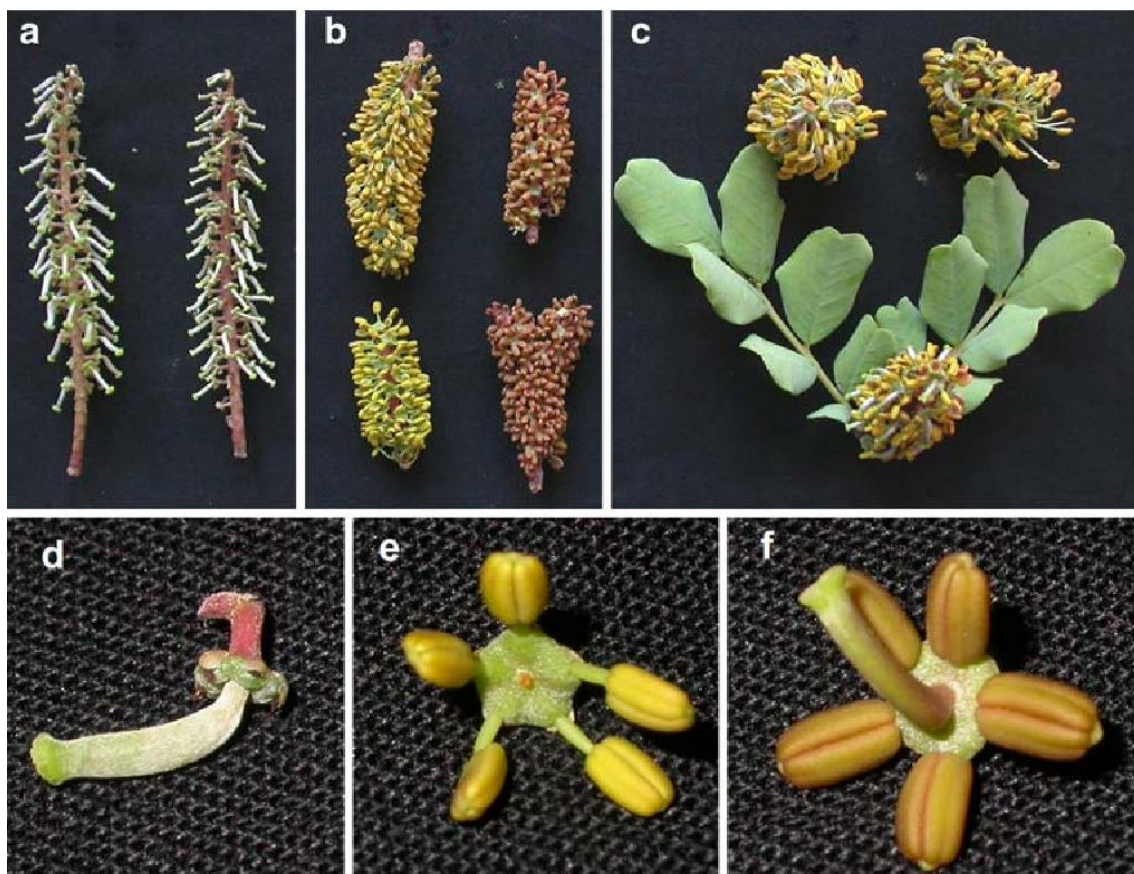


Figura 2. A) Inflorescència femenina. B) Inflorescència masculina. C) Inflorescència hermafrodita. D) Flor femenina. E) Flor masculina. F) Flor hermafrodita. Extret de "Generation of expressed sequence tags from carob (*Ceratonia siliqua* L.) flowers for gene identification and marker development", Carruso et. al, *SpringerLink*, 2008.

El procés de fructificació sol es produeix en els individus femenins i hermafrodites, tenint una duració d'uns onze mesos. El fruit, anomenat garrofa, és de tipus lleguminós, allargat i corbat. La raó del llarg període de desenvolupament del fruit, és que aquest comença a sortir en l'època hivernal on morfològicament és verd i carnós. De finals de març fins a finals d'estiu, aquest es reactiva i acaba de madurar i créixer completament on canvia a un color marró fosc o negre. A partir d'aquest període, la garrofa comença a perdre aigua, passant de ser un fruit carnós a un de sec en la seva fase més madura. La garrofa conté dins seu entre 10 i 20 llavors, el nombre varia segons l'individu. Són de color vermell fosc, aplanades i ovalades, i presenten un episperma molt dur que els proporciona rigidesa, impermeabilitat i durabilitat, fent que puguin aguantar entre tres a cinc anys sense germinar.



Figura 3. A) Fruit immadur. B) Fruit madur. Imatges extretes de *WallsHeaven*, autor i any de publicació desconeguts

Principalment, el garrofer, creix en la zona de la costa del Mediterrani la qual presenta un clima mediterrani subtropical, que es caracteritza per tenir climes suaus i humits durant la meitat de l'any i calorosos i secs a l'altra meitat.

És un organisme xeròfil, és a dir, està adaptat per sobreviure en llocs amb condicions àrides i climes secs; gràcies, principalment, al seu sistema radical que presenta una gran i profunda arrel primària amb nombroses i extenses ramificacions que poden arribar a créixer fins a uns 40 metres d'extensió. Aquest sistema radical permet a l'arbre absorbir nutrients i humitat de grans extensions, i per tant, adquirir resistència a la sequera i créixer en sòls pedregosos o amb tendència al despeniment com pendents o barrancs.

Tot i que és una planta molt resistent a condicions tèrmiques elevades i a sòls pobres, aquesta espècie és molt sensible a les baixes temperatures, fent que en arbres joves es produeixin danys i en adults absència de floració i fructificació.

1.2. Utilitats i aplicacions del garrofer

El garrofer és un arbre que degut a naturalesa del seu fruit no ha estat tradicionalment utilitzat en el consum humà com d'altres lleguminoses o arbres fruiters, sinó que s'ha utilitzat principalment per a alimentar al bestiar. Avui en dia encara té aquesta finalitat, però, gràcies a l'avenç en la indústria alimentària, s'han obtingut diversos productes derivats utilitzats pel consum humà. El més important és la goma garrofi, o E410, la qual és un polisacàrid resultant de la unió de galactoses i manoses obtingut de l'endosperma de les llavors; aquest és una goma molt utilitzada com additiu alimentari en l'elaboració de diferents productes gràcies a la seva capacitat per gelificar, espessir i emulsionar (Zannou et al., 2019). També a partir de la polpa de les beines s'obté una farina molt utilitzada en rebosteria i altres productes, degut a la seva dolçor i al seu aroma, i com a principal substitut de la xocolata (Loullis & Pinakoulaki, 2018).

Tot i que tradicionalment en algunes regions s'ha utilitzat com a planta medicinal en algunes afeccions renals o gastrointestinals, és en els darrers anys on ha ressorgit l'interès per conèixer les propietats fitoquímiques del garrofer:

- Una d'elles és la seva activitat antibacteriana provada en diferents espècies bacterianes, com: *S. aureus* i *E. coli* (El-Baky, 2013), *L. monocytogenes* (Aissani et al., 2012), *P. atrosepticum* (Meziani et al., 2015), *E. faecalis* i *S. thyphimurium* (Kivçak & Mert, 2002). Aquesta activitat s'ha observat a partir de l'ús de diferents tipus d'extractes del garrofer, s'ha relacionat la capacitat inhibidora amb la concentració de compostos fenòlics (tanins i flavonoides) que es troben en les llavors, baines i, de forma elevada, en les fulles.
- També s'han estudiat les seves activitats citotòxiques i antioxidants en diferents línies cel·lulars de tipus cancerigen, provocant una reducció de la viabilitat cel·lular i una inducció a l'apoptosi. S'ha observat que hi ha una relació entre la presència de compostos fenòlics, que es troben en les fulles i les baines, amb aquestes dues activitats (Custódio et al., 2011). A més, aquest efecte no s'ha pogut atribuir a un fenol en concret, sinó que es creu que diferents tipus de fenols presents en el garrofer (àcid gàl·lic, àcid p-coumàric i d'altres) actuen de forma correlacionada (Ghanemi et al., 2017).
- Estudis anteriors han demostrat que els flavonoides, presents en el garrofer, són capaços d'intervenir en diferents etapes del procés inflamatori actuant com agents antiinflamatoris, inhibint els mediadors inflamatoris responsables de regular aquest

procés (Lachkar et al., 2016). Això posa interès en poder-los utilitzar en casos on la inflamació es torna aguda o crònica (Ayache et al., 2020).

- Gràcies al seu efecte inhibidor observat en àcids gàl·lic i genístic, obtinguts a partir d'extractes de tija i fulles de *C. siliqua*, en l'activitat de la α -amilasa, que causa hiperglucèmia postprandial (després de menjar) en persones que sofreixen diabetis mellitus de tipus 2 (Custódio et al., 2015). El garrofer, per tant, presenta interessos farmacològics per a la regulació i control d'aquesta malaltia, evitant l'acumulació d'alts nivells de glucosa en sang.
- El garrofer presenta una alta concentració de tanins (polifenols) i lignines (fibres vegetals), els quals s'ha observat que tenen un efecte beneficiós en problemes causats pels nivells de colesterol en sang, com la hipercolesterolèmia. Les lignines a l'unir-se amb colesterol, eviten que aquests siguin absorbits per les cèl·lules epitelials intestinals (Zunft et al., 2001). Juntament amb els polifenols, eviten l'oxidació de les LDL, que oxidades causen l'acumulació de colesterol en artèries (Loullis & Pinakoulaki, 2018).

El garrofer és utilitzat també en altres àmbits del sector industrial, com: en el tèxtil, com a espessant i colorant; en el paper i cartró, com a espessant i en el procés de flotació; i en la indústria tèxtil, com a colorant i espessant (Zannou et al., 2019).

1.3. Cultiu in vitro

El fisiòleg alemany Gottlieb Haberlandt va ser el precursor d'aquest camp, realitzant el primer cultiu in vitro de cèl·lules foliars de *Lamium purpureum*, en el 1902, on va aconseguir augmentar el seu creixement i mantenir-les vives durant un mes (Sussex, 2008); a més, va ser qui va proposar el concepte de "cultiu in vitro" (Hussain et al., 2012).

Cultiu in vitro representa el conjunt de tècniques amb l'objectiu de fer créixer plantes sota condicions controlades (pH, nutrients, medi, llum, etc.) en un ambient artificial asèptic, a partir de llavors o d'explants, gràcies a la totipotència de les cèl·lules vegetals (Hussain et al., 2012).

Aquest camp presenta diferents aplicacions, entre aquestes s'hi troben: la producció i augment de plantes a gran escala, ja sigui per a interessos comercials (importar/exportar espècies), agrícoles o de repoblació d'alguna espècie en perill; l'obtenció de plantes a qualsevol època de l'any; l'alteració genètica, per obtenir diverses característiques filològiques d'interès; la producció de plantes exemptes de

contaminacions bacterianes, fúngiques o víriques; la clonació d'individus amb alt interès, ja sigui per alguna característica filològica, adaptabilitat o resistència superior que presenti respecte als altres individus de la seva espècie; o la producció i obtenció de diferents bio-components amb interès farmacològic o mèdic (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

1.3.1. Embriogènesi somàtica

L'embriogènesi somàtica (ES) és una tècnica molt utilitzada en cultius in vitro, que permet obtenir embrions sense la necessitat de recórrer al procés de fertilització que realitzen plantes adultes on, mitjançant la pol·linització, l'espermatozoide haploide fecunda l'òvul haploide donant lloc a un zigot diploide, que s'acaba transformant en un embrió (aquest procés s'anomena embriogènesi zigòtica). ES permet obtenir un embrió directament a partir de les cèl·lules dels explants, les quals es desdiferencien a cèl·lules totipotents i acaben donant lloc a un embrió. Actualment hi ha dues formes per induir una planta a la ES:

- ES Directa: Consisteix en induir directament els explants a la formació de l'embrió. Aquest mètode resulta útil quan es necessita la ràpida generació de noves plantes o la clonació d'alguns individus d'interès.
- ES Indirecta: Primer s'indueix l'explant a la formació de calls, que un cop formats s'acaben desenvolupant en un embrió; aquesta ES és útil per a l'obtenció i producció de components d'interès de la planta, concretament, els metabòlits secundaris (p.ex. terpenoides o compostos nitrogenats).

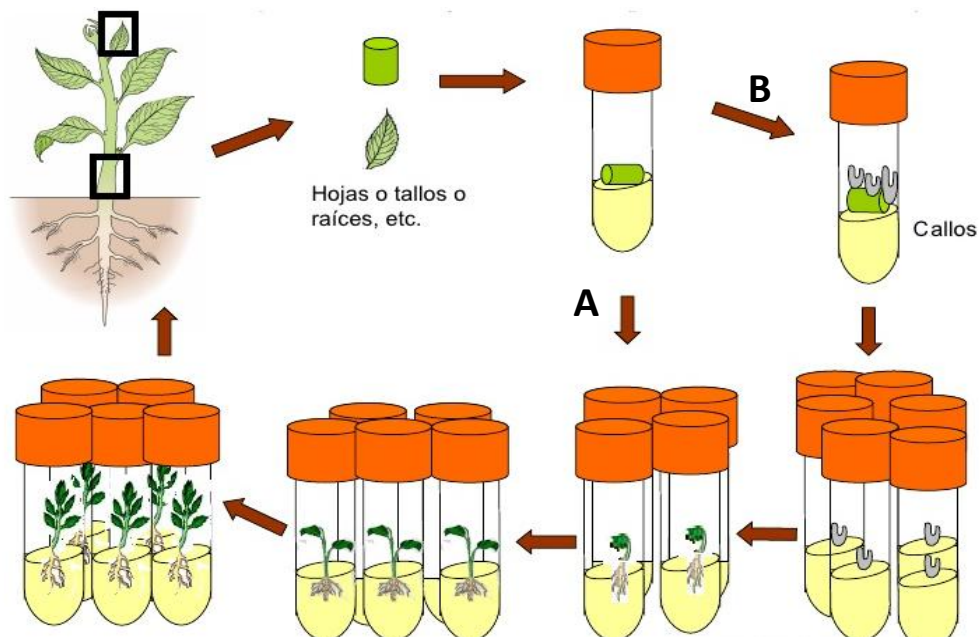


Figura 4. Esquema de les fases de la ES Directa (A) i la ES Indirecta (B). Adaptat de "Regeneració de plantes via embriogènesi somàtica", Susana Luna Rosales, *SlideShare*, 2006.

1.3.2. Callogènesi

És el procés intermedi en l'ES indirecta, on a partir dels explants s'obtenen els calls. Els calls consisteixen en masses cel·lulars totipotents, no diferenciades i alta capacitat de proliferació que formen una estructura desorganitzada, sense donar lloc a cap tipus de teixit o òrgan diferenciat de la planta (Ikeuchi et al., 2013). Segons el tipus de l'explant utilitzat, els calls sorgeixen en quantitats variables en la seva superfície (Khan et al., 2006).

La callogènesi, es produeix de forma natural com a resposta a l'estrès que sofreix la planta degut a una ferida o infecció microbiana i és regulada principalment per dues fitohormones: les citoquinines, que indueixen a la divisió cel·lular, la formació de nous brots i gemmes axil·lars; i les auxines, que indueixen a la divisió cel·lular i la formació d'arrels. Encara que les auxines i les citoquinines regulin diferents rutes d'organogènesi (diferenciació cel·lular), quan es troben en concentracions similars s'exerceixen entre elles un efecte inhibidor (relació antagònica), donant lloc a la formació de calls (Kurepa et al., 2019).

La morfologia del call depèn en gran part del tipus de medi, explant i fitohormones que s'utilitzin. Tot i que els calls tendeixen a una conformació esfèrica, aquests presenten diferències en els aspectes morfològics de color (blanc, verd /marró o violeta) i textura (dura o fràgil) (Smith, 2013).

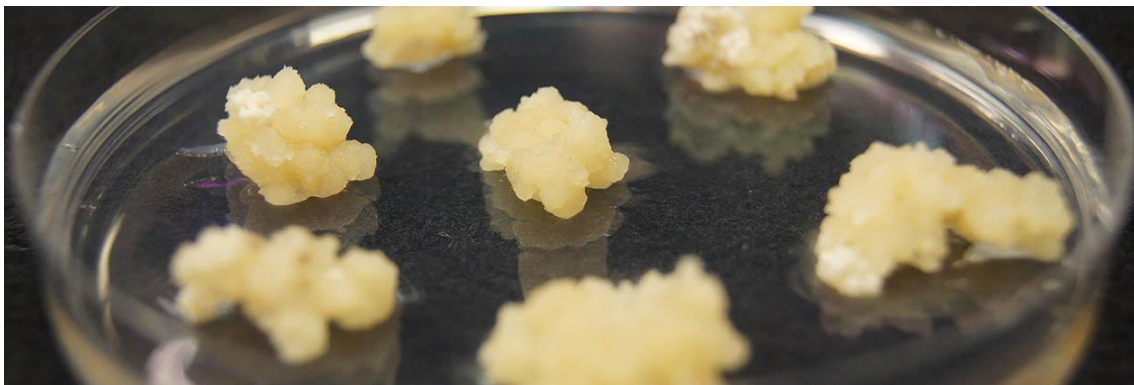


Figura 5. Calls. Extret de "Switchgrass callus regenerating on selection media", UT Institute of Agriculture.

Treballar amb calls és interessant, ja que permeten: obtenir material cel·lular de forma ràpida i fàcil, gràcies als seus alts nivells de proliferació; en suspensions cel·lulars, permeten la producció de metabòlits secundaris i anticòssos terapèutics en grans quantitats; en la modificació genètica de plantes, els calls permeten observar ràpidament com afecta la mutació i si ha estat efectiva o no en la planta; entre altres aplicacions (Efferth, 2019).

1.4. Factors que influeixen en la germinació

En aquest apartat es descriuran únicament les variables que s'han utilitzat i analitzat en l'estudi.

1.4.1. Temperatura

Quan es formen les llavors, aquestes romanen en estat de latència. La latència és un mecanisme de protecció de la llavor, per evitar que la planta creixi fora de la seva època de germinació. Per trencar aquest estat de latència i començar a germinar, la llavor necessita un conjunt de condicions ambientals favorables, entre les quals s'hi troben les hores de fred acumulat (Winkler et al., 2013). Com el seu nom indica, són el total d'hores que aquesta passa en temperatures entre 0 i 7°C. La quantitat que es necessita, per iniciar la germinació, varia segons l'espècie que s'utilitza (Santos et al., 2017).

L'estratificació representa el conjunt de mètodes utilitzats abans de la sembra, els quals s'utilitzen per a simular condicions ambientals i trencar artificialment l'estat de latència de la llavor (Bratcher et al., 1993). Hi ha diversos mètodes d'estratificació, segons els requeriments que necessiti la llavor, els quals varien en les condicions de temperatura (fred o càlid), de medi (sec o humit) i temps (de setmanes a mesos).

1.4.2. Episperma

Una altra condició ambiental necessària per trencar l'estat de latència, a part de la temperatura, és la humitat que absorbeix la llavor.

Hi ha llavors, com és el cas de les de la *Ceratonia siliqua*, que presenten una coberta molt dura i impermeable i inhibidors químics de la germinació, que necessiten de mètodes addicionals d'estratificació per a germinar, els quals reben el nom d'escarificació.

Hi trobem dos tipus d'escarificacions:

- Mètodes físics o mecànics: consisteixen en erosionar, fer petits talls o eliminar la coberta externa per tal que la llavor es pugui hidratar. S'utilitzen diferents eines com paper de llimar, fulles, agulles, etc.
- Mètodes químics o d'immersió: consisteixen en submergir la llavor en aigua o en dilucions d'àcid per tal d'eliminar els inhibidors de la coberta i estovar-la.

1.4.3. Fito hormones

- La N-Bencilaminopurina (BAP) és una citoquinina del tipus aromàtic que actua com a regulador de creixement en les plantes. Gràcies a la seva eficàcia i ampli rang d'aplicació, és un dels suplementes més utilitzats en cultius in-vitro. S'utilitza com a suplement en diferents medis de creixement en moltes espècies vegetals.

Morfològicament és sòlid (en pols), de color blanc i inodor. És soluble en aigua i solucions de NaOH, etanol, metanol i KOH. Es manté estable en solucions àcides i alcalines. Presenta una massa molar de 225,101 g/mol. Té la següent fórmula química: $C_{12}H_{11}N_5$.

BAP participa en diferents fases del desenvolupament de la planta. Com la resta de citoquinines BAP induïx a l'organogènesi del tall i les fulles, promovent l'elongació i la mitosis cel·lular. També participa en la ruptura del estat de latència de la llavor, sent capaç de frenar l'activitat d'inhibidors de la germinació, com l'àcid abscísic (González et al., 2016).

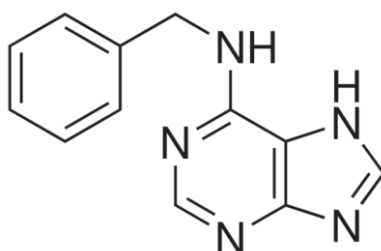


Figura 6. Estructura química de BAP. Imatge extreta de *MPBio*, autor i any de publicació desconeguts. Recuperat de: <https://www.mpbio.com/us/6-benzylaminopurine>

- Àcid gibelèric-3 (GA_3) és el subtipus de les gibberel·lines més utilitzat. GA actua de forma natural de l'àcid abscísic (ABA). Aquest es troba implicat en processos de germinació, organogènesi dels talls, desenvolupament de la floració i diferenciació i fertilitat dels òrgans sexuals femenins de la planta. S'ha comprovat que la deficiència de GA és perjudicial per la planta provocant que no es pugui trencar l'estat de latència de la llavor, malformacions i esterilitat de les plantes adultes (Gupta & Chakrabarty, 2013).

És una fitohormona amb una estructura química complexa, consisteix en un diterpè (resultat de la unió de 4 isoprenoides de 5 C cada un) que presenta quatre ciclacions de la seva cadena de C. Morfològicament és sòlid (en pols) i de color

blanc. És soluble en aigua i solucions d'etanol. Presenta una massa molar de 346,37 g/mol. Té la següent fórmula química: $C_{19}H_{22}O_6$.

GA₃ regula la germinació induint a la síntesi d'enzims hidrolítics com la α -amilasa o β -1,4 glucanasa, les quals inicien la degradació de les substàncies de reserva de la llavor (Farashah et. al. 2011) (Gupta & Chakrabarty, 2013).

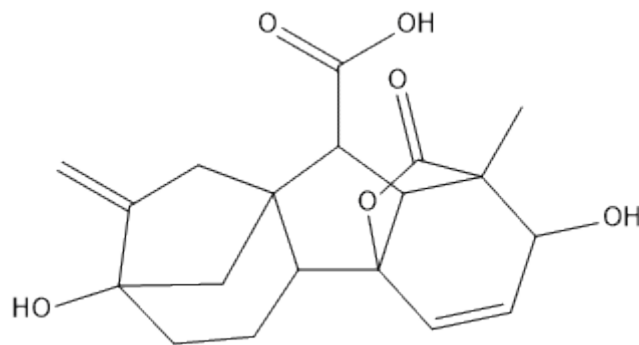


Figura 7. Estructura química de GA₃. Imatge extreta de *BioVision*, autor i any de publicació desconeguts. Recuperat de: <https://www.biovision.com/gibberellic-acid.html>

1.5. Factors que influeixen en la callogènesis

En aquest apartat es descriuran únicament les variables que s'han utilitzat i analitzat en l'estudi.

1.5.1. Llum i foscó

Les plantes són éssers autòtrofs, és a dir, utilitzen la llum com a font d'energia. Això fa que aquesta influeixi en processos com el desenvolupament, diferenciació, morfogènesis i metabolisme d'aquestes. Tots aquests processos regulats per la llum, s'anomenen fotomorfogènesi (Arsovski et al., 2012).

Diferents estudis s'han realitzat per determinar com aquest procés en el desenvolupament i formació dels calls. Les condicions de llum i foscó en la inducció de calls varien segons l'espècie vegetal que s'estudia. Plantes com la tomaquera (*Solanum lycopersicum*), la pebrina (*Capsicum annuum*) o el tabac (*Nicotina tabacum*) formen calls sota condicions de llum, mentre d'altres com la favera (*Vicia faba*), el blat de moro (*Zea mays*) i l'ordi (*Hordeum vulgare*) formen calls en condicions de foscó (Siddique & Islam, 2018).

De la mateixa forma que la callogènesi, l'embriogènesi varia segons l'espècie vegetal. Mentre que en la síndria (*Citrullus lanatus*) es pot realitzar en condicions de foscó; en

el nabiu vermell (*Vaccinium macrocarpon*) aquesta sol es produeix en condicions de llum (Bhatia & Ashwath, 2005).

1.5.2. Fitohormones

- La cinetina (K) és una citoquinina que actua en els processos d'organogènesi (diferenciació i creixement cel·lular) del tall i brots de la planta. Aquesta és troba de forma natural en plantes i humans, tenint en aquests un efecte antioxidant.

En diversa literatura científica, s'afirma que la cinetina també participa en els processos metabòlics de resposta a l'estrès tant biòtic (causat per bacteris, fongs, virus, etc.) com abiòtic (causats per temperatures irregulars, absència de llum o nutrients, intensa humitat, etc.) que provoquen danys en la planta (Werner & Schmölling, 2009).

Aquesta citoquinina és àmpliament utilitzada, en conjunció amb diferents auxines, per a la inducció de calls (F. Li et al., 2012). Aquests es produeixen gràcies a la seva activitat antagonista bidireccional, quan es troben a concentracions semblants.

Morfològicament és sòlid i de color blanc. És soluble en aigua i solucions d'etanol, metanol i NaOH. Presenta una massa molar de 215,21 g/mol. Té la següent fórmula química: C₁₀H₉N₅O.

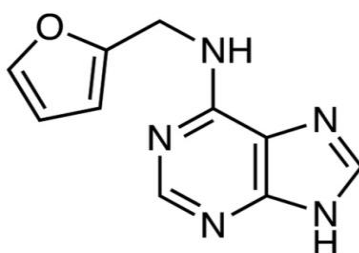


Figura 8. Estructura química de K. Imatge extreta de *TCIChemicals*, autor i any de publicació desconeguts. Recuperat de: <https://www.tcichemicals.com/ID/en/p/K0009>

- L'àcid 2,4 Diclorofenoxiacètic (2,4D) és una auxina i un dels herbicides més antics que hi ha, sent selectiu per varietats dicotiledònies no desitjades en el camp (com les males herbes) sense afectar a les varietats monocotiledònies. La seva acció es basa en que provoca un creixement descontrolat en la planta, que deriva en diferents malformacions i, finalment, en la mort.

En cultius in vitro s'utilitza com a agent regulador del creixement per a la inducció a l'organogènesi d'arrels i per a la inducció a calls, gràcies a la seva capacitat de revertir les cèl·lules a un estat no diferenciat i estimular la seva divisió i multiplicació (F. Li et al., 2012).

Morfològicament és sòlid i de color blanc. És soluble en aigua i solucions d'etanol, metanol i NaOH. Presenta una massa molar de 221'04 g/mol. Té la següent fórmula química: C₈H₆Cl₂O₃.

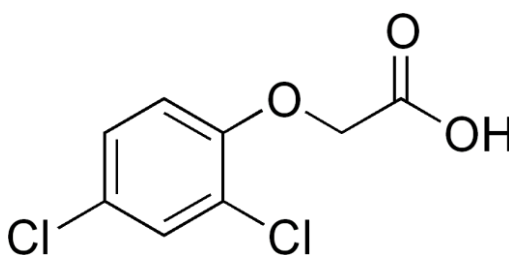


Figura 9. Estructura química de 2,4-D. Imatge extreta de *Wikipedia*, autor i any de publicació desconeguts. Recuperat de: https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_2,4-diclorofenoxiac%C3%A9tico

1.6. Antecedents

En els últims anys el garrofer ha recobrat interès com a planta medicinal, gràcies a les seves diverses propietats fitoquímiques, anteriorment descrites, en l'àmbit farmacològic. Això ha generat la necessitat d'establir diferents protocols per al seu òptim desenvolupament, micropropagació clonal i extracció de metabòlits d'interès.

Pérez García, F. (2009) va publicar un estudi on analitzava la germinació de *C. siliqua* sota diferents condicions i escarificacions. Va observar que, mentre que la variació de temperatura (des de 10 fins a 25°C) no presentava diferències significatives en la germinació, l'ús de diferents mètodes d'estratificació sí. Les estratificades amb H₂O calenta, H₂SO₄, i de forma mecànica van donar uns valors de germinació de 80, 88 i 99% (respectivament); mentre que les no estratificades, és a dir, les que conservaven la capa externa de la llavor, van tenir uns nivells de germinació del 25%. Amb aquest estudi Pérez va obtenir resultats diferents a estudis previs on afirmen que la temperatura òptima de germinació es troba entre 25 i 27°C; i que les llavors no estratificades tenien un índex de germinació inferior al 10% o directament nul.

Bostan, S.Z. i Kiliç, D. (2014) van analitzar com influeix la concentració dels agents (com GA₃ i amb H₂SO₄) utilitzats en els diferents mètodes d'estratificació per immersió. Van observar que tot i que GA₃ és una fitohormona que estimula la germinació de la

planta, aquest no és eficient com a mètode d'escarificació, ja que únicament van germinar entre el 6 i el 28% de les llavors submergides en aigua i GA₃ (concentracions: 500, 1000 i 1500ppm) durant 24 hores; en canvi les submergides en H₂SO₄, 30 minuts i en aigua 2 dies, tenen valors de germinació de més del 80%. Comparant amb altra literatura científica, van concloure que a més alta concentració de H₂SO₃, més augmenta l'índex de germinació.

Abdalrasol, E.M. i Lamlom, S.H. (2016) van analitzar com beneficien, en la germinació, els mètodes d'escarificació. Van observar que individualment H₂SO₄ i l'aigua a T^a d'evaporació són els més efectius, amb un 90,8 i 84,2% de germinació respectivament. Tot i així, combinant diferents mètodes van aconseguir percentatges més elevats en l'estratificació mecànica afegint H₂SO₄ (92,4%) i en l'estratificació mecànica afegint aigua destil·lada (94,3%). Arribant a la conclusió que combinant diferents mètodes, es poden trobar alternatives més eficients i menys perilloses per a la llavor, ja que H₂SO₄, tot i ser molt utilitzat, pot malmetre l'embrió.

Saidi, R., Rahmouni, S. i d'altres investigadors (2019) van comparar diferents espècies de citoquinines i dos medis (Murashige & Skoog (MS) i Woody Plant Medium (WPM)) per determinar la seva eficiència en el desenvolupament de *C. siliqua*. Van concloure, coincidint amb altra literatura científica, que les citoquinines BAP i zeatina són les més òptimes en el creixement de plàntules de garrofer i que BAP és l'agent regulador de creixement que més afavoreix la formació de fulles i brots. A més, l'ús de BAP va reportar estat de necrosis i alguna malformació en algunes plàntules, però en combinar-se amb GA₃ aquests efectes negatius no es van manifestar i, inclús, es va observar un lleuger augment en la mida de les plantes respecte a les quals sol estaven tractades amb BAP.

Respecte als medis de cultiu, WPM va reportar un major nombre de brots i fulles formades que el MS, mentre que la mida i el nivell de creixement de les plàntules era semblant entre els dos medis.

Lozzi, A., Abdelwahd, R. i d'altres investigadors (2019) van analitzar com influeix el genotip de la planta en la callogènesi, comparant cinc genotips diferents de garrofer en diferents medis. Van observar que el genotip no presenta una influència significativa a l'hora d'induir a la formació de calls (tenint tots ells entre un 70 i 100% d'èxit); tot i així, a nivell morfològic els calls presentaven àmplies diferències de color, les quals en l'estudi atribueixen a la diferència de concentració de fitohormones endògenes en els diferents genotips dels garrofers estudiats.

També van determinar que la sal present en els medis utilitzats representa un factor

limitant a l'hora de realitzar la callogènesi. En els medis com WPM, que presenten una baixa concentració de sal, són en els que menys calls es formen; mentre que en B5 és en el que se'n van formar més.

Van relacionar la concentració de nitrat amb la textura dels calls, ja que, en medis amb baixa concentració d'aquest (com són els medis B5 i WPM) els calls eren de textura fràgil; mentre que el medi MS, que conté una concentració d'aquest, els calls van resultar de textura compacta.

2. OBJECTIUS

L'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA) de Lleida realitza diferents línies d'investigació, entre les quals s'hi troba l'anàlisi de les propietats fitoquímiques de *Ceratonia siliqua*. Degut a que en aquest centre no s'ha treballat anteriorment amb aquesta planta, el present estudi serveix com a base per al desenvolupament d'aquesta i futures línies d'investigació que es duguin a terme amb el garrofer.

Per aquest motiu s'han establert els següents objectius:

1. Analitzar, comparar i identificar les millors condicions físiques i químiques per a la germinació de *Ceratonia siliqua*.
2. Analitzar, comparar i identificar les millors condicions físiques i químiques per a la inducció a calls de *Ceratonia siliqua*.
3. Determinar quina part de la planta és més eficaç en la inducció de calls de *Ceratonia siliqua*.

La hipòtesi inicial que plantejada des del centre d'investigació, és que les millors condicions per a la germinació són: l'escarificació de la coberta de les llavors i l'acumulació d'hores de fred. Mentre que en la inducció de calls la millor condició que recolza la hipòtesi inicial és la incubació dels explants en fosc.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenció i preparació de les llavors

Les llavors utilitzades en aquest estudi s'han extret de beines madures, les quals prèviament s'han netejat en aigua corrent i deixat assecar dins d'una cabina de flux laminar; on, a més, s'han emmagatzemat fins a l'inici de l'experiment, per tal de minimitzar possibles contaminacions externes. S'han obtingut un total de 150 llavors, a partir del trencament manual de les beines madures, i s'han guardat en grups de 10 en 15 tubs cònics (Falcon de 50 ml) per la seva posterior desinfecció.

Aquestes beines procedeixen d'un camp de cultiu d'un pagès de Córdoba. Concretament, en la parcel·la nº 20 - MB, sent l'arbre nº 84 de la varietat T-130.

3.2. Esterilització de les llavors

Es van realitzar tres rentats amb aigua destil·lada, realitzant diverses inversions en cada rentat, per tal d'eliminar les contaminacions i impureses més superficials que podrien tenir externament les llavors.

Les següents fases de la desinfecció es va realitzar en una cabina de seguretat biològica tipus II-A, per tal de garantir i mantenir condicions d'asèpsia en les llavors.

Primer, es va realitzar una immersió de les llavors en etanol al 70% durant 1 minut. Cada tub cònic es va omplir amb 50 ml d'aquest líquid.

Passat aquest període de temps, es van buidar els tubs cònics d'etanol i es van omplir cada un amb 50 ml de la solució NaOCl + reactiu tween a l'1% (1 litre total, format per: 270 ml del lleixiu + 2 gotes del reactiu tween + 730 ml d'aigua destil·lada), durant 15 minuts. Durant aquest temps es realitzen inversions dels tubs per tal que el líquid esterilitzi tot l'interior d'aquests (tan llavors com parets).

Finalment van buidar els tubs de la solució i es van tornar a realitzar tres rentats amb aigua destil·lada. A l'últim rentat els tubs es van deixar plens amb l'aigua destil·lada per a que les cobertes de les llavors es comencessin a estovar.

3.3. Preparació dels medis de cultiu per a la germinació

Per a la fase de germinació de l'experiment, s'ha utilitzat el *Woody Plant Medium* (WPM) com a base per a realitzar els medis de cultiu. Composició detallada del medi en l'annex A.

S'han realitzat dos medis WPM diferents (M1 i M2), cada un amb un volum total d'1 litre. M1 serà el medi pel grup control; mentre que M2, enriquit amb fitohormones, serà el medi del grup experimental.

Taula 2. Composició dels medis WPM i funció dels seus components.

COMPONENT	M1	M2	FUNCIÓ
WPM	2,46 gr.	2,46 gr.	Font de nutrients, vitamines i sals
Sacarosa	30 gr.	30 gr.	Font de carboni
BAP (1000 μM)	-	1 ml	Hormones reguladores del creixement
GA₃ (1μM)	-	0,5 ml	
Agar	8,5 gr.	8,5 gr.	Solidificar el medi
Aigua destil·lada	Enrasar a 1 L	Enrasar a 1 L	Font d'aigua

Per a l'elaboració d'M1 i M2, s'han seguit els següents passos:

- 1) Omplir, amb aigua destil·lada, la meitat de volum una ampolla d'1 litre.
- 2) Posar l'ampolla sobre un agitador magnètic, introduir-hi una mosca i iniciar l'agitació.
- 3) Pesar i afegir: sacarosa i WPM (M1 i M2) i BAP (M2). Prèviament s'ha preparat la dilució de BAP (diluir 0,225 grams en un litre d'aigua).
- 4) Ajustar el pH a 5,7.
- 5) Enrasar al volum total amb aigua destil·lada.

A partir d'aquí els passos varien segons el medi.

- En M1:

- 6) Autoclavar l'ampolla 3 minuts a 115°C. Al treure-la de l'autoclau, tornar a iniciar l'agitació per evitar que l'agar se solidifiqui.
- 7) Amb un dosificador peristàltic, dosificar 15 ml de medi en cada tub de vidre.
- 8) Tapar cada tub de vidre i autoclavar-los 20 minuts a 121°C.

- En M2:

- 6) Autoclavar l'ampolla 25 minuts a 125°C i el material (tubs de vidre, gradetes i taps) 40 minuts a 121°C. Deixar refredar l'ampolla fins a un 60°C, per evitar que a l'hora d'inocular-hi l'AG₃ es desnaturalitzi.
- 7) Preparar la dilució d'AG₃ (316 μ l d'AG₃ en 684 μ l de DSMO).
- 8) En cabina, pipetejar l'AG₃ en l'ampolla i homogeneïtzar la barreja.
- 9) En cabina, amb un dosificador peristàltic, dosificar 15 ml de medi en cada tub de vidre autoclavat.
- 10) Tapar cada tub amb taps autoclavats.

3.4. Sembra de les llavors de garrofer

Un total de 150 llavors s'han sembrat sota diferents condicions, donant lloc a tres grups d'estudi: 1, 2 i 3. Totes les sembres s'han realitzat dins d'una cabina de seguretat biològica tipus II-A, per tal de mantenir les condicions d'asèpsia.

Taula 3. Condicions de cada grup d'estudi.

CONDICIONS	GRUP 1				GRUP 2				GRUP 3	
	A	B	C	D	A	B	C	D	E	F
Immersió en aigua	24h	24h	48h	48h	24h	24h	48h	48h	21 dies	21 dies
Hores fred (7°C)	-	-	-	-	28 dies				28 dies	
Medi	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Pelades	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI

Les llavors del grup 1 s'han incubat a 24°C després de la sembra. Les del grup 2 s'han conservat a 7°C un mes després de la sembra, passat aquest temps s'han incubat a 24°C.

Cada grup s'ha dividit en diferents subgrups (A, B, C i D) per tal de poder estudiar les condicions de forma separada. Els grups 1 i 2 presenten quatre subgrups diferents:

- A:** Les llavors sembrades han estat en remull 24 hores i sembrades en el medi control (M1).
- B:** Les llavors sembrades han estat en remull 24 hores i sembrades en el medi suplementat amb hormones (M2).
- C:** Les llavors sembrades han estat en remull 48 hores i sembrades en el medi control (M1).
- D:** Les llavors sembrades han estat en remull 48 hores i sembrades en el medi suplementat amb hormones (M2)

El grup 3 conté les llavors que se'ls ha separat l'episperma.

Aquest presenta dos subgrups (E i F). Totes les llavors han estat un mes en remull, posteriorment pelades i sembrades en M1 (**E**) i en M2 (**F**).

En la sembra, tot el material ha estat prèviament autoclavat:

- Pinces, per introduir les llavors en els tubs de vidre (35 minuts a 121°C);
- Paper de filtre, on s'hi dipositen les llavors un cop es treuen dels tubs cònics, hi estan en remull (40 minuts a 124°C)

Per disminuir el risc de contaminacions, entre sembra i sembra: les pinces es desinfecten per foc directe; es canvia el paper i es neteja la zona de treball de la cabina amb etanol al 70%.

La llavor es sembra introduint únicament la meitat d'aquesta en el medi, això es fa per a que quan germini els cotiledons puguin sortir i créixer fàcilment en la superfície.

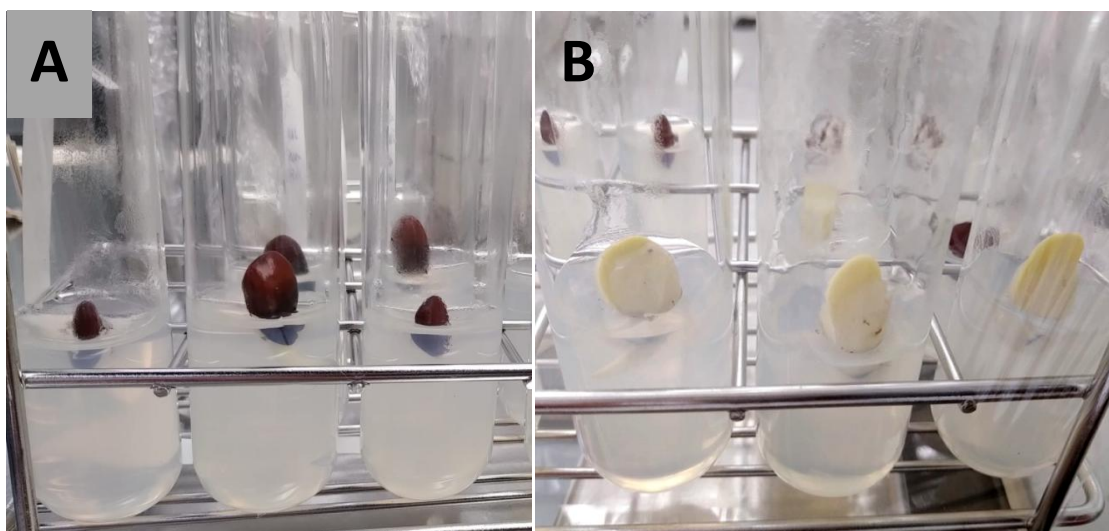


Figura 10. Llavors de garrofer sembrades en tubs A) Grup 1 i 2 B) Grup 3. Imatges recuperades del repertori propi.

3.4.1. Activitat hormonal i immersió en aigua

Aquestes condicions han estat estudiades en el grup 1, format per un total de 60 llavors.

Els subgrups A i B es van sembrar i incubar un cop les llavors portaven 24 hores en remull. C i D es van sembrar l'endemà, passades 48 hores de remull.

A i B permeten estudiar com influeix l'activitat de les fitohormones en la germinació, servint A com a control. Mentre que C i D permeten observar si amb el doble d'hores de remull, la coberta d'aquestes es torna més permeable i es poden eliminar més eficaçment els inhibidors de germinació de la coberta.

3.4.2. Hores fred

Aquesta condició ha estat estudiada en el grup 2, format per un total de 63 llavors.

A diferència del grup anterior, en el grup 2, un cop sembrades les llavors no s'han portat a incubar directament, sinó que s'han emmagatzemat a durant tot el mes de

febrer a temperatura constant de 7°C i en fosc. Un cop passat aquest temps s'han incubat a 24°C com la resta de grups.

Els subgrups A i B consta de llavors amb 24 hores en remull. C i D de llavors amb 48 hores de remull.

En el grup 2 s'estudia com afecten les hores de fred en les condicions estudiades en el grup 1, i per tant en el procés de germinació de les llavors del garrofer.

3.4.3. Separació de la coberta de la llavor

Aquestes condicions han estat estudiades en el grup 3, format per un total de 20 llavors.

Al veure que, passades 24 i 48 hores de remull, la coberta de les llavors encara era massa dura per pelar-la, es va decidir deixar-les dues setmanes més en remull (i en fred) per veure si amb aquest període de temps es podrien pelar.

Al final un 70% d'aquestes llavors es van poder pelar, mitjançant escarificació mecànica. Un cop pelades es van sembrar directament i incubar a 24°C.

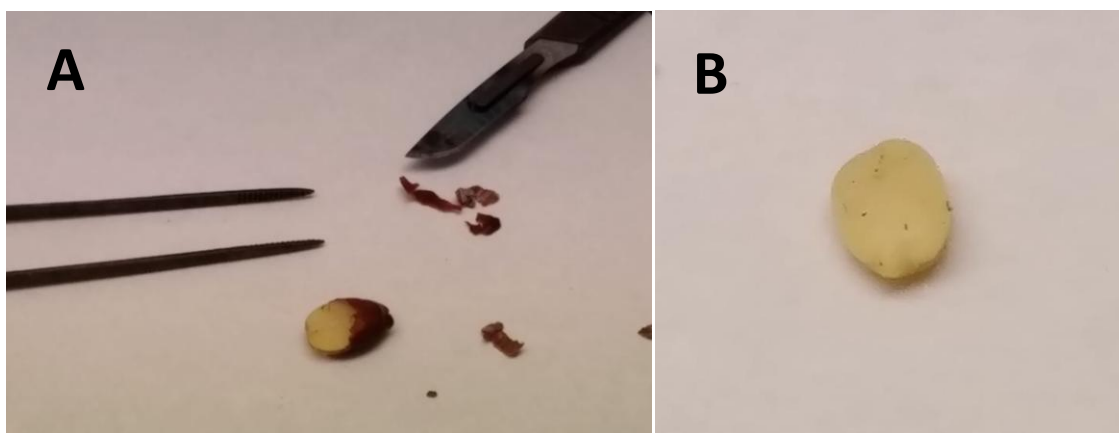


Figura 11. A) Procés d'escarificació mecànica en la llavor. B) Llavor pelada. Imatges recuperades del repertori propi.

3.5. Preparació dels medis de cultiu per a la cal·logènesi

Per a la fase de cal·logènesi del experiment, s'ha utilitzat com a base el medi de cultiu *Murashige and Skoog* (MS). Composició del medi detallada en l'annex B.

Un total de 5 medis s'han realitzat, 4 d'ells amb diferents concentracions de citoquinines (K) i d'auxines (2,4-D); i l'últim sense la presència ni de 2,4-D ni de K, que actua com a control.

Taula 4. Concentracions hormonals de cada medi per a la inducció de calls.

FITOHORMONA	MS (control)	CONCENTRACIO HORMONAL			
K	-	1 μ M	1 μ M	10 μ M	10 μ M
2,4-D	-	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M

Per a l'elaboració dels 5 medis, s'han seguit els següents passos:

- 1) Omplir, amb aigua destil·lada, a la meitat de volum una ampolla d'1 litre.
- 2) Posar la botella sobre un agitador magnètic, introduir-hi una mosca i iniciar l'agitació.
- 3) Pesar i afegir: sacarosa i MS.
- 4) Ajustar el pH a 5,7.
- 5) Enrasar al volum total amb aigua destil·lada.
- 6) Autoclavar l'ampolla 25 minuts a 125°C. Deixar-la refredar fins a un 60°C, per evitar que a l'hora d'inocular-hi K i 2,4-D es desnaturalitzin.
- 7) En cabina, pipetejar 500 μ l de K i 2,4-D en l'ampolla i homogeneïtzar la solució.
- 8) En cabina, dosificar 24 ml de medi en plaques de petri de 90mm de diàmetre.

3.6. Preparació i cultius dels explants

Cada llavor germinada s'ha seccionat per obtenir explants. Aquests s'han obtingut a partir dels cotiledons, l'hipocòtil i l'arrel. S'ha cultivat un total de 65 plaques, separades en dos grups:

- a) Creixement en llum: les plaques s'han posat sota llum directa.
- b) Creixement en foscor: les plaques es tapen amb paper d'alumini, evitant l'entrada de llum.

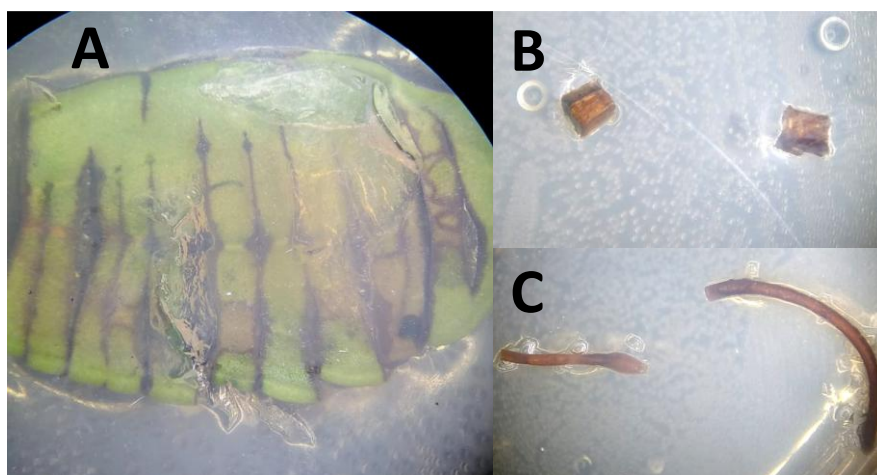


Figura 12. Explants obtinguts a partir de diferents parts de la planta: A) Cotiledó. B) Hipocòtil. C) Arrels. Imatges recuperades del repertori propi.

4. RESULTATS

4.1. Germinació

Setmanalment s'ha registrat l'evolució del procés de germinació de les llavors, en les diferents condicions induïdes. Els nivells de germinació (Figura 13) de tots els grups estudiats es troben entre el 60 i el 100% (Annexos G i H).

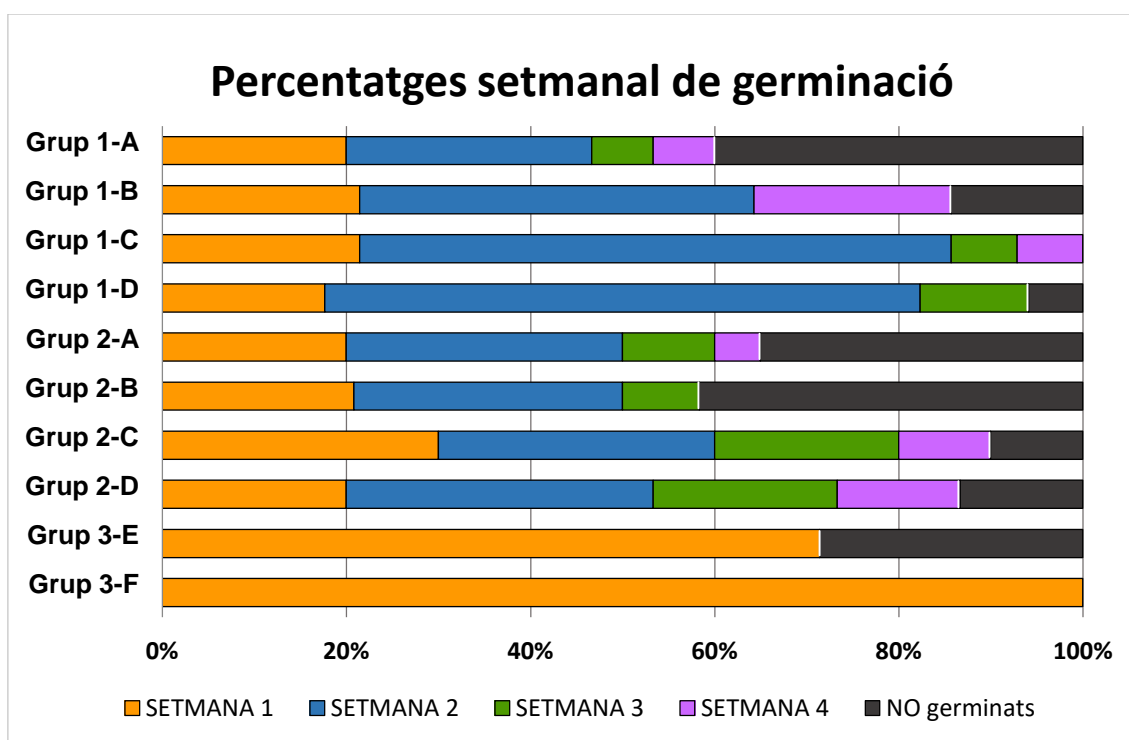


Figura 13. Percentatges setmanals de germinació de les llavors en els diferents medis i condicions. **Grup 1-A:** M1+ 24h remull. **Grup 1-B:** M2+ 24h remull. **Grup 1-C:** M1+ 48h remull. **Grup 1-D:** M2+ 48h remull. **Grup 2-A:** M1+ 24h remull + 1 mes fred. **Grup 2-B:** M2+ 24h remull + 1 mes fred. **Grup 2-C:** M1+ 48h remull + 1 mes fred. **Grup 2-D:** M2+ 48h remull + 1 mes fred. **Grup 3-E:** M1 + llavors pelades. **Grup 3-F:** M2 + llavors pelades.

D'aquesta figura, es dedueix que de totes les condicions imposades (Taula 3) les més adients per a la germinació, amb un 100% de taxa d'èxit, són les dels grups 3-F (*M2 + escarificació mecànica + 1 mes en remull*) i les del grup 1-C (*M1 + 48 hores en remull*). Seguidament trobem amb un 94% i 90%, respectivament, les dels grups 1-D (*M2 + 48 hores en remull*) i 2-C (*M1 + 48 hores en remull + 28 dies en fred*). Les condicions que presenten un menor percentatge de viabilitat germinativa, amb un 60% i 58% respectivament, són les 1-A (*M1 + 24 hores en remull*) i 2-B (*M2 + 48 hores en remull + 28 dies en fred*).

4.1.1. Resultats de l'activitat hormonal i la immersió en aigua

Comparant aquestes dues condicions (tipus de medi i hores en immersió en aigua) en les llavors del grup 1 (on en són les úniques condicions aplicades), s'observa un gran augment en els nivells de germinació de les llavors sembrades després de 48 hores en remull (subgrups C i D), respecte a les que en van estar 24 hores (subgrups A i B). En la Figura 13 podem observar que les llavors del grup 1-A i B, presenten uns percentatges de germinació del 60% i 86%, respectivament; mentre que en les del grup 1-C i D, aquests, augmenten fins al 100% i 94%, respectivament.

Després d'analitzar les dades dels tres grups estudiats, s'han obtingut diferents resultats. En relació al tipus de medi utilitzat, M1 i M2, els dos medis presenten una lleu diferència en els nivells de germinació, menor al 5% (Figura 14), sent el medi suplementat amb reguladors del creixement (M2) el que presenta nivells de germinació més elevats, amb un 80,5% de viabilitat; mentre que el control (M1) presenta un 75,7%.

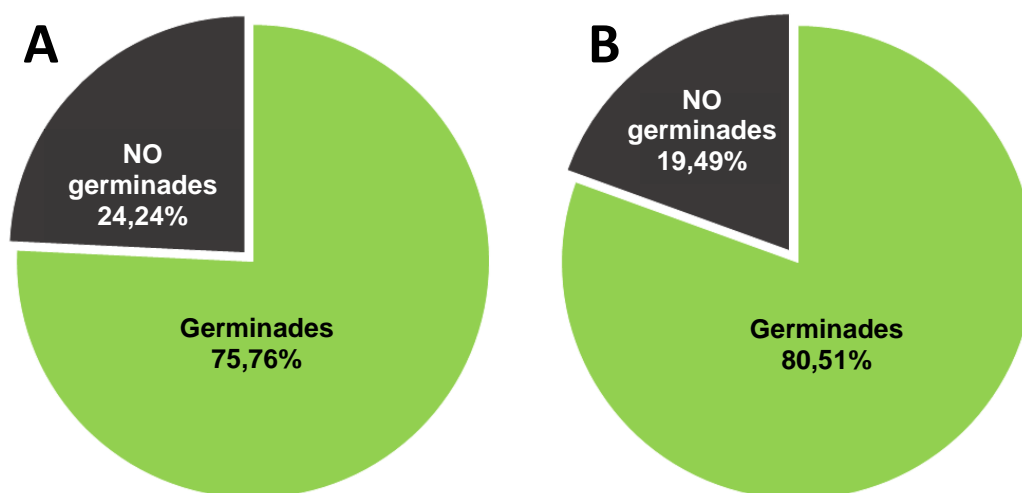


Figura 14. Comparació de la viabilitat en la germinació de llavors total en els dos medis. A) M1. B) M2

Respecte a les hores de remull de les llavors, els resultats dels tres grups presenten una notable diferència en la viabilitat de germinació en les dues condicions imposades (Figura 15). Mentre que les llavors que han estat 24 en remull en aigua destil·lada presenten un nivell de germinació del 65,7%; en les que han estat 48 hores en remull, aquest nivell augmenta fins a un 92,8%.

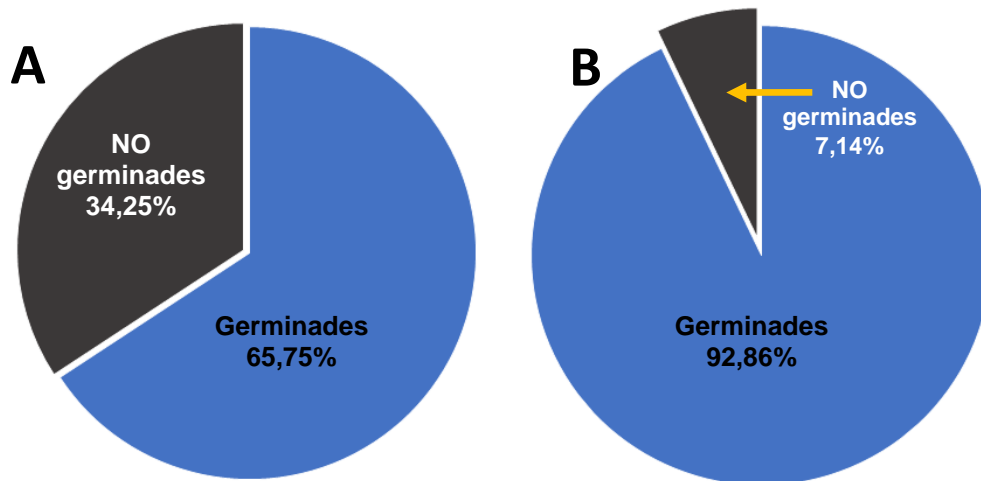


Figura 15. Comparació de la viabilitat en la germinació total en les llavors en remull en aigua destil·lada. A) 24 hores en remull. B) 48 hores en remull.

4.1.2. Resultats de les hores de fred

En la figura 16 podem observar com han influït les hores de fred en la germinació i en les altres variables. Les llavors del grup 2, després d'un mes a 7°C, han presentat una viabilitat germinativa inferior a les llavors del grup 1 en tots els subgrups analitzats (Figura 13). Mentre que les llavors del grup 1 presenten un percentatge de germinació del 85%, aquests en el grup 2 disminueix fins a un 71%.

On més significativa és aquesta disminució, és en la comparació entre els subgrups B dels grups 1 i 2. Les llavors sembrades en el medi suplementat amb hormones, quan s'incuben directament a 24°C (grup 1) presenten un percentatge del 86% de viabilitat; però quan aquestes es mantenen un mes en fred (grup 2) disminueix fins a un 58%.

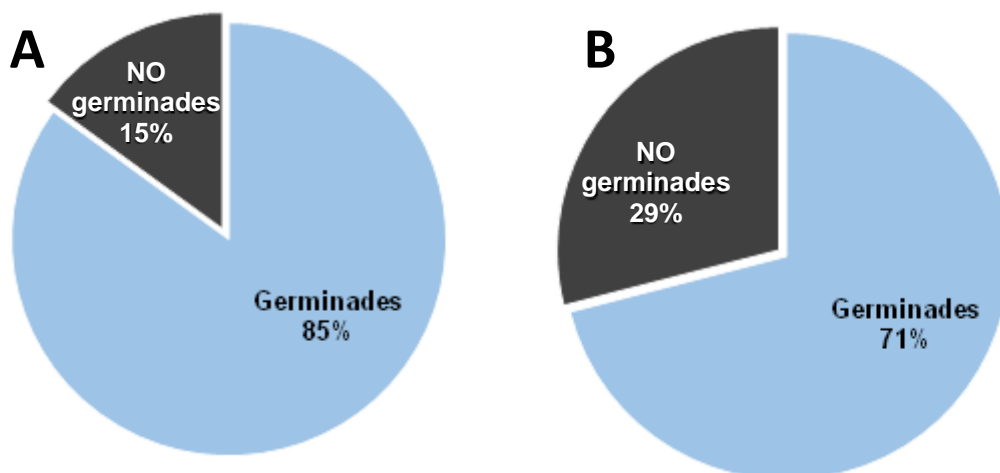


Figura 16. Comparació de la viabilitat de la germinació total de llavors, en l'acumulació de les hores de fred (7°C). A) Directament a incubar a 24°C (Llavors grup 1). B) 1 mes a 7°C abans d'incubar a 24°C (Llavors grup 2).

4.1.3. Resultats de les llavors sense coberta

En les llavors pelades trobem els percentatges de germinació més elevats (Figura 13). Les llavors del grup 3-F, presenten un 100% de viabilitat en la germinació; mentre que les del grup 3-E presenten 71,4%. És interessant veure que en el medi control, les llavors pelades (grup 3-E) presenten uns nivells inferiors de germinació que les llavors amb coberta del grup 1-C, quan en altra literatura científica (Abdalrasol & Lamloom, 2016) s'ha reportat que les llavors escarificades presenten nivells superiors de germinació que les llavors amb coberta.

A més, en aquest grup estudiat (grup 3) s'observa que la velocitat de germinació és molt més elevada en les llavors sense coberta que en les que la mantenen (grups 1 i 2), on les llavors pelades en una setmana ja germinen, mentre que les altres necessiten un mínim de dues setmanes per garantir com a mínim un 50% de germinació (Figura 13).

En la figura 17 s'observa aquesta diferència en la velocitat de germinació de les llavors del grup 3. En la mateixa setmana van es van sembrar tant llavors pelades (grup 3) com llavors amb coberta (grup 2). Entre dos i tres dies les llavors del grup 3 ja havien germinat, mentre les que presentaven coberta encara estaven alliberant fenols al medi (la tonalitat fosca que s'aprecia a la imatge).



Figura 17. A) Comparació de velocitat de germinació entre les llavors del grup 3 (pelades) amb les del grup 2 (sense pelar) en la primera setmana de sembra. B i C) Planta de la llavor pelada en la segona setmana de creixement. Imatges recuperades del repertori propi.

4.2. Callogènesi

Després de dues setmanes en els medis d'inducció, els explants cultivats han generat calls en la seva superfície. Per a cada placa analitzada s'ha comptat i calculat la proporció de calls formats per explant, per tal de determinar el nivell de proliferació de calls en els diferents medis i condicions lumíniques.

En el següent gràfic (Figura 18) s'observa com afecta la incidència tant de llum com de la foscor en la inducció de calls. Els explants que han realitzat la callogènesi en llum presenten un nombre significativament superior de calls formats que els explants que han estat en foscor. En canvi, els nivells en les plaques control, és a dir, medis sense hormones presenten nivells semblants de calls formats (al voltant d'un 16% en les dues condicions lumíniques: 16,05% en llum i 16,59% en foscor).

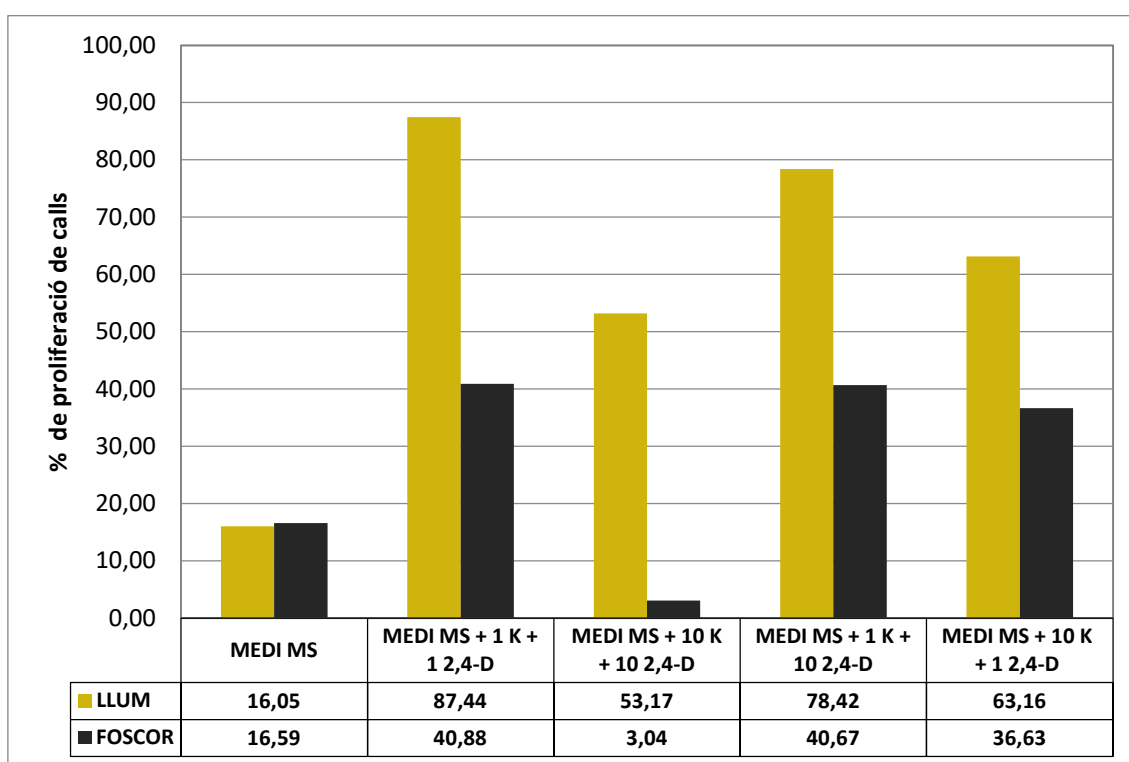


Figura 18. Percentatge de proliferació dels calls en els diferents medis i condicions lumíniques.. Color groc: % Calls formats en les paques incubades en condicions de llum. Color negre: % Calls formats en les paques incubades en condicions de foscor.

De les dades obtingudes (Figura 18) es conclou que el medi més adient per a callogènesi en el garrofer, amb quasi un 90% de proliferació de calls, és el medi MS suplementat amb una concentració d'1 μM tant de K com de 2,4-D. En augmentar la concentració d'alguna d'aquestes hormones, el nombre de calls formats disminueix fins a un 78% (*MS + 1 K + 10 2,4-D*) i, de forma considerable, a un 63% (*MS + 10 K + 1 2,4-D*) la formació de calls. Més evident és la diferència en el medi suplementat amb

el doble de concentració de les dues hormones (*MS + 10 K + 10 2,4-D*), on els nivells d'inducció de call tot just superen el 50%. El medi control, sense hormones, presenta un 16% de calls formats, indicant la importància de l'ús d'aquestes hormones per l'obtenció eficient de calls.

Els explants han presentat diferents nivells de proliferació de calls, segons el tipus utilitzat i les condicions aplicades (Taula 5). L'hipocòtil i les arrels presenten els nivells de proliferació més elevats amb un 50% total en totes les condicions i medis estudiats, mentre que els cotiledons sols presenten un 32%. On les més favorables per la inducció de calls són: medis amb concentracions d'1µM de K i amb incidència de llum, on tots els tipus d'explants presenten nivells d'inducció de calls per sobre del 70%.

Els tipus d'explants més propensos a formar calls són els obtinguts de l'hipocòtil, el qual inclús en el medi control, on en els altres explants de les arrels i els cotiledons no s'han format calls, els dels hipocòtils han reportat nivells quasi del 50%, és a dir que per cada dos explants és forma de mitjana un call.

Taula 5. Percentatge de formació de calls en els diferents tipus d'explants: hipocòtil, cotiledons i arrel.

MEDI \ EXPLANT	HIPOCÒTIL		COTILEDONS		ARREL	
	FOSCOR	LLUM	FOSCOR	LLUM	FOSCOR	LLUM
MS (control)	47,5%	48,2%	0%	0%	2,3%	0%
MS + 1 K + 1 2,4-D	58,5%	87,9%	30,8%	74,4%	33,3%	100%
MS + 1 K + 10 2,4-D	30,4%	93,8%	28,4%	58,2%	63,2%	83,3%
MS + 10 K + 1 2,4-D	7,5%	68,2%	24,9%	55,0%	77,5%	79,0%
MS + 10 K + 10 2,4-D	1,3%	55,2%	0,8%	48,0%	7,2%	56,4%
PROLIFERACIÓ	29%	71%	17%	47%	37%	64%
PROLIFERACIÓ TOTAL	50%		32%		50%	

Dos tipus de calls morfològicament diferents s'han obtingut:

1. Calls verd-marrons amb textura compacta: Aquests han estat els més abundants, trobant-se en tots els medis, tipus d'explants i condicions tant de llum com de foscor (Figura 19).
2. Calls blancs amb textura fràgil: Aquests no han estat tan abundants, sol s'han trobat en els medis amb baixes concentracions de cinetina [*1 K + 1 2,4-D*] i [*1 K + 10 2,4-D*] i en presència de llum. Aquests s'han trobat localitzats sobretot en els cotiledons, i en menys mesura en alguns explants de l'hipocòtil (Figura 20).

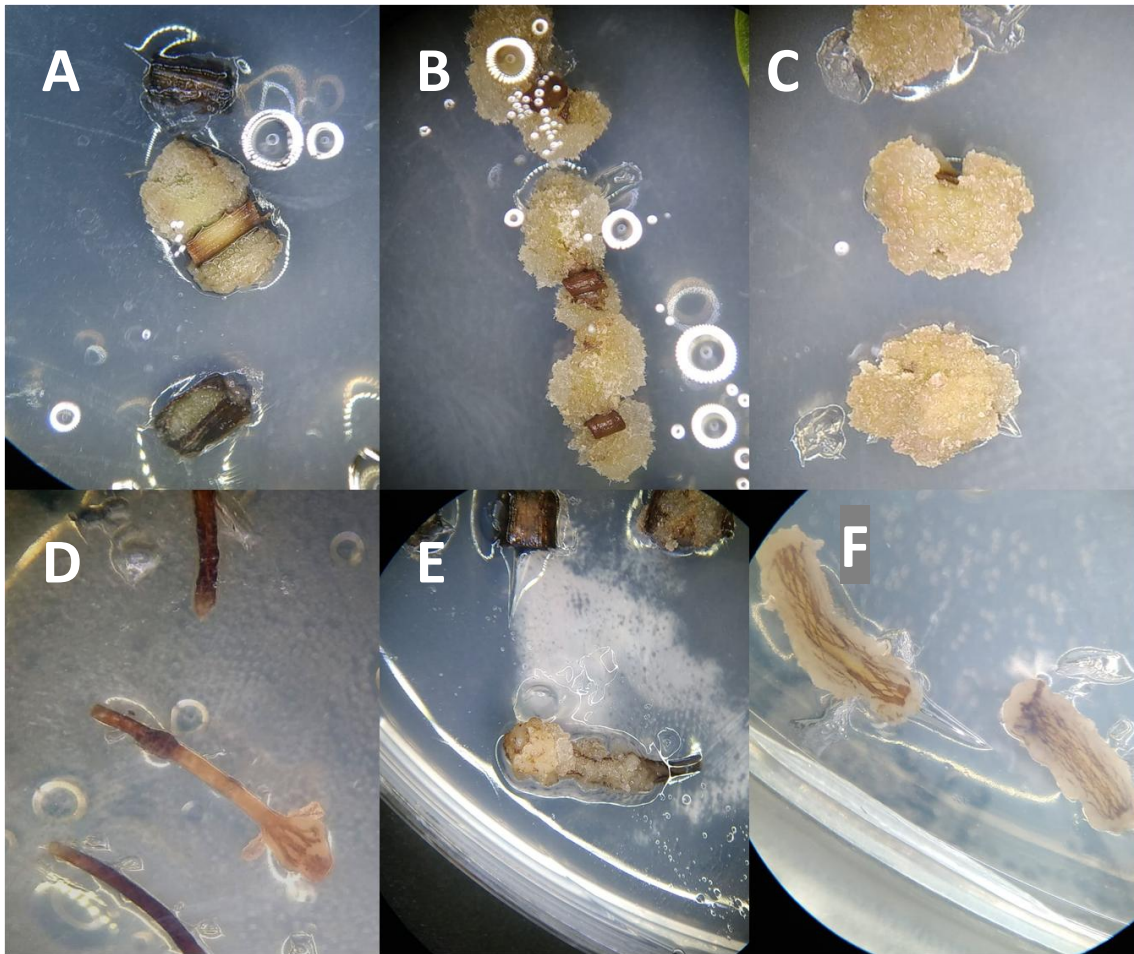


Figura 19. Formació de calls en els diferents tipus d'explants. A, B i C) Calls en explants de l'hipocòtil. D, E i F) Calls en explants d'arrels. Imatges recuperades del repertori propi.

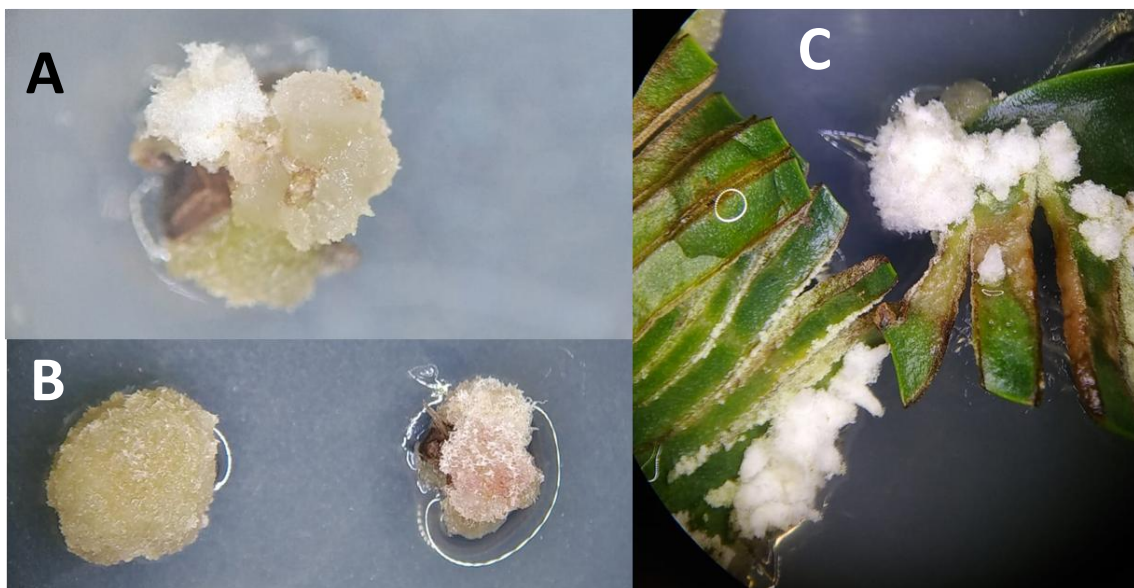


Figura 20. Formació de calls morfològicament diferents. A i B) Comparació dels dos tipus de calls formats. C) Calls formats en els explants obtinguts dels cotiledons. Imatges recuperades del repertori propi.

5. DISCUSSIÓ

Germinació

En la germinació de les llavors de *C. siliqua*, a diferència del que s'havia plantejat inicialment en la hipòtesi, les hores de fred acumulades no augmenten la viabilitat d'aquest procés. S'ha observat que les llavors que han estat a baixes temperatures presenten un percentatge de germinació 14 punts inferior a les que es van incubar directament a 24°C. Aquests resultats, però, concorden amb els obtinguts per Luna et al. (2008) on després de comparar dos grups de llavors (estratificades a 4°C i no estratificades) de 58 espècies diferents d'arbres de zona Mediterrània, com n'és el garrofer, van concloure que les hores de fred no són fonamentals per a la germinació de tota llavor, ja que en el 80% de les plantes estudiades no hi havia una diferència significativa en la germinació dels dos grups. Inclús, aquestes sent perjudicials en un 17% de les 58 plantes estudiades.

Les llavors del garrofer utilitzades en l'experiment es van rebre a principis de febrer, per tant ja portaven un parell de mesos rebent hores de fred de forma natural. El fet de posar-les a 7°C durant un mes més, ha pogut provocar un excés d'hores de fred que ha afectat la seva capacitat germinativa.

En canvi, els resultats de la immersió de les llavors en aigua han reportat resultats de germinació superiors als esperats en la hipòtesi inicial. Pérez-García (2009) va reportar que la immersió de les llavors en aigua destil·lada durant 24, 48 i 72 hores no produïa un augment significatiu en els nivells de germinació de les llavors i aquests es trobaven tan sols entre un 23 i 29%. Abdalrasol i Lamlom (2016) encara van obtenir uns resultats inferiors de germinació, amb un 13% en les llavors en 72 hores en remull. En el present estudi els resultats obtinguts han estat superiors als de Pérez i Abdalrasol - Lamlom, donant uns valors totals de 60% de germinació en les llavors remull durant 24h i un 100% en les llavors en remull 48 hores en els medis control (sense presència hormonal ni hores de fred).

Una possible causa d'aquesta diferència entre els resultats d'aquest estudi i els mencionats anteriorment, pot ser el tipus de medi utilitzat. En els articles revisats no s'especifica quin medi de creixement utilitzen. Aquest és l'únic factor que difereix en les condicions dels resultats comparats. Diferents articles (Silvia et al., 2016) i (H. Li & Zhang, 2018) han analitzat diferents medis de cultiu en la germinació i coincidit en que el medi WPM és el més adient per a garantir una efectiva germinació. WPM és el medi utilitzat en el present estudi i pot ser que en els de Pérez i Abdalrasol - Lamlom el medi sigui un altre menys adient per aquest procés.

En la germinació, els medis suplementats amb reguladors de creixement (BAP i GA₃) han donat uns resultats semblants als medis control. Això indica que aquests no han pogut entrar completament dins la llavor i catalitzar aquest procés. En el grup de les llavors pelades sí que es pot observar l'eficiència d'aquests reguladors, on en les llavors del subgrup sense coberta sembrades en el medi amb BAP i GA₃ hi ha hagut un 100% de germinació. A més, totes les llavors pelades han estat les que han presentat la velocitat de germinació més elevada: mentre les llavors amb coberta han necessitat com a mínim 1,5 setmanes per començar a germinar, les llavors sense coberta en uns 3 dies ja han començat a germinar. Aquests resultats concorden amb els obtinguts Abdalrasol & Lamloom (2016) que van obtenir una velocitat de creixement mitjana de 2,83 dies (Figura 17).

També cal mencionar que tot i que les fitohormones utilitzades no han augmentat la taxa de germinació, sí que han estat involucrades en l'organogènesi de la planta. Mentre que les plàntules germinades en els medis control es desenvolupen i diferencien a poc a poc (tota la planta de color groc, no hi ha diferenciació entre la tija i l'arrel, mida petita i la llavor encara es troba unida als cotiledons); les plantes de les llavors germinades en el mateix període de temps presenten: canvi de coloració a verd, diferenciació entre tija i arrel, primeres ramificacions de l'arrel, mida més gran, els cotiledons es separen un de l'altre, la llavor es separa fàcilment de la planta i es produeix la formació de fulles de forma més ràpida i en més quantitats. Per tant l'ús de les fitohormones és fonamental per garantir un eficient i ràpid desenvolupament de la planta germinada. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per Saïdi et al. (2019) on van observar que l'ús de BAP i GA₃ augmenta els nivells i la velocitat de desenvolupament i diferenciació de les plantes germinades (Figures 21 i 22).



Figura 21. Comparació en el creixement de les plantes del medi control (esquerra) amb les del medi suplementat amb hormones (dreta) en la tercera setmana d'observació. Imatges recuperades del repertori propi.

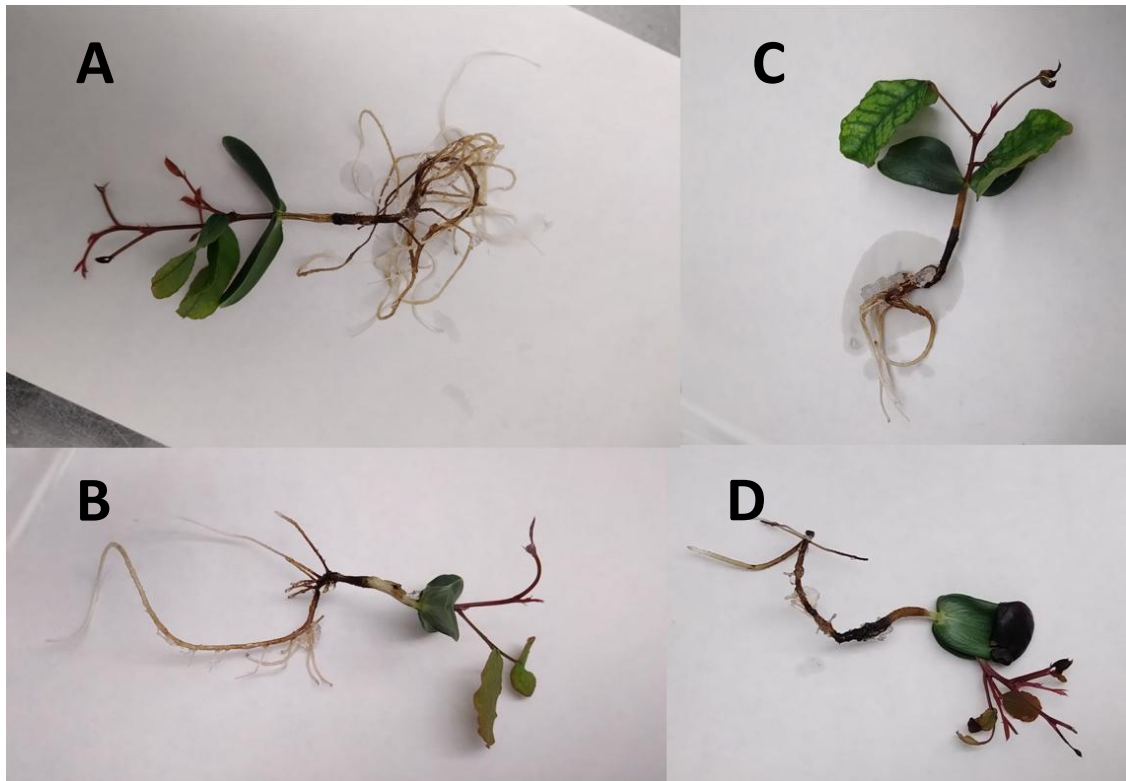


Figura 22. Comparació en el creixement de les plantes. Es pot observar com les plantes del medi suplementat amb hormones (A i C) presenten mida més gran, més formació de fulla i arrels ramificades que les del medi control (B i D). Imatges recuperades del repertori propi.

Un cop realitzat el seguiment de la germinació, tant en la viabilitat com en el desenvolupament de la planta, s'ha determinat que les condicions més òptimes per a realitzar aquest procés són: l'escarificació mecànica juntament amb l'ús de reguladors del creixement i, com a alternativa, el remull de les llavors durant 48 hores amb l'ús de reguladors del creixement.

En aquest apartat de l'estudi es mostra que no és fonamental eliminar la coberta de la llavor del garrofer per tal d'obtenir nivells eficients de germinació.

Callogènesi

S'ha observat que existeix una relació entre la incidència de llum i l'activitat de les hormones utilitzades en la inducció de calls. Els medis amb K i 2,4-D en presència de llum, presenten uns nivells de formació de calls entre el 53 i 87%; mentre que en condicions de foscor aquests nivells disminueixen fins a valors d'entre el 3 i 40% i, en canvi, en els medis control (sense K ni 2,4-D) no hi ha una diferència significativa en els nivells de proliferació de calls en les dues condicions lumíniques (16,05% en llum i 16,59% en foscor).

Els resultats obtinguts en aquesta part del treball, han estat diferents dels esperats en la hipòtesi inicial. Un possible motiu que els medis amb hormones hagin estat més

actius en condicions de llum que en foscor, pot ser degut a l'estrès abiòtic per excés d'aigua. Les plaques dels medis en contacte directe amb la llum han presentat nivells de condensació d'aigua molt superiors a les plaques que estaven tapades amb paper d'alumini, ja que aquest en tenir la capacitat de reflectir la llum, manté els nivells de calor evitant que es formi tanta condensació. Les K són unes hormones que participen en la resposta a l'estrès abiòtic de la planta (Werner & Schmülling (2009) i Zwack & Rashotte (2015)), això es pot relacionar amb el fet que en les plaques que presenten excés d'aigua condensada, els explants hi han generat un nombre superior de calls.

Degut a falta de temps, la generació de calls s'ha observat durant un total de 3 setmanes. Per obtenir uns resultats més fiables seria necessari allargar aquesta observació unes setmanes més, per tal de garantir la generació total de calls en les dues condicions, ja que pot ser que la velocitat de generació dels calls sigui diferent segons la concentració lumínica. En altres estudis, com el de Lozzi et al. (2019) mantenen els calls un total de 5 setmanes en foscor.

Els hipocòtils i les arrels han resultat ser les parts de la planta més propenses a la formació de calls, en els medis amb concentracions de $1\mu\text{M K} + 1\mu\text{M 2,4-D}$ (87,9 i 100%, respectivament) i de $1\mu\text{M K} + 10\mu\text{M 2,4-D}$ (93,8 i 83,3%, respectivament). Tot i que els nivells de callogènesi són semblants entre hipocòtils i arrels, la mida dels calls formats és diferent. Els calls de les arrels són més petits i dispersos; mentre que els dels hipocòtils es troben amb morfologia més circular i mida més gran.

A altes concentracions d'aquestes hormones, els nivells de formació de calls han disminuït dràsticament fins a uns nivells de 50% (en llum) i 3% (en foscor). Aquests resultats obtinguts concorden amb els de (Kurepa et al., 2019), on van observar que quan les citoquinines i auxines es troben a altes concentracions, aquestes perden la seva activitat antagonista mútua. Fent que no es tendeixi a formar teixit no diferenciat (calls).

Els resultats de la morfologia dels calls, els quals són en la majoria de color verd-marró i de textura compacta, coincideixen amb els obtinguts per El Bouzdoudi et al. (2017).

Limitacions

En la primera fase del treball, al comparar diferents condicions, els grups d'estudi no han tingut una gran població (cada subgrup de llavors estudiades constava d'entre 10 i 20 llavors), això fa que els resultats puguin no ser del tot representatius. Per tant una bona forma de recolzar els resultats obtinguts, seria la realització de diferents

repeticions amb grups d'estudi més grans i un estudi estadístic.

En la segona fase de l'estudi, al treballar amb individus de plantes diferents, els resultats poden variar segons el component genètic de cada un. Per tal de garantir uns resultats en base a les mateixes condicions genètiques i metabòliques (cada planta hi presenta diferències) s'haurien de realitzar subcultius d'un mateix explant (clonat per micropropagació).

A més, degut a falta de temps l'observació i seguiment dels calls sol s'ha pogut realitzar durant 3 setmanes, quan el procés òptim serien entre 5 i 6 per garantir un total desenvolupament dels calls.

6. CONCLUSIONS

1. De totes les condicions físiques i químiques comparades, la immersió de les llavors en aigua durant 48 hores ha demostrat ser el mètode més eficient en la germinació, permetent eliminar els inhibidors de membrana de la coberta de la llavor i fent-la més permeable.
2. L'acumulació d'hores de fred en la germinació del garrofer ha demostrat tenir un efecte negatiu en la viabilitat d'aquest procés.
3. L'ús de fitohormones BAP i GA₃ no ha augmentat els nivells de germinació de les llavors, però sí la velocitat en el desenvolupament de la planta i en la diferenciació dels seus teixits.
4. A diferència d'altres plantes, en el garrofer, la presència de llum en el procés de la callogènesi augmenta la proliferació de calls en els medis suplementats amb auxines i citoquinines.
5. La concentració òptima, per a la formació eficient de calls, de K i 2,4-D és de 1µM. L'augment en la seva concentració disminueix significativament la formació de calls, ja que perden la seva activitat antagonista.
6. Els explants que més proliferació de calls han presentat, han estat els obtinguts a partir d'hipocòtils i d'arrels. Els explants obtinguts a partir de cotiledons, tot i ser menys eficients que els dos anteriors, són els únics que han generat calls morfològicament diferents de la resta.

7. BIBIOGRAFIA

- Abdalrasol, E. M. & Lamlom, S. H., (2016). Effects of Various Pre-Sowing Treatments on Seed Germination of Carob (*Ceratonia Siliqua* L.) From Al-Jabal Al-Akhdar Area (Balagrae, Al-Baida, Libya). *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 09(09), 16–24. <https://doi.org/10.9790/2380-0909011624>
- Aissani, N., Coroneo, V., Fattouch, S., & Caboni, P. (2012). Inhibitory effect of carob (*Ceratonia siliqua*) leaves methanolic extract on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), 9954–9958. <https://doi.org/10.1021/jf3029623>
- Arsovski, A. A., Galstyan, A., Guseman, J. M., Nemhauser, J. L., Arsovski, A. A., Galstyan, A., Guseman, J. M., & Nemhauser, J. L. (2012). Photomorphogenesis. *Arabidopsis Book.*, 10. <https://doi.org/10.1199/tab.0147>
- Ayache, S. Ben, Saafi, E. B., Emhemmed, F., Flamini, G., Achour, L., & Muller, C. D. (2020). Biological activities of aqueous extracts from carob plant (*Ceratonia siliqua* L.) by antioxidant, analgesic and proapoptotic properties evaluation. *Molecules*, 25(14). <https://doi.org/10.3390/molecules25143120>
- Bhatia, P., & Ashwath, N. (2005). Effect of Duration of Light:Dark Cycles on in vitro Shoot Regeneration of Tomato. In *Asian Journal of Plant Sciences* (Vol. 4, Issue 3, pp. 255–260). <https://doi.org/10.3923/ajps.2005.255.260>
- Bratcher, C. B., Dole, J. M., & Cole, J. C. (1993). Stratification Improves Seed Germination of Five Native Wildflower Species. *HortScience*, 28(9), 899–901. <https://doi.org/10.21273/hortsci.28.9.899>
- Carruso, M., Gaetano, D., Ye, X., La Malfa, S., Dentile, A., Tribulato, E. & Roose, M. L. (2008) Generation of expressed sequence tags from carob (*Ceratonia siliqua* L.) flowers for gene identification and marker development [Imatge digital]. Recuperat de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11295-008-0159-8>
- Custódio, L., Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2011). Phytochemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Activities of the Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Germ Flour Extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 78–84. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0214-8>
- Custódio, L., Patarra, J., Alberício, F., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2015). In vitro antioxidant and inhibitory activity of water decoctions of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) on cholinesterases, α -amylase and α -glucosidase. *Natural Product Research*, 29(22), 2155–2159. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.996147>
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- El-Baky. (2013). Bacterial Growth Inhibitory Effect of *Ceratonia siliqua* L. Plant Extracts Alone and in Combination with Some Antimicrobial Agents. *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering*, January 2013, 2–13. <https://doi.org/10.12970/2311-1755.2013.01.01.1>
- El Bouzdoudi, B., Saïdi, R., Nejjar El Ansari, Z., Bouras, M., Badoc, A., & Lamarti, A. (2017). Callus induction from carob (*Ceratonia siliqua* L.) seedlings and leaves of

mature tree. *Annual Research and Review in Biology*, 19(2).
<https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/37037>

Fotografía de calls]. Extret de " *Switchgrass callus regenerating on selection media*" de UT Institute of Agriculture.

Recuperat de <https://ag.tennessee.edu/racheff/Pages/default.aspx>

[Fotografía dels fruits madurs i immadurs del garrofer]. Recuperat de:
<https://wallsheaven.com/photos/siliqua>

Ghanemi, F. Z., Belarbi, M., Fluckiger, A., Nani, A., Dumont, A., De Rosny, C., Aboura, I., Khan, A. S., Murtaza, B., Benammar, C., Lahfa, B. F., Patoli, D., Delmas, D., Rébé, C., Apétoh, L., Khan, N. A., Ghringhelli, F., Rialland, M., & Hichami, A. (2017). Carob leaf polyphenols trigger intrinsic apoptotic pathway and induce cell cycle arrest in colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 33, 112–121.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.032>

González, G., Alemán, S., Trujillo, R., Domenech, R., Abreu, E., & Pérez, Y. (2016). Influencia del 6 Bencilaminopurina sobre el comportamiento in vitro de plantas de Henequén obtenidas a partir de embriones. *Biotecnología Vegetal*, 2(4), 4–7.

Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25504. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>

Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*, 1–28.
<https://doi.org/10.5772/50568>

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>

Khan, J. A., Jaskani, M. J., Abbas, H., & Khan, M. M. (2006). Effect of Light and Dark Culture Conditions on Callus Induction and Growth in Citrus (*Citrus Reticulata* Blanco.). *International Journal of Biology and Biotechnology*, 3(4), 669–672.
https://www.researchgate.net/profile/Muhammad_Jaskani/publication/283009278_EFFECT_OF_LIGHT_AND_DARK_CULTURE_CONDITIONS_ON_CALLUS_INDUCTION_AND_GROWTH_IN_CITRUS_CITRUS_RETICULATA_BLANCO/links/56260c3e08aeedae57db9c35/EFFECT-OF-LIGHT-AND-DARK-CULTURE-CONDI

Kivçak, B., & Mert, T. (2002). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua* L. Extracts. *Turkish Journal of Biology*, 26(4), 197–200.

Kurepa, J., Shull, T. E., & Smalle, J. A. (2019). Antagonistic activity of auxin and cytokinin in shoot and root organs. *Plant Direct*, 3(2), e00121.
<https://doi.org/10.1002/pld3.121>

Rosales, S. L. (2008). Conservación de especies vegetales mexicanas por cultivo de tejidos [Imatge digital]. Recuperat de: <https://es.slideshare.net/susylunar/platica-conserv-spp-veg-mex-xct-presentation>

Lachkar, N., Al-Sobarry, M., El-Hajaji, H., Lamkinsi, T., Lachkar, M., Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2016). Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua* L. Methanol barks extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2016(January), 202–210.

Li, F., Cui, X., Feng, Z., Du, X., & Zhu, J. (2012). The effect of 2,4-D and kinetin on

- dedifferentiation of petiole cells in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 56(1), 121–125. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0026-1>
- Li, H., & Zhang, D. (2018). In vitro seed germination of *Kalmia latifolia* L. Hybrids: A means for improving germination and speeding up breeding cycle. *HortScience*, 53(4), 535–540. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12829-17>
- Loullis, A., & Pinakoulaki, E. (2018). Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications. *European Food Research and Technology*, 244(6), 959–977. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3018-8>
- Lozzi, A., Abdelwahd, R., Alami-Halimi, D., Mentag, R., & Abousalim, A. (2019). Optimization of a mature cotyledons-based in vitro culture system for embryogenic-callus induction in carob (*Ceratoniasiliqua* L.). *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 25(1), 71–84. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.06.053>
- Luna, B., Pérez, B., Céspedes, B., & Moreno, J. M. (2008). Effect of cold exposure on seed germination of 58 plant species comprising several functional groups from a mid-mountain Mediterranean area. *Ecoscience*, 15(4), 478–484. <https://doi.org/10.2980/15-4-3156>
- Meziani, S., Oomah, B. D., Zaidi, F., Simon-Levert, A., Bertrand, C., & Zaidi-Yahiaoui, R. (2015). Antibacterial activity of carob (*Ceratoniasiliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbial Pathogenesis*, 78, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.12.001>
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Saïdi, R., Rahmouni, S., El Ansari, Z. N., Maouni, A., Badoc, A., & Lamarti, A. (2019). Effect of Cytokinins on the Micropropagation of Carob (<i>Ceratoniasiliqua</i> L.) through Shoot Tip Culture. *American Journal of Plant Sciences*, 10(09), 1469–1481. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.109104>
- Santos, J. A., Costa, R., & Fraga, H. (2017). Climate change impacts on thermal growing conditions of main fruit species in Portugal. *Climatic Change*, 140(2), 273–286. <https://doi.org/10.1007/s10584-016-1835-6>
- Siddique, A. B., & Islam, S. S. (2018). Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bangladesh Journal of Botany*, 44(4), 643–651. <https://doi.org/10.3329/bjb.v44i4.38636>
- Silvia, A. dos S., Eric, de C. S., Andr eacute, A. P., & Luciana, L. F. R. (2016). Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Brasiliorchis picta*. *African Journal of Biotechnology*, 15(6), 134–144. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.15043>
- Smith, R. H. (2013). Plant Tissue Culture. In *Plant Tissue Culture*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04367-3>
- Sussex I. M. (2008). The scientific roots of modern plant biotechnology. *The Plant cell*, 20(5), 1189–1198. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058735>
- Werner, T., & Schmölling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.002>
- Wilson44691 (2014). *Ceratoniasiliqua* at the Shivta archaeological site, southern Israel [Imatge digital]. Recuperat de:

https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Wilson44691#/media/File:Ceratoniasiliqua_Negev_041214.jpg

- Winkler, J. A., Cinderich, A. B., Ddumba, S. D., Doubler, D., Nikolic, J., Perdinan, Pollyea, A. M., Young, D. R., & Zavalloni, C. (2013). Understanding the Impacts of Climate on Perennial Crops. In *Climate Vulnerability: Understanding and Addressing Threats to Essential Resources* (Vol. 2, Issue 2011). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384703-4.00208-2>
- Zannou, O., Guclu, G., Koca, I., & Selli, S. (2019). Carob Beans (*Ceratoniasiliqua* L.): Uses, Health Benefits, Bioactive And Aroma Compounds. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 12(1), 26–34.
- Zunft, H. J. F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H. J., & Gruenwald, J. (2001). Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. *Advances in Therapy*, 18(5), 230–236. <https://doi.org/10.1007/BF02853169>
- Zwack, P. J., & Rashotte, A. M. (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4863–4871. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv172>

8. ANNEXOS

ANNEX A

Taula 6. Composició del medi Woody Plant Medium (WPM)

Micro Elements	mg/l	µM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25	1.00
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
MnSO ₄ .H ₂ O	22.30	131.94
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91

Macro Elements	mg/l	µM
CaCl ₂	72.50	0.65
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	471.26	2.35
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
K ₂ SO ₄	990.00	5.68
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	400.00	5.00

ANNEX B

Taula 7. Composició del medi Woody Plant Medium (MS)

Micro Elements	mg/l	µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91
Macro Elements	mg/l	µM
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61
Vitamins	mg/l	µM
Glycine	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinic acid	0.50	4.06
Pyridoxine HCl	0.50	2.43
Thiamine HCl	0.10	0.30

ANNEX C

Taula 8. Seguiment de la germinació setmanal dels 3 grups de llavors.

CONDICIONS APLICADES	GRUP	SETMANA 1	SETMANA 2	SETMANA 3	SETMANA 4	NO germinats	TOTAL
Pelades + M2	Grup 3-F	7				0	7
Pelades + M1	Grup 3-E	5				2	7
M2 + 48H remull + fred	Grup 2-D	3	5	3	2	2	15
M1 + 48H remull + fred	Grup 2-C	3	3	2	1	1	10
M2 + fred	Grup 2-B	5	7	2	0	10	24
M1 + fred	Grup 2-A	4	6	2	1	7	20
M2 + 48H remull)	Grup 1-D	3	11	2	0	1	17
M1 + 48H remull)	Grup 1-C	3	9	1	1	0	14
M2	Grup 1-B	3	6	0	3	2	14
M1	Grup 1-A	3	4	1	1	6	15

ANNEX D

Taula 9. Nivells de germinació segons el medi (presència hormonal).

MEDI	GERMINATS	NO GERMINAT	TOTAL
M1	9	6	15
M1 + 48H remull)	14	0	14
M2	12	2	14
M2 + 48H remull)	16	1	17
Pelades + M1	5	2	7
Pelades + M2	7	0	7
M1 + fred	13	7	20
M1 + 48H remull + fred	9	1	10
M2 + fred	14	10	24
M2 + 48H remull + fred	13	2	15

ANNEX E

Taula 10. Nivells de germinació segons les hores en remull de les llavors.

MEDI	GERMINATS	NO GERMINAT	TOTAL
M1	9	6	15
M1 + 48H remull)	14	0	14
M2	12	2	14
M2 + 48H remull)	16	1	17
M1 + fred	13	7	20
M1 + 48H remull +	9	1	10
M2 + fred	14	10	24
M2 + 48H remull +	13	2	15

ANNEX F

Taula 11. Nivells de germinació segons les hores en fred acumulat.

MEDI	GERMINATS	NO GERMINAT	TOTAL
M1	9	6	15
M1 + 48H remull)	14	0	14
M2	12	2	14
M2 + 48H remull)	16	1	17
M1 + fred	13	7	20
M1 + 48H remull +	9	1	10
M2 + fred	14	10	24
M2 + 48H remull +	13	2	15

ANNEX G

Taula 12. Resultats proliferació de calls en llum.

MEDI MS (LLUM)						
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats
13	4	4	20	0	13	0
19	7	5	20	0	13	0
31	6	4	24	0	4	0
37	5	0	25	0	7	0
50	5	0	30	0	10	0
Promig	5,4	2,6	23,8	0	9,4	0
Index Ploriferació		48,15		0		0
						16,05
MEDI MS + 1 K + 1 2,4-D (LLUM)						
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats
19	4	4	26	22	0	0
21	7	7	22	20	8	8
35	7	4	29	24	2	2
43	7	7	27	11	5	5
44	8	7	29	22	9	9
Promig	6,6	5,8	26,6	19,8	4,8	4,8
Index Ploriferació		87,88		74,44		100
						87,44
MEDI MS + 10 K + 10 2,4-D (LLUM)						
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats
6	7	4	29	4	4	0
13	5	3	21	12	0	0
33	4	0	22	15	15	7
39	9	5	25	13	11	7
53	4	4	24	14	9	8
Promig	5,8	3,2	24,2	11,6	7,8	4,4
Index Ploriferació		55,17		47,93		56,41
						53,17
MEDI MS + 1 K + 10 2,4-D (LLUM)						
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats
11	8	8	20	12	5	5
17	8	7	22	16	0	0
23	5	5	25	19	4	3
36	4	4	23	17	0	0
41	6	6	24	11	8	4
47	9	8	26	11	0	0
57	5	4	27	10	8	8
60	3	3	29	18	11	10
Promig	6	5,625	24,5	14,25	4,5	3,75
Index Ploriferació		93,75		58,16		83,33
						78,42
MEDI MS + 10 K + 1 2,4-D (LLUM)						
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats
10	5	3	30	16	10	10
15	6	4	22	16	0	0
16	8	6	23	19	4	3
32	6	2	21	10	13	13
34	3	2	28	7	6	4
35	8	7	27	9	0	0
45	8	6	31	23	5	0
Promig	6,285714286	4,285714286	26	14,28571429	5,428571429	4,285714286
Index Ploriferació		68,18		54,95		78,95
						67,36

ANNEX H

Taula 13. Resultats proliferació de calls en fosc.

MEDI MS (FOSCOR)							
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats	
1	5	5	21	0	0	0	
10	6	1	25	0	8	0	
27	6	4	26	0	3	1	
38	9	9	27	0	15	0	
54	9	0	23	0	5	0	
63	5	0	32	0	13	0	
Promig	6,66666667	3,16666667	25,66666667	0	7,33333333	0,16666667	TOTAL
Index Ploriferació		47,50		0		2,27	16,59
MEDI MS + 1 K + 1 2,4-D (FOSCOR)							
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats	
4	5	5	27	14	0	0	
9	7	3	23	17	0	0	
25	8	1	25	4	2	0	
30	6	5	23	8	0	0	
52	4	3	25	2	6	1	
56	10	10	24	8	3	3	
61	13	4	25	0	4	1	
Promig	7,571428571	4,428571429	24,57142857	7,571428571	2,142857143	0,714285714	TOTAL
Index Ploriferació		58,49		30,81		33,33	40,88
MEDI MS + 10 K + 10 2,4-D (FOSCOR)							
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats	
3	11	1	24	0	3	0	
20	8	0	20	0	1	0	
28	8	0	19	0	3	0	
40	6	0	22	0	9	2	
51	12	0	21	0	8	0	
59	6	0	27	1	7	1	
62	28	0	7	0	11	0	
Promig	11,28571429	0,142857143	20	0,142857143	6	0,428571429	TOTAL
Index Ploriferació		1,27		0,71		7,14	3,04
MEDI MS + 1 K + 10 2,4-D (FOSCOR)							
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats	
5	7	0	26	9	2	0	
8	11	1	24	9	2	2	
24	7	6	26	2	3	2	
25	6	4	25	0	12	12	
29	5	2	21	15	2	2	
42	6	2	24	1	10	4	
48	12	6	26	14	4	2	
65	15	0	24	0	3	0	
Promig	8,625	2,625	24,5	6,25	4,75	3	TOTAL
Index Ploriferació		30,43		25,51		63,16	39,70
MEDI MS + 10 K + 1 2,4-D (FOSCOR)							
PLACA	Nº Explants del hipocotil	Nº Calls formats	Nº Explants dels cotiledons	Nº Calls formats	Nº Explants de l'arrel	Nº Calls formats	
2	10	0	22	12	1	0	
7	9	0	19	5	1	1	
22	4	3	18	10	9	9	
26	8	1	25	4	4	2	
46	12	0	23	7	3	1	
49	5	0	23	0	11	9	
64	5	0	23	0	11	9	
Promig	7,571428571	0,571428571	21,85714286	5,428571429	5,714285714	4,428571429	TOTAL
Index Ploriferació		7,55		24,84		77,5	36,63