

Fitodermologia i cariologia d'*Onobrychis viciifolia* Scop., *O. supina* (Chaix) DC. i *O. saxatilis* Lam. de Catalunya

Teresa Garnatje i Àngels Cardona

Laboratori de Botànica. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.
08193 Bellaterra (Barcelona).

Key words: chromosome numbers, idiograms, index of asymmetry, stomatal index, stomatal size, stomatal type.

Abstract. *Phytodermology and karyology of Onobrychis viciifolia* Scop., *O. supina* (Chaix) DC. and *O. saxatilis* Lam. of Catalonia (NE Spain). Epidermal fragments from 47 populations of *Onobrychis viciifolia*, *O. supina* and *O. saxatilis* are studied. The stomatal size, orientation, type and stomatal index are calculated for taxonomical application. The form of the epidermal cells is the most important characteristic for this application. The basic number of genus *Onobrychis* $x=7$, the chromosome number of *O. supina*, $2n=14$, and *O. viciifolia*, $2n=28$, are confirmed. The chromosome number $2n=14$ is new for *O. saxatilis*. The karyotypes, the chromosome formula and asymmetry index are calculated.

Resum. S'han estudiat fragments epidèrmics provinents de 47 poblacions d'*Onobrychis viciifolia* Scop., *O. supina* (Chaix) DC. i *O. saxatilis* Lam. i s'ha calculat les dimensions, l'orientació i la tipologia dels estomes i l'índex estomàtic. Aquests paràmetres s'han utilitzat des del punt de vista taxonòmic i s'ha posat de manifest l'interès de la forma de les cèl·lules epidèrmiques com a caràcter discriminant en alguns casos de determinació dubtosa o difícil. S'ha efectuat l'estudi cariològic dels tres tàxons, s'han elaborat els corresponents idiogrames i fórmules cromosòmiques i s'ha calculat l'índex d'asimetria. Es confirma el nombre de base del gènere *Onobrychis* $x=7$ i els nombres cromosòmics d'*O. supina* ($2n=14$) i d'*O. viciifolia* ($2n=28$) i s'estableix el d'*O. saxatilis*, $2n=14$, nou per a la ciència.

Introducció

Aquest treball forma part d'un estudi biosistemàtic més ampli, emprès per tal d'aclarir la posició taxonòmica dels tàxons del gènere *Onobrychis* presents a Catalunya. El fet que siguin bons farratges naturals, *O. viciifolia* es cultiva amplament com a planta farratgera, incrementa l'interès d'aquest estudi.

L'estudi fitodermològic ens ha portat a trobar alguns caràcters diagnòstics que, afegits als utilitzats de manera tradicional, permeten diferenciar les següents espècies: *O. saxatilis* Lam., *O. supina* (Chaix) DC. i *O. viciifolia*

Scop., les dues darreres espècies són particularment difícils de distingir en les zones de contacte i/o convivència.

L'estudi cariològic ens ha permès de provar, basant-nos en la bibliografia i en les nostres pròpies observacions, l'existència de dos nivells de ploidia al si d'*O. saxatilis*, el diploide ($2n=14$), nou per a la ciència i el tetraploide ($2n=28$), i de confirmar que *O. supina* és diploide i *O. viciifolia* tetraploide.

A més de l'índex d'asimetria proposat per Stebbins (1971), s'ha utilitzat el nou mètode d'estimació de l'asimetria del cariotip proposat per Romero-Zarco (1986) per tal de comparar ambdós índexs.

Material i mètodes

Fitodermologia

L'estudi de l'epidermis inferior ens ha revelat la constància d'alguns dels seus paràmetres i la seva possible aplicació taxonòmica. Hem treballat amb caràcters quantitius: mida dels estomes i índex estomàtic, i amb caràcters qualitius: orientació i forma dels estomes. D'altres caràcters, com és la densitat d'estomes per unitat de superfície, han estat rebutjats perquè la bibliografia consultada ens els ha revelat com a molt variables i, per tant, poc vàlids des del punt de vista taxonòmic.

L'índex estomàtic, definit per Salisbury (1927) és:

$$IE = \frac{S}{E + S} \times 100$$

on S és el nombre d'estomes i E el nombre de cèl·lules epidèrmiques en una superfície determinada.

Les poblacions estudiades són les següents:

Onobrychis supina (Chaix) DC. Albarca (CF27) 18-1-86, Alt de Coubet (DG 57) 24-VI-86, Alt de Viu (CG 28) 22-V-86, Bagà (DG 08) 23-VI-86, Berga (CG 96) 20-VII-85, Boi* (CH 21) 22-VI-86, Bruguera* (DG 38) 24-VI-86, Caldes de Boi* (CH 21) 22-VI-86, Colldejou* (CF 25) 2-V-86, Durro* (CH 20) 22-VI-86, Forcat* (CH 10) 22-VI-86, Gombrèn (DG 17) 23-VI-86, Gósol (CG 78) 23-VI-86, Hortonedà (CG 53) 11-XI-85, La Pobla de Lillet (DG 17) 23-VI-86, Llesp (CH 10) 22-VI-86, Llinars* (CG 66) 20-VII-85, Malpàs (CG 19) 22-VI-86, Saldes (CG 97) 23-VI-86, Sarroca de Bellera* (CG 29) 22-VI-86.

Onobrychis viciifolia Scop. Alins (CH 61) 21-VI-86, Baró* (CG 49) 21-VI-86, Bellaterra* (CF 29) 4-VI-85, Bellver* (CG 99) 21-VII-85, Bor (DG 08) 21-VII-85, Cambrils (CG 66) 21-VI-85, Castellar del Vallès (DG 20) 27-V-85, Cornudella (CF 27) 3-V-86, Cruïlla d'Espot (CH 41) 21-VI-86, Dosrius* (CG 50) 17-IV-86, El Casot (DG 38) 24-VI-86, El Palà de Torro-

lla (CG 93) 20-VI-86, Escaló (CH 41) 21-VI-86, Estamariu (CG 79) 21-VII-85, Farena* (CF 47) 3-V-86, Font de St. Joan (CG 66) 21-VII-85, Juneda* (CG 10) 19-VI-86, Navata* (DG 87) 16-VIII-85, Noves de Segre (CG 79) 21-VII-85, Riaib (DG 38) 24-VI-86, Ripoll (DG 37) 16-VI-85, Santigosa (DG 47) 24-VI-86, Sort* (CG 49) 21-VI-86, Taüll (CH 20) 22-VI-86, Tredós (CH 23) 22-VI-86, Vilaverd (CF 47) 3-V-86.

Onobrychis saxatilis Lam. Bellaterra* (DF 29) 1-VII-86, Castellar del Vallès* (DG 20) 27-V-85, Ponts* (CG 75) 11-XI-85.

Per a cadascuna de les poblacions hem observat de 4 a 6 individus i tres mostres de cada un d'ells, les quals corresponen a tres folíols diferents. Vista la impossibilitat d'obtenir un nombre suficient de mostres d'epidermis a partir de material fresc, hem treballat sempre sobre plantes prèviament premsades i assecades. Per aquesta raó hem hagut de rehidratar les fulles amb una solució d'etanol, glicerol i aigua (1:1:1) durant 12 a 48 hores, segons l'estat de deshidratació de la fulla i, també, del tàxon en qüestió. Després les fulles eren submergides en una solució saturada d'hidrat de cloral durant uns dos minuts. Seguidament, sota la lupa binocular, es treia l'epidermis amb l'ajut d'unes pinces i es tenyia amb roig de ruteni durant dos minuts. Aquesta tinció permet una millor observació del material que si aquest s'estudia sense tenyir.

L'observació s'ha efectuat amb un Visopan Reichert de 400 augments. La zona de la preparació escollida, (0.10904 mm²) s'ha calcat sobre paper vegetal per tal d'efectuar els càlculs corresponents i de disposar sempre d'un testimoni ja que les preparacions no són permanents.

Cariologia

Els estudis cariològics s'han efectuat en poncelles joves, fixades directament al camp en alcohol etílic absolut i àcid acètic ferro-carminat (4:1). S'han fixat un mínim de 15 plantes per població. Les poblacions estudiades des del punt de vista cariològic estan marcades amb un asterisc en la relació de poblacions estudiades fitodermològicament. En total són 19; encara que n'estudiarem moltes més, la informació obtinguda no ens sembla suficient per a prendre-les en consideració.

La tinció s'ha realitzat bullint les poncelles durant dos minuts en 10 ml. de carmí acètic addicionat amb 2 o 3 gotes d'acetat fèrric i deixant reposar el material en el colorant durant 24 hores aproximadament; pensem que aquest és el temps òptim perquè els cromosomes d'*Onobrychis* quedin ben tenyits amb el colorant esmentat.

Els aixafaments s'han fet amb una gota d'àcid acètic al 45 % i glicerol (1:1) entre porta i cobre i les preparacions s'han observat amb un fotomicroscopi Leitz Orthoplan proveït de dispositiu de dibuix (cambra clara de tub amb un ocular de 20 x). Hem obtingut, mitjançant projecció, els dibuixos de metafases mitòtiques així com les mides proporcionals dels cromosomes.

Hem completat la morfologia d'aquests, observant-los detingudament al microscopi a 1500 augments.

S'han establert els nombres cromosòmics sobre un mínim de 10 metafases ovàriques i els idiogrames corresponents, expressats com fórmula cromosòmica i idiograma haploide, basant-nos almenys en cinc metafases projectades i dibuixades. S'ha seguit la terminologia de Levan et al. (1964). També s'ha calculat l'índex d'asimetria segons Stebbins (1971) i segons Romero-Zarco (1986). Per donar la fórmula cromosòmica, hem establert 4 categories de cromosomes segons la seva longitud aparent total: ML (molt llarg) $> 2 \mu\text{m}$; L (llarg) $1.5-2 \mu\text{m}$; M (mitjà) $1-1.5 \mu\text{m}$ i C (curt) $< 1 \mu\text{m}$.

Resultats i discussió

Fitodermologia

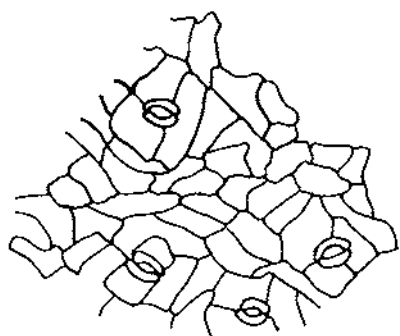
En les espècies estudiades d'*Onobrychis* hem trobat tres tipus d'estomes que s'ajusten als models descrits per Metcalfe & Chalk (1979):

- a) Anomocític o amb cèl·lules irregulars. Les cèl·lules que envolten l'estoma són en nombre indefinit i no difereixen de les altres cèl·lules epidèrmiques. *Onobrychis saxatilis* presenta una proporció més gran d'estomes anomocítics (Fig. 1), encara que també s'hi donen els anisocítics i paracítics.
- b) Anisocític o amb cèl·lules desiguals. Generalment l'estoma és envoltat per tres cèl·lules auxiliars, una de les quals és considerablement més gran o més petita que les altres dues.
- c) Paracític o amb tres cèl·lules paral·leles. Hi trobem una o, més freqüentment, dues cèl·lules auxiliars d'eixos llargs i paral·lels a les cèl·lules oclusives. Aquets dos últims tipus d'estoma es troben preferentment a *O. viciifolia* i a *O. supina*, i és més freqüent el paracític a mesura que els estomes s'apropen al nervi principal de la fulla. En resum, hem trobat els tres tipus d'estomes a les tres espècies i, per tant, no podem considerar aquest caràcter com a discriminant.

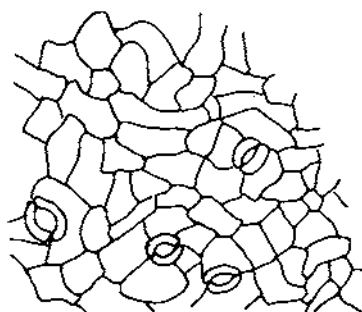
L'orientació dels estomes respecte del nervi principal no varia massa en els tàxons estudiats. L'eix longitudinal de l'estoma tendeix a mantenir-se paral·lel al feix principal, però aquesta orientació es va perdent a mesura que els estomes se n'allunyen.

Onobrychis saxatilis presenta un índex estomàtic inferior al de les altres dues espècies (Taula 1). Una anàlisi de la variància ens corrobora que hi ha diferències significatives ($P < 0.55$) en l'índex estomàtic entre espècies. Aquest índex és un paràmetre relativament constant dintre de cada espècie, independentment de quina sigui la població estudiada (Taula 1), la qual cosa reafirma el seu valor com a caràcter taxonòmic. No obstant això, cal tenir present que l'índex estomàtic es pot veure afectat per la humitat (Cutter 1978). *Onobrychis viciifolia* i *O. supina* no difereixen significativament pel seu índex estomàtic (t de Student, $P < 0.10$).

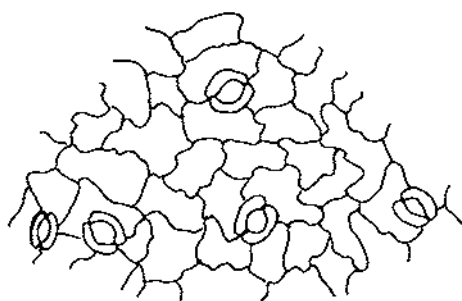
ORSIS



A



B



C

Figura 1. Fragments epidèrmics d'*Onobrychis*: (A) *O. saxatilis* (B) *O. supina*. (C) *O. viciifolia*. L'orientació del nervi principal coincideix amb l'horitzontal de la pàgina.

Taula 1. Característiques estomàtiques d'*Onobrychis*.

Espècie	Índex estomàtic		Mida dels estomes (μm)	
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n
<i>O. supina</i>	9.57 \pm 0.28	42	25.50 \pm 0.38	42
<i>O. viciifolia</i>	9.96 \pm 0.33	37	26.28 \pm 0.39	37
<i>O. saxatilis</i>	6.09 \pm 0.22	4	21.89 \pm 0.69	4

Pel que fa a les dimensions dels estomes, hem obtingut uns resultats semblants per a cada espècie (Taula 1). Això permet de creure que aquest caràcter no té relació amb els factors ecològics, donat que varia poc en les diferents poblacions estudiades de cada espècie. Novament, l'anàlisi de la variància revela diferències significatives entre espècies en la mida dels estomes. Això és degut que *O. saxatilis* té estomes més petits que les altres dues espècies (Taula 1), les quals tampoc difereixen significativament entre si en aquest caràcter. L'afirmació de Cutter (1978) que les dimensions dels estomes depenen del nivell de ploïdia només es compleix per *O. viciifolia* i *O. saxatilis*. Per altra banda, la mida dels estomes i l'índex estomàtic no estan gens correlacionats ($r=0.000$) en les poblacions que hem estudiat, la qual cosa evidencia que es tracta de caràcters independents.

Altres caràcters de valor sistemàtic a considerar són les característiques de les cèl·lules epidèrmiques. *O. saxatilis* presenta unes cèl·lules epidèrmiques molt petites i subpoligonals, mai sinuades, mentre que a *O. supina* i *O. viciifolia* són molt més grans, generalment sinuades i de vegades subpoligonals.

Proposem una clau per a diferenciar *O. saxatilis* de les altres dues espècies:

- IE < 7. Estomes < 23 μm . Cèl·lules epidèrmiques molt petites, subpoligonals, no sinuades... *O. saxatilis*
- IE > 7. Estomes > 23 μm . Cèl·lules epidèrmiques molt més grans, sovint sinuades... *O. supina*
O. viciifolia

Per diferenciar *O. supina* d'*O. viciifolia* hem de recórrer als caràcters tradicionals ja que, com hem comentat, els caràcters fitodermològics que hem emprat no discriminen entre aquestes dues espècies.

Cariologia

Les metafases i els idiogrames es troben a les Figures 2 i 3.

Confirmem el nombre cromosòmic d'*O. viciifolia*, $2n=28$ (Favarger 1954, Fernandes & Queirós 1978, Kozuharov et al. 1973, Larsen 1955, Sacristán 1966, Ujikova & Schwarzova 1976), comptat en les poblacions estudiades.



Figura 2. (A) Metafase mitòtica d' *O. saxatilis*, de Ponts. Fòrmula cromosòmica: $6M(st + m^{sat} + sm^{sat} + sm + m + m^{sat}) + 1C(m)$.
 (B) Metafase mitòtica d' *O. supina*, de Durro. Fòrmula cromosòmica: $2ML(m + m^{sat}) + 5M(2m + sm^{sat} + 2m^{sat})$.
 (C) Metafase mitòtica d' *O. supina* de Caldes de Boí. Fòrmula cromosòmica: $3ML(sm^{sat} + m^{sat} + m) + 4M(m^{sat} + 3m)$.
 (D), (E), (F) Idiogrames corresponents.

Els idiogrames presenten diferències considerables. Cal tenir present que la població de Bellver de Cerdanya (Fig. 3c), provinent d'un camp de conreu, podria pertànyer a una de les moltes varietats de trepadella importades i que han estat objecte de millora genètica. Per contra, la població de Farena (Fig. 3d) es pot considerar subespontània donat que és ben allunyada dels

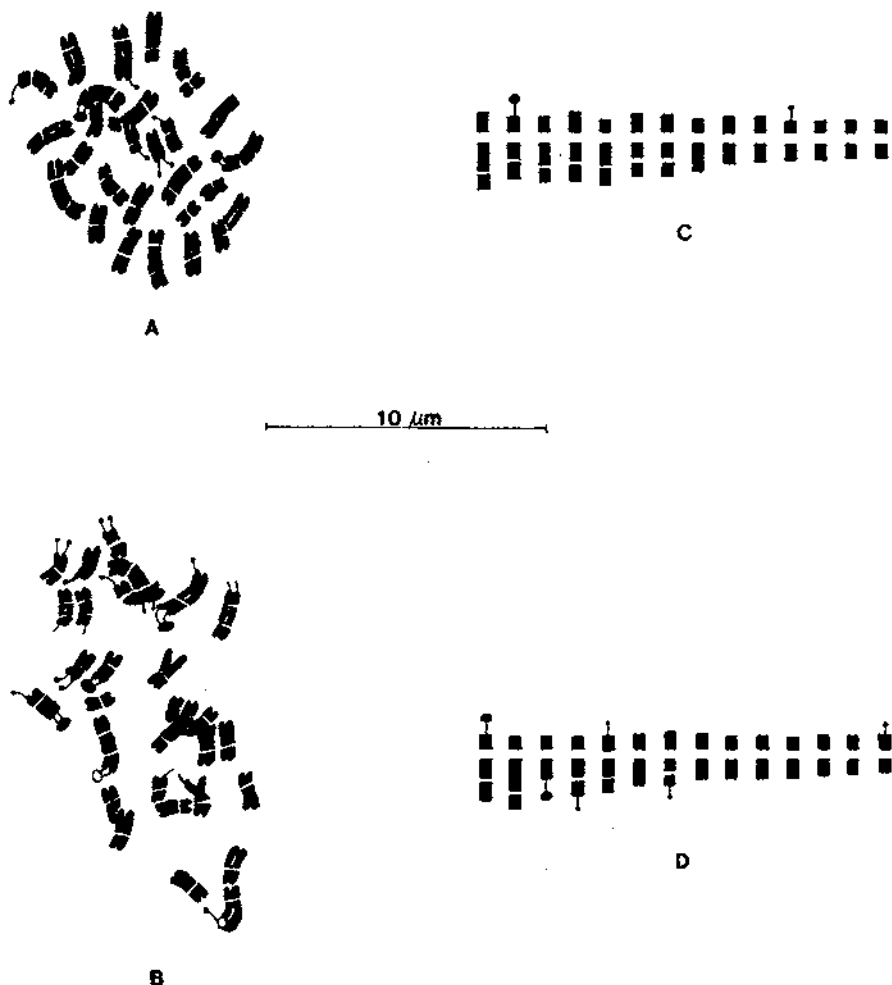


Figura 3. (A) Metafase mitòtica d'*O. viciifolia*, de Farena. Fòrmula cromosòmica: 1M(sm) + 5L ($m^{sat} + 2m + st + m$) + 8M ($2sm + m^{sat} + 5m$).
 (B) Metafase mitòtica d'*O. viciifolia*, de Bellver de Cerdanya. Fòrmula cromosòmica.: 2ML ($M^{sat} + st$) + 3L ($st^{sat} + 2m^{sat}$) + 8M ($4sm + 2m^{sat} + 2m$) + 1C (M^{sat}).
 (C), (D) Idiogrames corresponents.

camp de conreu. La diferència més important observada entre ambdues poblacions és la presència de quatre macrosatèl·lits a la població de Bellver i de dos a la de Farena. També són diferents les fórmules cromosòmiques, encara que els cromosomes presenten una longitud mitjana aparent semblant en ambdós casos. Per contra, no hi ha variació en el tipus d'asimetria del cariotip.

També confirmem el nostre cromosòmic d'*O. supina*, $2n=14$ (Guinochet & Logeais 1962, Larsen 1960, Natarajan 1978, Sacristán 1966). Les longituds mitjanes aparents dels cromosomes de les dues poblacions estudiades són prou diferents i els idiogrames també, donat que la població de Caldes de Boí (Fig. 2f) presenta quatre macrosatèl·lits i la de Durro (Fig. 2e) només dos, i que la primera posseeix un cromosoma més de la classe ML que no la segona. Aquest fet fa creure en l'existència de races cromosòmiques d'*O. supina* difícilment detectables morfològicament. Per contra, l'índex d'asimetria coincideix en ambdues poblacions i representa un menor grau d'evolució respecte d'*O. viciifolia*.

Creiem que el nombre cromosòmic que hem establert per *O. saxatilis*, $2n=14$, és nou per a la ciència ja que l'únic recompte del qual tenim constància és $2n=28$, efectuat per Sacristán (1966); encara que sense indicació de localitat ni presentació de dibuix ni fotografia, no dubtem de la seva validesa.

La longitud mitjana aparent dels cromosomes d'*O. saxatilis* és de $1.04 \mu\text{m}$, és a dir, molt més petits que els de les dues espècies anteriors, cosa que es reflecteix en l'idiograma i en la fórmula cromosòmica on no hi ha cap cromosoma de les classes ML i L. L'Índex d'asimetria és $2A$, igual que en *O. viciifolia*, però que indica un grau d'evolució més elevat que en *O. supina*, com veurem tot seguit.

Creiem que el mètode d'estimació de la asimetria del cariotip de Romero-Zarco (1986) s'acosta més a la realitat que el proposat per Stebbins (1971), i és de 0.39 a *O. viciifolia* i a *O. saxatilis* i de 0.27 i 0.33 a les dues poblacions d'*O. supina*.

L'anàlisi i la comparació dels idiogrames dels tres tàxons ens permet de dir que posseeixen un cariotip caracteritzat per la presència de diversos cromosomes amb constriccions secundàries, d'alguns amb macrosatèl·lits i d'altres amb microsatèl·lits, i que els cromosomes són dels més petits dins de les fanerògrames, amb una longitud mitjana aparent que oscil·la entre 1.04 i $1.74 \mu\text{m}$. D'altra banda, hi ha una predominança dels cromosomes metacèntrics i submetacèntrics enfront dels acrocèntrics, la qual cosa dóna lloc a cariotips força homogenis i amb un índex d'asimetria més aviat baix: $1A$, $2A$ segons l'índex de Stebbins (1971) i de 0.27-0.39 segons Romero-Zarco (1986), possiblement, degut a la formació de cromosomes metacèntrics i submetacèntrics per fragmentació i fusió d'altres d'acrocèntrics, la qual cosa representa un increment secundari de la simetria en el procés evolutiu. És a dir, les tres espècies estudiades posseeixen un cariotip més evolucionat del que sembla amb l'aplicació dels índexs esmentats.

Conclusions

L'estudi de l'epidermis ha posat de manifest l'interès de la forma de les cèl·lules epidèrmiques com a caràcter discriminant en alguns tàxons de determinació dubtosa o difícil. Les cèl·lules epidèrmiques són molt petites i no sinuades a *O. saxatilis*, mentre que en els altres dos tàxons són molt més grans i, generalment, sinuades.

Els estomes d'*O. viciifolia* (tetraploide) són més grans que els d'*O. saxatilis* (diploide), però molt similars als d'*O. supina*, també diploide. Aquest fet contradiu el que postulà Cutter (1978) sobre la relació directa entre les dimensions dels estomes i el nivell de ploïdia.

Confirmem els nombres cromosòmics d'*O. viciifolia* ($2n=28$), *O. supina* ($2n=14$) i establim el nombre $2n=14$ a *O. saxatilis*, nou per a la ciència, pel que nosaltres sabem. Confirmem, també, el nombre de base de gènere $x=7$. Finalment, els resultats obtinguts ens permeten de considerar que el mètode d'estimació de la asimetria del cariotip de Romero-Zarco (1986) s'acosta més a la realitat que no el d'Stebbins (1971).

Bibliografia

- Cutter, E. 1978. Anatomía de las plantas. Luis Cárcamo. Madrid.
- Favarger, C. 1954. Sur un origine possible de l'esparcette cultivée, *O. viciifolia*. VIII Congr. Int. Bot. Comp. Rend. Séan. Sect. 9 et 10: 56-58.
- Fernandes, A. & Queirós, M. 1978. Contribution à la connaissance cytotoxonomique des Spermatophyta du Portugal. IV. Leguminosae (Suppl. 3). Bol. Soc. Brot. 52: 79-164.
- Guinochet, M. & Logeais, A., 1962. Premières prospections caryologiques dans la flore des Alpes maritimes. Rev. Cytol. Biol. Vég. 25:466-467.
- Kozuharov, S.I., Petrova, A.V. & Markova, T. 1973. IOPB chromosome number reports. Taxon 22: 285-291.
- Larsen, K. 1955. Cytotaxonomical studies on the Mediterranean flora. Bot. Not. 108:263-275.
- Larsen, K. 1960. Stray contributions to the cytology of the vascular plants. Bot. Tidsskrift. 55: 313-315.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1979. Anatomy of the Dicotyledons. Clarendon Press. Oxford.
- Natarajan, G. 1978. IOPB chromosome number reports. Taxon 27: 519-535.
- Romero-Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35: 526-530.
- Sacristán, M.D. 1966. Estudios citotaxonomicos sobre el género *Onobrychis* (L.) Adanson con referencia especial a la citogenética de la esparceta (*O. viciifolia* Scop.). Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Salisbury, E.J. 1927. Stomatal frequency. Phil. Trans. Roy. Soc. B. 216: 1-10.

- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold. London.
- Uhrikova, A. & Schwarzova, T. 1976. IOPB chromosome number reports. Taxon 25: 491-499.

Manuscrit rebut el novembre de 1986.